ผลทางยาของสูตรมะนาวผงต่อเซลล์บุท่อไตที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึกนิ่ว และผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรต และภาวะต้านอนุมูลอิสระในอาสาสมัครสุขภาพดี

นายพูนสิน พวงไพโรจน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Medicinal effect of lime powder regimen in HK-2 cells exposed to lithogenic crystals and its citraturic and antioxidative responses in healthy volunteers

Mr. Poonsin Poungpairoj

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลทางยาของสูตรมะนาวผงต่อเซลล์บุท่อไตที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึกนิ่ว และผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรต และภาวะต้านอนุมูลอิสระในอาสาสมัครสุขภาพดี
โดย	นายพูนสิน พวงไพโรจน์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.แพทย์หญิง ปาจรีย์ ลิลิตการตกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.แพทย์หญิง ปาจรีย์ ลิลิตการตกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุพจน์ รัชชานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พูนสิน พวงไพโรจน์ : ผลทางยาของสูตรมะนาวผงต่อเซลล์บุท่อไตที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึกนิ่ว และผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรต และภาวะต้านอนุมูลอิสระในอาสาสมัครสุขภาพดี. (Medicinal effect of lime powder regimen in HK-2 cells exposed to lithogenic crystals and its citraturic and antioxidative responses in healthy volunteers) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. ชาญชัย บุญหล้า, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ศ. ปิยะรัตน์ โตสุโข-วงศ์, ดร. พญ. ปาจรีย์ ลิลิตการตกุล, 73 หน้า.

ภาวะที่มีปริมาณของซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitrauria) และโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคนิ่วไต นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยนิ่วไตจะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (oxidative stress) เพิ่มขึ้น จากการศึกษาเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากมะนาว เป็นสูตรมะนาวผง (lime powder regimen, LPR) พบว่า LPR สามารถเพิ่มระดับของซิเทรต และโพแทสเซียมในปัสสาวะสูงขึ้น และลดการเกิด oxidative stress ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ผู้วิจัยเห็นว่า LPR มีคุณสมบัติสามารถนำมาใช้รักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้ การศึกษาวิจัยนี้วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ และสารโลหะหนักใน LPR ด้วยเครื่อง ICP-OES วิเคราะห์ความเป็นพิษของ LPR ต่อเซลล์บุท่อไต (human kidney, HK-2 cells) และหนูถีบจักร ศึกษาผลของ LPR ต่อการการเปลี่ยนแปลงของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะ ความเป็นด่าง โพแทสเซียม และสารต้านอนุมูลอิสระในปัสสาวะในอาสาสมัคร (n=13) ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของ LPR พบว่า มีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และพลังงานทั้งหมด 3.30, 65.56, 0.94 กรัมต่อ 100 กรัม และ 283.9 กิโลแคลอรี่ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และองค์ประกอบสารโลหะหนักของ LPR ได้แก่ อาร์ซินิก แคดเมียม ตะกั่ว โครเมียม โคบอลต์ และ นิกเกล อยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำกว่ามาตราฐานอ้างอิงที่กำหนดไว้ (WHO/FDA) จากผลของ LPR ต่ออัตราการมีชีวิตของ HK-2 cells โดยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 100 mg% ของ LPR ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดลงของ HK-2 cells จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ LPR ในหนูถีบจักร พบว่าค่า LD_{50} น้อยว่า 10 กรัมต่อกิโลกรัม บ่งชี้ให้เห็นว่า LPR มีความเป็นพิษต่ำมาก และจากผลการศึกษาในอาสาสมัคร LPR สามารถเพิ่มปริมาณของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะ ปริมาณโพแทสเซียม ความเป็นด่าง และสารต้านอนุมูลอิสระในปัสสาวะ และไม่พบความผิดปกติใดๆ ในอาสาสมัคร สรุปจากการศึกษาผลต่างๆ ของ LPR ไม่พบสารโลหะหนักเกินค่ามาตรฐานที่กำหนด จากการศึกษาในระดับเซลล์ และสัตว์ทดลองไม่พบความเป็นพิษ และจากการศึกษาในอาสาสมัคร LPR สามารถลดการเกิดภาวะ hypocitrauria hypokaliuria และ oxidative stress แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติความเป็นยาที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้รักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต อีกทั้งยังไม่มีผลข้างเคียงต่อร่างกาย ดังนั้นจากการศึกษาคุณสมบัติของ LPR ในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาและศึกษาต่อใน clinical trial phase 2 เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่อไป

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต พูนสิน พวงไพโรจน์

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Piyaratana Tosukhowong

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5274796730 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : LIME / LD_{50} / NEPHROLITHIASIS / OXIDATIVE STRESS

POONSIN POUNGPAIROJ : MEDICINAL EFFECT OF LIME POWDER REGIMEN IN HK-2 CELLS EXPOSED TO LITHOGENIC CRYSTALS AND ITS CITRATURIC AND ANTIOXIDATIVE RESPONSES IN HEALTHY VOLUNTEERS. ADVISOR : ASST. PROF. CHANCHAI BOONLA Ph.D., CO-ADVISOR : PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, PAJAREE LILITKARNTAKULI Ph.D., 73 pp.

Low urinary excretions of citrate (hypocitrauria) and potassium (hypokaliuria) are major risk factors for kidney stone formation in Thai patients. Increased oxidative stress is also frequently found in these patients. Our preliminary study demonstrated that the in-house limeade-based product, called lime powder regimen (LPR) was capable of increasing urinary citrate and potassium, as well as reducing oxidative stress in kidney stone patients, and we proposed that LPR could be an option for kidney stone treatment. In this study, nutritional and toxic metal (by ICP-OES) contents in LPR were determined. Toxic potential of LPR was evaluated in human kidney (HK-2) cells and mice. Citraturic, kaliuric, alkalinizing and antioxidative responses of LPR in healthy volunteers (n=13) were investigated. Total protein, carbohydrate, fat and energy of LPR were 3.30 g, 65.56 g, 0.94 g and 283.90 kcal per 100 g of LPR, respectively. Contents of arsenic, cadmium, lead, chromium, cobalt and nickel in LPR were below the maximum permissible limits given by WHO/FDA. MTT assay showed that LPR at concentration of <100 mg% did not significantly alter viability of HK-2 cells. Acute toxicity of LPR tested in mice revealed an LD_{50} of >10 g/kg, indicating very low toxic potential. In 13 healthy volunteers, LPR was capable of boosting plasma citrate and urinary citrate, potassium, pH and total antioxidant status with no side effect and complaint. Conclusively, toxic metals in LPR were not exceeding the permissible limit. There was no significant toxic effect of LPR observed in cell culture and animal models. In trialed healthy individuals, LPR provided a medicinal quality in reducing hypocitraturia, hypokaliuria and oxidative stress, which might be beneficial for kidney stone treatment. In addition, no acute/serious adverse events were observed. Therefore, LPR is a safe and promising regimen for further testing its therapeutic efficacy in kidney stone patients, phase 2 clinical trial.

Department : Biochemistry Student's Signature พูนศิลป์ พงษ์ไพบูรณ์

Field of Study : Medical Biochemistry Advisor's Signature Chan Boon

Academic Year : 2010 Co-advisor's Signature Piyaratana Tosukhowong

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และ ดร. แพทย์หญิง ปาจรีย์ ลิลิตการ-ตกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ นพ. ฐสิณัส ดิษยบุตร ที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำและคำสั่งสอน ตั้งแต่ก่อนเริ่มการทดลอง การทดลอง การวิเคราะห์ข้อมูล การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ นอกจากนี้ยังชี้แนะ อบรม สั่งสอน ในทุกๆด้าน ที่มีประโยชน์ต่อการดำเนินชีวิตประจำวันตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ที่ยินดีเป็นประธานสอบ

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์ สุพจน์ รัชชานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่อง การออกจดหมาย การจัดทำเอกสาร การเตรียมสถานที่ และการเบิกใช้สิ่งของต่างๆ

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบุพการี พี่ น้อง เพื่อนๆทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษา คำแนะนำในทุกๆด้าน และให้กำลังใจตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

ข้อตกลงเบื้องต้น..... 3

ข้อจำกัดของการวิจัย..... 4

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

วิธีดำเนินการวิจัย..... 5

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย..... 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 16

ประชากร..... 16

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 17

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ..... 19

การวิเคราะห์ข้อมูล..... 25

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 26

การศึกษาองค์ประกอบข้อมูลโภชนาการที่สำคัญของสูตรมะนาวผง..... 26

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และแร่ธาตุต่างๆในสูตรมะนาวผง..... 26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

การศึกษาองค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง..... 26
การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของสูตรมะนาวผงต่อการเกิด crystal growth... 28
การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อไต 28
การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระ ต่อเซลล์บุผิวท่อไตของสูตรมะนาวผง..... 31
การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงในสัตว์ทดลอง..... 33
การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะ..... 35
การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะ..... 37
การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะ..... 38
การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะ..... 39

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 40
สรุปผลการวิจัย..... 40
อภิปรายผล..... 42
ข้อเสนอแนะ..... 46

รายการอ้างอิง..... 47

ภาคผนวก..... 53
ภาคผนวก ก..... 54
ภาคผนวก ข..... 58
ภาคผนวก ค..... 68
ภาคผนวก ง..... 71

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของผลไม้กลุ่ม Citrus fruits……	15
2	เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	17
3	องค์ประกอบทางโภชนาการของสูตรมะนาวผง.....	26
4	องค์ประกอบทางเคมี และแร่ธาตุต่างๆ ในสูตรมะนาวผง.....	27
5	องค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง.....	27
6	ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี.....	33
7	ผลตรวจกรองสุขภาพของอาสาสมัครก่อนเข้าร่วมโครงการ.....	34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไก และกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนิ่วไต.....	11
2	สูตรโครงสร้างซิเทรต.....	12
3	กลไกการดูดซึมของซิเทรตเข้าสู่เซลล์ในสภาวะปกติ.....	13
4	แผนผังการทดสอบค่า LD_{50} ของ LPR ในหนู (mice)……..	23
5	ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเกิด crystal growth.....	28
6	ผลของสูตรมะนาวผง ต่อ cell viability ของ HK-2 cell และ COM-treated HK-2 cell.....	31
7	ผลของ LPR และการยับยั้งการสร้าง ROS ใน HK-2 cell .....…….	32
8	ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับซิเทรตในเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี.....	36
9	ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของโพแทสเซียมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี.....	37
10	ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี.....	38
11	ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี.....	39

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

LPR	lime powder regimen
ROS	reactive oxygen species
COM	calcium oxalate monohydrate
HK-2 cells	human kidney cells
LD_{50}	median lethal dose
eGFR	Estimate glomerular filtration rate
CaOx	calcium oxalate
CaP	calcium phosphate
USDA	United States Department of Agriculture
USP	United States Pharmacopoeia
OPDE-DF	oral Permitted Daily Exposure for Dosage Forms
RDA	Recommended Dietary Allowances
ALDC-HM	Acceptable Limits for Daily Consumption of Heavy Metals
Cr	creatinine
TAS	Total antioxidant status
mEq	milliequivalence

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะนาว (Lime, *Citrus aurantifolia* Swing) เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของไทย ที่มีปริมาณซิเทรต (citrate) สูงที่สุด (4,920 มิลลิกรัม/ 100 กรัม) เมื่อเทียบกับผลไม้รสเปรี้ยว (citrus fruits) ชนิดอื่น ซิเทรตหรือกรดซิทริก (citric acid) เป็นสารที่มีประจุเป็นลบ ละลายน้ำได้ดี นอกจากซิเทรตจะเป็นสารตัวกลางที่สำคัญมากในกระบวนการเมแทบอลิซึมแล้ว ซิเทรตยังสามารถจับรวมกับสารประจุบวกต่างๆ ในของเหลวของร่างกายได้ โดยเฉพาะจับกับแคลเซียมในปัสสาวะ ดังนั้นซิเทรตจึงมีบทบาทสำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ เป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่ว (stone inhibitor) ในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยซิเทรตจะจับแคลเซียมเป็นสารประกอบแคลเซียมซิเทรต ซึ่งมีสมบัติละลายน้ำได้ดีมาก จึงสามารถป้องกันการเกิดผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟตได้ดี นอกจากซิเทรตแล้วในมะนาวยังประกอบด้วยเกลือแร่ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันนิ่ว เช่น โพแทสเซียม (149 มิลลิกรัม/ 100 กรัม) และแมกนีเซียม (28 มิลลิกรัม/100 กรัม) (1) และในน้ำมะนาวยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอีกหลายชนิด อาทิเช่น vitamin C, vitamin E, beta–carotenes, polyphenols และ flavonoids เป็นต้น (2-4) หลายงานวิจัยเสนอว่าการดื่มน้ำมะนาวน่าจะสามารถช่วยลดโอกาสการเกิดนิ่วได้ และน่าจะเป็นทางเลือกในการใช้เป็นยารักษาโรคนิ่วไตได้ (5-9)

โรคนิ่วไต (Nephrolithiasis/ Kidney stone) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติขององค์ประกอบในปัสสาวะ ความชุกของโรคนิ่วไตมีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วทุกภูมิภาคของโลก โดยเฉพาะในประเทศแถบเขตร้อน เช่น ประเทศซาอุดิอะราเบีย พบได้ 20% ในประเทศไทยมีความชุกของการเป็นโรคนิ่วไตสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประมาณ 10-17% (10) ช่วงอายุที่พบมากที่สุดคือ 40-60 ปี และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงประมาณ 1-2 เท่า ดังนั้นโรคนิ่วไตจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ทั้งในกลุ่มประชากรวัยแรงงานและผู้สูงอายุ นอกจากนี้โรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์การเกิดนิ่วซ้ำสูงมาก ซึ่งการเกิดนิ่วซ้ำหลายครั้งจะทำให้ไตถูกทำลายมากขึ้นและเสี่ยงต่อภาวะไตวายเรื้อรังและโรคไตระยะสุดท้าย (end stage renal disease) สูงขึ้น ปัจจุบันมีผู้ป่วยที่ทุกข์ทรมานจากโรคนิ่วไตเป็นจำนวนมากในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนั้นสิ่งจำเป็นเร่งด่วน คือ การหายาที่มีประสิทธิภาพดีแต่ราคาไม่สูงที่ช่วยลดโอกาสการเกิดโรคนิ่วซ้ำและลดความเสี่ยงต่อภาวะไตวาย เพื่อช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยและลดค่าดูแลรักษาพยาบาลผู้ป่วย

รายงานวิจัยในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วที่สำคัญ คือ ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) (10-12) ซึ่งสาเหตุหลักมาจากการได้รับซิเทรตและโพแทสเซียมจากอาหารไม่เพียงพอ และการสูญเสียโพแทสเซียมทางเหงื่อ ดังนั้นการรักษาทางยา (medical therapy) ที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยนิ่วไตไทย คือ การให้ยาที่มีส่วนประกอบของโพแทสเซียมและซิเทรต เพื่อเพิ่มปริมาณการขับออกของสารยับยั้งนิ่วทั้งสองชนิดนี้ในผู้ป่วย นอกจากนี้งานวิจัยยังพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตไทยมีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (oxidative stress) และการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไต (renal tubular injury) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ (13) ซึ่งเป็นปัจจัยส่งเสริมการเกิดนิ่วซ้ำ ดังนั้นการให้สารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นอีกทางหนึ่งที่ช่วยลดการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตและลดโอกาสการการเกิดนิ่วซ้ำได้

รายงานวิจัยของ Robinson และคณะ(14) พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับยาในภาพสารสังเคราะห์ของเกลือของซิเทรต ที่มีปริมาณโพแทสเซียม 42 มิลลิอิควิวาเลนท์ และซิเทรต 63 มิลลิอิควิวาเลนท์ สามารถเพิ่มระดับซิเทรตในปัสสาวะได้ จึงเป็นวิธีการรักษาทางยาที่ช่วยป้องกันการเติบโตของก้อนนิ่วและการเกิดนิ่วซ้ำ รายงานวิจัยของ Wabner และคณะ (15) พบว่าการให้ผู้ป่วยดื่มน้ำมะนาว 8 แก้ว หรือการดื่มน้ำส้มคั้น 1 ลิตรต่อวัน สามารถเพิ่มระดับสารยับยั้งการก่อนิ่ว (ซิเทรต โพแทสเซียม และแมกนีเซียม) ในปัสสาวะ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของค่า pH ของปัสสาวะ และรายงานการศึกษาของปิยะรัตน์และคณะ (13) ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต (n=14) หลังผ่าตัดที่ได้รับสูตรมะนาวผง (lime powder regimen, LPR) ที่มีโพแทสเซียม 21 มิลลิอิควิวาเลนท์ และซิเทรต 63 มิลลิอิควิวาเลนท์ โดยละลาย LPR 1 ซอง ในน้ำ 1 แก้ว รับประทานวันละ 1 ซอง ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า LPR สามารถใช้แทนยาโพแทสเซียมซิเทรตได้ โดยทำให้มีระดับของซิเทรตและโพแทสเซียมในปัสสาวะเพิ่มขึ้น และทำให้ปัสสาวะเป็นด่างมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า LPR มีประสิทธิภาพดีกว่ายาโพแทสเซียมซิเทรตในการลดระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น และการทำลายของเซลล์บุต่อไต จึงเป็นการลดทั้งโอกาสการเกิดผลึกนิ่วและการเกาะติดของผลึกกับเซลล์บุท่อไต ซึ่งอาจส่งผลให้การทำงานของหน่วยไตดีขึ้น การศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า LPR น่าจะใช้เป็นยารักษาโรคนิ่วไตได้ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์บุผิวท่อไต สัตว์ทดลอง และศึกษาผลของ LPR ต่อการเพิ่มระดับซิเทรตในปัสสาวะรวมทั้งผลข้างเคียงในคนปกติ

จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า สูตรมะนาวผงมีองค์ประกอบทางยาที่มีคุณสมบัติเป็นตัวช่วยยับยั้ง หรือลดอัตราการเกิดผลึกนิ่วไต อีกทั้งยังไม่มีผลต่อการมีชีวิต (cell viability) ของเซลล์บุท่อไต ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ในเซลล์ได้ และคาดว่าสูตรมะนาวผงจะไม่มีความเป็นพิษหรือหรือผลข้างเคียงต่อสัตว์ทดลองและคน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังต้องการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 ในอาสาสมัครคน

ปกติสุขภาพดี เพื่อทดสอบว่าการรับประทานสูตรมะนาวผงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของซิเทรตในเลือดและในปัสสาวะอย่างไร รวมทั้งผลต่อระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และตัวบ่งชี้ของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางยา (ซิเทรต) และทางโภชนาการที่สำคัญ รวมทั้งโลหะหนักในสูตรมะนาวผง
2. เพื่อศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการมีชีวิตและการสร้างสารอนุมูลอิสระใน HK-2 cells
3. เพื่อศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการมีชีวิต และการสร้างสารอนุมูลอิสระใน COM-treated HK-2 cells
4. เพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลองของสูตรมะนาวผง
5. การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 เพื่อศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะ ความเป็นกรด-ด่างและระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะ รวมทั้งระดับตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น

ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษาระยะก่อนคลินิก (pre-clinical study) เป็นการศึกษาในเซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้น (HK-2 cell) และในหนูทดลอง (mice)
2. การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 ศึกษาในอาสาสมัครคนปกติสุขภาพดี ซึ่งเป็นประชากรไทย อาสาสมัครทุกคนจะเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัยด้วยความสมัครใจ และอาสาสมัครทุกคนจะได้รับการตรวจร่างกายทั่วไป และตรวจทางห้องปฏิบัติการ (CBC, BUN, creatinine, electrolytes, liver function test และ urinalysis) ก่อนเข้าร่วมการวิจัยว่ามีสุขภาพดี

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมือนั้นๆ
2. กลุ่มอาสาสมัครคนปกติที่เข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้คัดกรองจากประชากรไทยทั่วไป ซึ่งจะต้องมีสุขภาพดี จากผลการตรวจ kidney function test, liver function test, KUB plain x-ray, และ CBC profile

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัยและมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอมด้วยความสมัครใจภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้านรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ ค่า Median lethal dose (LD_{50}) ของสูตรมะนาวผง ต้องรายงานผลโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งการวิเคราะห์นี้ไม่ได้อยู่ในการควบคุมของผู้วิจัยโดยตรง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Nephrolithiasis หรือ Kidney stone หรือ Renal stone คือ โรคนิ่วในไต ซึ่งมีก้อนนิ่วอยู่บริเวณตำแหน่งกรวยไต (renal pelvis) และที่สูงกว่ากรวยไตขึ้นไป
2. Metabolic stone risk factors คือ ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของการเกิดนิ่ว เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ
3. Hypocitraturia คือ ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ เกณฑ์ปกติของการขับซิเทรตออกมาในปัสสาวะ ของประชากรไทย คือ 200 มิลลิกรัมต่อวัน
4. Hypokaliuria คือ ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ เกณฑ์ปกติของการขับโพแทสเซียมออกมาในปัสสาวะอยู่ที่ < 30 mEq/day
5. Hypokalemia/ potassium depletion คือ ภาวะโพแทสเซียมในเลือดต่ำ เกณฑ์ปกติของการขับโพแทสเซียมออกมาในเลือดอยู่ระหว่าง 3.5-5.0 mEq/L
6. Creatinine clearance คือ ความสามารถของไตในการขับ creatinine ออกจากร่างกาย เพื่อบอกประสิทธิภาพการทำงานของไต
7. Estimate glomerular filtration rate (eGFR) คือ ค่าประมาณอัตราการกรองของเลือดผ่าน glomerulus เพื่อบอกการทำงานของไต คำนวณจาก eGFR = 141 × min (Scr/K,1)$^{\alpha}$ × max(Scr/ K, 1) – 1.209 × 0.993^{Age} × 1.018 [if female] × 1.159 [if black] (16)
8. Oxidative Stress หรือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น คือ ภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ทำให้สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย ส่งผลให้ เซลล์เกิดการบาดเจ็บ (cell injury) และตาย (cell death) ตามมา

9. HK-2 Cell คือ cell line ของเซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้น (proximal tubular epithelial cell) จากมนุษย์
10. Calcium oxalate monohydrate (COM) คือ สารประกอบอินทรีย์ ที่ประกอบด้วย แคลเซียม ออกซาเลต และ น้ำ อย่างละ 1 โมเลกุล
11. Lime powder regimen คือ สูตรมะนาวผง ที่คิดค้นโดย ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุชาดา ไชยสวัสดิ์ และผลิตที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (วิทยาเขตบางขุนเทียน) โดยแปรรูปน้ำมะนาวและเติมสารให้มีปริมาณโพแทสเซียม 21 มิลลิอิควิวาเลนท์ และซิเทรต 63 มิลลิอิควิวาเลนท์ ต่อซอง (5 กรัม) และทำให้อยู่ในรูปของผงมะนาวโดยวิธีการอบแห้งแบบแช่แข็งหรือการอบแห้งโดยการระเหิด (freeze-dried method)
12. Phase 1 clinical trial คือ การศึกษาเบื้องต้นของยา เพื่อประเมินความปลอดภัยและผลต่อการตอบสนองของยา
13. Pharmacokinetics คือ การศึกษากระบวนการของร่างกายต่อการตอบสนองต่อยา เมื่อเปรียบเทียบกับเวลา หรือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยาในร่างกาย ณ เวลาต่างๆ ตั้งแต่กระบวนการ การดูดซึม (Absorption) , การกระจายยา (Distribution) , กระบวนการเผาผลาญ (Metabolism) และการขับยาออกจากร่างกาย (Excretion)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบองค์ประกอบทางยา ข้อมูลโภชนาการ และโปรไฟล์ของโลหะหลักในสูตรมะนาวผง
2. ทราบผลของมะนาวผงต่อการมีชีวิตและการสร้างสารอนุมูลอิสระใน HK-2 cells และ COM-treated HK-2 cells
3. ทราบผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะ ความเป็นกรด-ด่างและระดับสารก่อนิ่วในปัสสาวะ รวมทั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น
4. ทราบผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นกับอาสาสมัครสุขภาพดีระหว่างการได้รับสูตรมะนาวผง

วิธีดำเนินการวิจัย

ดำเนินการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ แร่ธาตุ และสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผงก่อน ทดสอบผลข้างเคียงของสูตรมะนาวผงต่อเซลล์บุท่อไต โดยดูจากการอัตราการ

อยู่รอด โดยวิธี (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay และวัดปริมาณการสร้าง ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยวิธี 2´,7´-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence assay ของเซลล์บุท่อไต และวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษในหนูถีบจักร โดยหาค่าครึ่งชีวิต หรือ LD_{50} จากนั้นดำเนินการวิจัยในอาสาสมัคร จำนวน 13 คน เพื่อศึกษาผล citraturic และ antioxidative responses ของสูตรมะนาวผง อาสาสมัครทุกคนได้รับการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะที่เวลา ต่างๆ สารตัวอย่างปัสสาวะจะนำมาวิเคราะห์ซิเทรต โพแทสเซียม สารต้านอนุมูลอิสระรวม และความเป็นกรดด่าง ส่วนสารตัวอย่างเลือดจะนำมาวิเคราะห์ ซิเทรต

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. เก็บสารตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ดำเนินการทดลอง รวมรวมข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง
2. จัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ และจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับภาษาอังกฤษ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อนำเสนอแบบ Poster Presentation ในงานการประชุมวิชาการนานาชาติทางชีวเคมี และชีววิทยาโมเลกุล ครั้งที่ 3 (The 3rd Biochemistry and Molecular Biology Conference) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 6-8 เมษายน 2554 ณ ดิเอ็มเพรส คอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ จ.เชียงใหม่ ในหัวเรื่อง “Lime powder regimen is a safe medicinal product for kidney stone treatment : pre-clinical and phase 1 clinical studies”

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคนิ่วไต (Nephrolithiasis)

Nepholithiasis เป็นโรคระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้บ่อยทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศแถบเขตร้อน ความชุกของโรคนิ่วไตในทวีปเอเชียพบประมาณ 1-5% ยุโรปประมาณ 5-9% และในอเมริกาเหนือพบได้ประมาณ 13% ประเทศที่มีรายงานว่ามีความชุกของโรคนิ่วสูงสุดคือประเทศซาอุดิอะราเบียพบได้สูงถึง 20% (17) สำหรับประเทศไทยมีความชุกการเป็นโรคนิ่วไตสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบประมาณ 10-17% (10) พบว่าความเสี่ยงของการเกิดนิ่วในตลอดอายุของผู้ใหญ่ (life time risk) สำหรับอายุเฉลี่ยที่พบโรคนิ่วไตอยู่ในช่วง 30-60 ปี โดยอายุเฉลี่ยของเพศชายที่พบนิ่วมากที่สุดประมาณ 35 ปี และเพศหญิงมี 2 ช่วง คือ อายุ 30 ปี และ 55 ปี และพบอุบัติการณ์ของนิ่วในเด็กต่ำกว่าผู้ใหญ่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเด็กมีปริมาณสารยับยั้งการเกิดนิ่วในปัสสาวะสูงกว่า และมีการขับแคลเซียมในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ใหญ่ และยังพบนิ่วในเพศชายสูงกว่าเพศหญิงประมาณ 2-3 เท่า ซึ่งมาจากผลของฮอร์โมน estrogen ในเพศหญิง เพิ่มการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะ ส่วนฮอร์โมน testosterone ในเพศชายจะเพิ่มการสร้างออกซาเลตในตับให้ขับออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น (10, 18, 19) ข้อมูลวิจัยในปัจจุบันพบว่าอุบัติการณ์ของโรคนิ่วมีแนวโน้มว่าสูงขึ้นทั่วทุกภูมิภาคของโลกรวมทั้งประเทศไทย (20) โรคนิ่วไตจึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรทั้งในวัยแรงงาน และผู้สูงอายุ ปัญหาสำคัญของโรคนิ่วไต คือ การเกิดนิ่วซ้ำภายหลังการรักษาทั้งด้วยวิธีสลายนิ่ว และการผ่าตัด รายงานวิจัยของ Koff SG และคณะ พบอัตราการกลับมาเป็นนิ่วซ้ำ 50% ภายใน 10 ปี(21) การเกิดนิ่วซ้ำจะทำให้เกิดพยาธิสภาพในเนื้อไตมากขึ้น เช่น การอักเสบ และการเกิดพังผืดในไต ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของไต หากเกิดนิ่วซ้ำบ่อยมากจะทำให้มีความผิดปกติของการทำงานของไตมาก ส่งผลให้เสี่ยงต่อการเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) และโรคไตระยะสุดท้าย (end stage renal disease) ตามมา

2.2 การจำแนกชนิดของนิ่ว (Classification of stones)

ชนิดของนิ่วไตจำแนกตามแร่ธาตุหรือผลึกที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในก้อนนิ่ว แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ

2.2.1 นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (calcium stones) ซึ่งเป็นนิ่วที่พบมากที่สุด ประมาณ 80% ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate : CaOx), นิ่วแคลเซียม

ฟอสเฟต (calcium phosphate : CaP), นิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟต และแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก (10, 22) รายงานวิจัยพบว่าชนิดของนิ่วที่พบมากที่สุดทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (10, 22) และผลึกนิ่วที่พบมากที่สุดที่เป็นองค์ประกอบของก้อนนิ่ว คือ calcium oxalate monohydrate (COM)

2.2.2 นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (non-calcium stones) พบประมาณ 20% ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (uric acid stone), นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือนิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนี่ยมฟอสเฟตหรือนิ่วสตรูไวท์ (struvite) และนิ่วซีสตีน (cystine stone) เป็นต้น ปัจจุบันพบแนวโน้มของการเกิดโรคนิ่วกรดยูริกมากขึ้นและสัมพันธ์กับโรคอ้วน และโรค metabolic syndrome (10)

2.3 ปัจจัยสาเหตุของการเกิดนิ่ว (Etiologies of stone disease)

โรคนิ่วไตส่วนใหญ่โดยเฉพาะนิ่วในผู้ใหญ่มีสาเหตุจากหลายปัจจัย (multifactorial causes) ส่วนน้อยที่มีสาเหตุโดยตรงจากพันธุกรรม (monogenic nephrolithiasis) ซึ่งมักพบในเด็ก เช่น นิ่วซีสตีนเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนขนส่งกรดอะมิโน cystine, ornithien, lysine และ arginine ปัจจัยสาเหตุของการเกิดนิ่วแบ่งได้เป็น

2.3.1 ปัจจัยภายใน (intrinsic risk factors) เช่น พันธุกรรม กายวิภาคของไต เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย และเชื้อชาติ เป็นต้น เป็นปัจจัยพื้นฐานในแต่ละคนที่มีส่วนเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วไต ยกตัวอย่างเช่น ภาวะน้ำหนักเกิน (overweight) ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดนิ่วกรดยูริกมากขึ้น และมีรายงานว่าคนผิวขาวเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วมากกว่าคนผิวดำ (23)

2.3.2 ปัจจัยภายนอก (extrinsic risk factors) เช่น อาหาร ภูมิอากาศ อาชีพ ยา และความเครียด เป็นต้น เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมหรือเอื้อต่อการเกิดผลึกนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะนำไปสู่การเกิดนิ่วในที่สุด เช่น การรับประทานอาหารที่มีออกซาเลตสูงเป็นประจำ ทำงานในที่โล่งแจ้งสูญเสียเหงื่อมากและดื่มน้ำไม่เพียงพอ ในฤดูร้อนจะมีผู้ป่วยโรคนิ่วมากกว่าในฤดูหนาว (24) เป็นต้น

ทั้งปัจจัยเสี่ยงภายในและภายนอกจะทำให้เกิดความไม่สมดุลของสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ และส่งเสริมให้ปัสสาวะมีความอิ่มตัวของสารก่อนิ่วสูงขึ้น เรียกว่า ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิก (metabolic risk factor) หรือ มีความผิดปกติทางเมแทบอลิก (metabolic abnormality) ซึ่งอาจเกิดจากสารก่อนิ่ว เช่น แคลเซียม ออกซาเลต ยูเรต และฟอสเฟต ในปัสสาวะมีปริมาณมากขึ้น หรือมีระดับของสารยับยั้งนิ่ว เช่น ซิเทรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม ไพโรฟอสเฟต และไกลโคอะมิโนไกลแคน มีปริมาณน้อยลง ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคนิ่วไต เช่น ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง

(hypercalciuria) ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (hyperuricosuria) ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) และภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) เป็นต้น

2.4 กลไกการเกิดนิ่วไตในระบบทางเดินปัสสาวะ

กลไกการเกิดนิ่วไตในระบบทางเดินปัสสาวะ เริ่มต้นจากการมีปริมาณสารก่อนิ่วในปัสสาวะสูงมาก หรือมีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะน้อย ทำให้ปัสสาวะเกิดการอิ่มตัวอย่างยิ่งยวด (supersaturation) ของสารก่อนิ่ว ส่งผลให้เกิดการตกผลึกของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ เช่น ผลึก CaOx และ CaP เป็นจำนวนมาก ผลึกเจริญใหญ่ขึ้น (crystal growth) และรวมตัวกันมากขึ้น (crystal aggregation) ซึ่งผลึกนิ่วเหล่านี้จะกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระในเซลล์บุผิวท่อไต ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ส่งผลให้เกิดการทำลายและการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไต (renal tubular cell injury) ซึ่งบริเวณที่เซลล์ถูกทำลายจะเป็นแหล่งเกาะยึดของผลึกขนาดเล็กที่อยู่ในปัสสาวะ (crystal adhesion) และผลึกจะติดค้างในเนื้อไต (crystal retention) เมื่อผลึกเหล่านี้เกาะรวมกันมากขึ้นจะเกิดเป็นแกนนิวเคลียสขนาดเล็ก (stone nidus) ซึ่งจะมีเป็นตำแหน่งเริ่มต้นให้ผลึกเกาะกลุ่มรวมตัวกันมากขึ้น จนกระทั่งเจริญเติบโตเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและกลายเป็นก้อนนิ่ว (stones/calculi) ในที่สุด (4) (ภาพที่ 1) การศึกษาของ Khan และคณะ(25) ในหนู rats เพศผู้ ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดนิ่ว CaOx โดยให้ 0.75% ethylene glycol และ 2% ammonium chloride นาน 8 สัปดาห์ พบว่าในปัสสาวะหนูมีผลึกออกมามากขึ้น (crystalluria) ตามระยะเวลาที่กระตุ้นให้เกิดนิ่ว นอกจากนี้เมื่อนำเนื้อเยื่อไตดูผ่านกล้องจุลทรรศ์พบผลึกนิ่วในเนื้อเยื่อไต ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) มีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์บุท่อไต อันเป็นผลทำให้เกิดโรคนิ่วไตตามมา

2.5 ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (Oxidative stress)

สารก่อนิ่วและผลึกสามารถกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น Reactive oxygen species (ROS) มากขึ้น ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น การศึกษาของ Habibzadegah-Tari และคณะรายงานว่า ผลึก CaOx กระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) สังเคราะห์ ROS เพิ่มมากขึ้น (26) ซึ่ง ROS ที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ โดยเฉพาะกับไขมันในเซลล์ (lipid peroxidation) ทำให้เกิดการทำลายของชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์บุท่อไต(27) นอกจากนี้ ROS ยังเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น กับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ได้อีก เช่น โปรตีน ดีเอ็นเอ และสารอื่นๆ ในเซลล์ ซึ่งส่งเสริมการทำลายและการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไต งานวิจัยของ Boonla และคณะ(28) ศึกษาระดับการขับออกของ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าในปัสสาวะของ

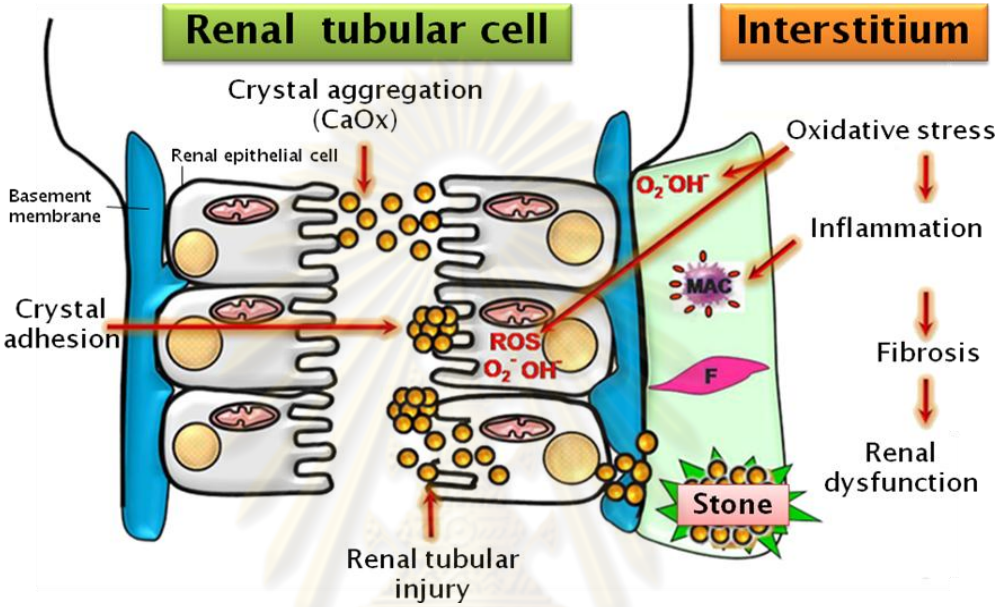
ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ 8-OHdG สูงกว่ากลุ่มคนปกติ ซึ่งปริมาณของ 8-OHdG ที่สูงในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต แสดงให้เห็นถึงการทำลาย DNA จากภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (oxidative DNA damage) นอกจากนี้ปริมาณของ 8-OHdG ในปัสสาวะที่สูงขึ้นยังมีความสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของท่อไตที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงให้เห็นทางคลินิกว่าโรคนิ่วสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตที่สูงขึ้น ดังนั้น ในการรักษาโรคนิ่วไตจึงควรหายาที่สามารถลดระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นในผู้ป่วยควบคู่ไปด้วย

2.6 การอักเสบ และการเกิดพังผืดในไต (Inflammation and tubulointerstital fibrosis)

โดยกลไกการป้องกันของร่างกาย (innate defense mechanism) ผลึกนิ่วที่เกิดขึ้นในปัสสาวะ จะถูกนำเข้าเซลล์บุท่อไตและถูกย่อยสลายโดยไลโซโซม หากผลึกมีปริมาณมาก (chronic crystal overload) จะถูกส่งต่อไปยัง renal interstitium ทำให้เกิดกลุ่มผลึกในเนื้อไต (interstitial nephrocalcinosis หรือ Randall's plaques) ผลึกนิ่วปริมาณมากสามารถกระตุ้นเซลล์บุผิวท่อไตให้หลั่งสาร เพื่อไปดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ monocytes เข้ามากำจัดผลึกนิ่ว ทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ (inflammation) และส่งผลให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตและเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มการสังเคราะห์สารตัวกลางของการอักเสบมากขึ้น เช่น monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), interleukin (IL-6), prostaglandin E_2 และ osteopontin เป็นต้น(29) หลายงานวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ที่กระตุ้นเซลล์ด้วยผลึก COM พบว่า มีการแสดงออกของ MCP-1 มากขึ้น และเมื่อมีปริมาณของ COM มากขึ้น เซลล์บุท่อไตจะถูกทำลายมากขึ้น(26, 30-32) การศึกษาในสัตว์ทดลองโดย De Water และคณะ(33) พบว่าผลึกนิ่วเกิดขึ้นในท่อไต จะเคลื่อนเข้าสู่ renal interstitium เพื่อดึงดูดเซลล์อักเสบต่างๆ เข้ามาใน intersitium ส่งผลกระตุ้นการอักเสบ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะหลั่ง chemokines และ cytokines ทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น และเซลล์บุท่อไตถูกทำลายมากขึ้น ทำให้ไตสูญเสียหน้าที่ ดังนั้นการเกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเกิดการบาดเจ็บและเกิดภาวะอักเสบรวมทั้งกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมโดยเฉพาะส่วนที่มีผลึกเกาะและเนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการเสียหายมาก ส่งผลให้เกิดพังผืด (fibrosis) ในที่สุด(34)

กระบวนการเกิดพังผืด (fibrogenesis) เกิดจากการกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อมากเกินไป (failure of wound-healing process) จนเกิดการสร้าง extracellular matrix proteins (ECM) เช่น collages, fibronectins มากเกินไป และเกิดเป็นพังผืดหรือแผลเป็นขึ้น (scarring formation) โดยปกติแล้วการสร้าง และการสลาย ECM จะเกิดขึ้นอย่างสมดุล ถ้าหากมีการสะสมมากไปจะทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อผิดปกติไป การเกิดพังผืดนี้มักจะเกิดขึ้นเสมอภายหลังการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) และมี cytokines หลายชนิดมีฤทธิ์กระตุ้น

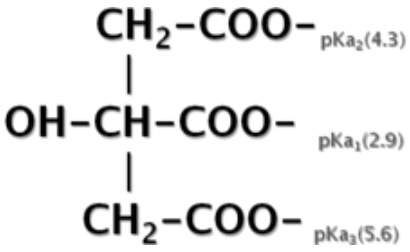
กระบวนการเกิดพังผืด ซึ่งเมื่อเกิดพังผืดในเนื้อไตมาก จะทำให้หน่วยไต (nephrons) ถูกทำลายจนไม่สามารถทำหน้าที่ปกติได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตเสื่อมลง การศึกษาของ Boonla และคณะพบการอักเสบและพังผืดเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตไทย(35) และพบว่าระดับการเกิดพังผืดที่มากขึ้นสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่เสื่อมลง(36) ทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วซ้ำและภาวะไตวายเรื้อรัง



ภาพที่ 1 สรุปกลไก และกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนิ่วไต

2.7 ความสำคัญของซิเทรต และการรักษาโรคนิ่วไต

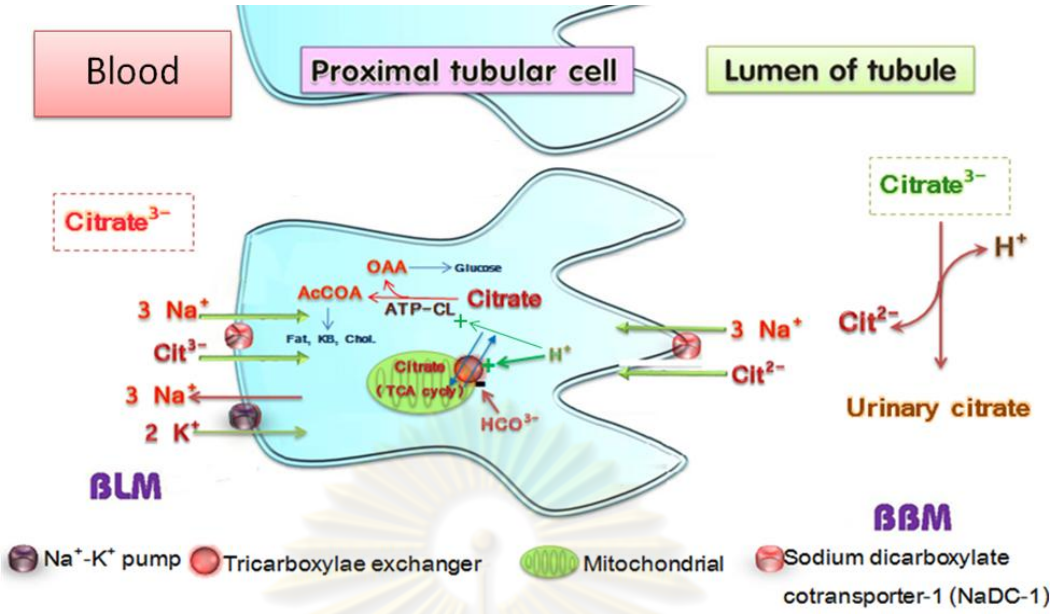
ซิเทรตหรือกรดซิทริก มีน้ำหนักโมเลกุล 192 ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic acid group,-COOH) 3 หมู่ (tricarboxylic acid) ซึ่งแต่ละหมู่จะมีค่าการแตกตัว (pK_a) ไม่เท่ากัน (ภาพที่ 2) ดังนั้นในของเหลว ของร่างกายหรือในพลาสมาซึ่งมี pH = 7.4 กรดซิตริกจึงอยู่ในสภาพที่แตกตัวเต็มที่ให้ 3 ประจุลบ เป็น Cit^{3-} สามารถจับรวมกับสารประจุบวกต่างๆ ในของเหลวของร่างกาย ได้แก่ แคลเซียม (Ca), โซเดียม (Na), แมกนีเซียม (Mg) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และละลายน้ำได้ดี ทำให้มีบทบาทเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่สำคัญในระบบทางเดินปัสสาวะ นอกจากนี้ซิเทรตยังเป็นสารที่มีความสำคัญยิ่งต่อการผลิตพลังงาน (ATP) จากอาหารต่างๆ โดยเป็นสารตัวแรกที่สร้างขึ้นในวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันระหว่างสารออกซาโลอะซิเทรต (oxaloacetate, OAA) กับอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) และเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ citrate synthase (CS) ในไมโตรคอนเดีย (mitochondria)



ภาพที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างซิเทรต

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นถึงความสำคัญของซิเทรต ดังนั้นหากร่างกายเกิดภาวะต่างๆ ผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับสมดุลของสารซิเทรต ก็ส่งผลให้เกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitaturia) ได้ เช่น ภาวะพร่องโพแทสเซียม ทำให้ไปยับยั้งการทำงานของ Na^+-K^+ pump ที่ทำหน้าที่ขนส่งโพแทสเซียมเข้าเซลล์แลกกับการขนโซเดียมออกจากเซลล์ ส่งผลทำให้ระดับโพแทสเซียมภายในเซลล์ต่ำ ทำให้เกิดภาวะความเป็นกรดภายในเซลล์มากเกิน ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ tricarboxylate exchanger, TE (ซึ่งจะทำงานได้ดีในสภาวะที่ภายในเซลล์มีความเป็นกรดมาก หรือมี H^+ มาก) ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งซิเทรตที่อยู่ในไซโตพลาสซึมเข้าไมโตรคอนเดียเปลี่ยนเป็นพลังงานต่อไป ดังนั้นจึงทำให้เกิดการดึงเอาซิเทรตจาก tubular lumen กลับเข้าเซลล์มากขึ้น (reabsorption) ส่งผลทำให้ซิเทรตในปัสสาวะลดลง เกิดภาวะ hypocitaturia ตามมา นอกจากภาวะขาดโพแทสเซียมแล้ว การเกิดภาวะท้องเสีย (diarrhea or malabsorption) ที่สูญเสีย bicarbonate (ซึ่งจะคอยยับยั้งการทำงานของ TE เพื่อเป็นการรักษาสมดุลของซิเทรตภายในไซโตพลาสซึมไม่ให้มีการขนส่งซิเทรตเข้ามามากเกินไป) การออกกำลังกาย หรือภาวะ acidosis ที่ทำให้เกิดภาวะความเป็นกรดภายในเซลล์มากก็ส่งผลต่อการเกิดภาวะ hypocitrauria เช่นกัน (ภาพที่ 3) ซึ่งมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่างซิเทรต และโพแทสเซียมในปัสสาวะ พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตทางภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย มีภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำร่วมกับการมีภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำร่วมด้วย(37) ซึ่งปัจจุบันได้มียาที่ให้ยาโพแทสเซียมซิเทรตรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต ดังจะกล่าวต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 แสดงกลไกการดูดซึมของซิเทรตเข้าสู่เซลล์ในสภาวะปกติ

การรักษาโรคนิ่ว แบ่งเป็นการรักษาทางศัลยกรรม (surgical therapy) และการรักษาทางยา (medical therapy) ร่วมกับการให้คำแนะนำในการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำเนินชีวิตและการบริโภคอาหาร (lifestyle modification) การรักษาทางศัลยกรรมที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เช่น การใช้คลื่นเสียงกระแทกพลังงานสูง (extracorporeal shockwave lithotripsy; SWL) การผ่าตัดผ่านกล้องส่องเข้าสู่ไตผ่านทางผิวหนัง (percutaneous nephrolithotripsy; PCNL) การใช้กล้องส่องผ่านทางกระเพาะปัสสาวะเข้าสู่ท่อไต (ureterorenoscopic stone removal ; URS) และการเปิดผ่าตัด (open stone surgery; OSS) เนื่องจากการรักษาทางศัลยกรรมนั้นเป็นการรักษาอาการของนิ่ว (symptomatic treatment) ไม่ได้ครอบคลุมไปถึงการรักษาสาเหตุความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม (causative treatment) ทำให้ยังเกิดปัญหาการเป็นนิ่วซ้ำสูง(21) ดังนั้น เพื่อลดโอกาสการเกิดนิ่วซ้ำ จึงต้องให้การรักษาทางยาร่วมด้วย เพื่อแก้ไขภาวะผิดปกติทางเมแทบอลิซึม

กลไกการดูดซึมของซิเทรตจากทางเดินอาหารยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าระดับของซิเทรตในปัสสาวะมีค่าสูงกว่าในเลือด ซิเทรตในพลาสมาที่ได้จากการดูดซึมที่ลำไส้จะถูกไตใช้มากที่สุด รองมาเป็นตับ โดยพบว่าปริมาณของพลาสมาซิเทรตในสัตว์ที่ถูกผ่าตัดเอาไตออกจะเพิ่มขึ้นทันที(38) รายงานการศึกษาวิจัยของ Sakhaee และคณะ(39) ได้ทดลองให้คนปกติรับประทานกรดซิทริก 40 มิลลิอิควิวาเลนท์ครั้งเดียว พบว่า ภายใน 30 นาที ระดับซิเทรตในซีรัมจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีระดับเพิ่มสูงสุดที่ 1 ชั่วโมง และลดลงสู่ระดับปกติภายใน 4 ชั่วโมง โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ pH ตลอดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่ามีเพียงร้อยละ 10 ของซิเทรตที่ให้รับประทาน ถูกขับออกมาในปัสสาวะโดยตรงโดยไม่ถูกเมแทบอไลซ์

การศึกษาของ Soygur และคณะ(40) โดยให้ potassium citrate กับผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาด้วยวิธี SWL ขนาดรับประทาน potassium citrate 60 มิลลิอิควิวาเลนท์ ต่อวัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับ potassium citrate มีค่าซิเทรตในปัสสาวะโดยเฉลี่ยเท่ากับ 115% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรตในปัสสาวะ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยว่า การบริโภคผลไม้กลุ่ม citrus fruits สามารถช่วยลดโอกาสการเกิดนิ่วได้(1, 41) เนื่องจากผลไม้กลุ่มนี้มีสารยับยั้งนิ่ว โดยเฉพาะ ซิเทรต ปริมาณมาก สามารถลดความอิ่มตัวของปัสสาวะและลดโอกาสการเกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะได้ นอกจากนี้ในผลไม้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น vitamin C, vitamin E, beta–carotenes, polyphenols และ flavonoids เป็นต้น ซึ่งช่วยป้องกันการทำลายของเซลล์บุท่อไตจากภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น Marc และคณะ(1) ได้ศึกษาผลของน้ำมะนาว (lemonade) ต่อการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตชนิดแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ จำนวน 12 ราย ที่มีภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitrauria) โดยให้รับประทานน้ำมะนาว (5.9 กรัม หรือ 84 มิลลิอิควิวาเลนท์ ของ citric acid) ผสมกับน้ำ รวมปริมาตร 2 ลิตร ทุกวันตลอด 1 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยจำนวน 11 ราย มีระดับซิเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น และระดับของแคลเซียมในปัสสาวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลไม้ที่มีปริมาณซิเทรตมาก คือ มะนาว โดยมีระดับของซิเทรต เท่ากับ 49.2 กรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเทียบกับผลไม้ชนิดอื่น(1)(ตารางที่ 1) การศึกษาของ Touhami และคณะ(42) ในหนู rats ที่กระตุ้นให้เกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะโดย ethylene glycol ร่วมกับได้รับน้ำมะนาวนาน 10 วัน พบว่า การติดค้างของผลึกนิ่วลดลง การเกิด peroxidative injury ลดลง และยังช่วยปรับสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อเร็วๆ นี้การศึกษา Tosukhowong และคณะ(13) พบว่าการให้ผู้ป่วยโรคนิ่วไตหลังผ่าตัด (n=13) ได้รับประทานสูตรมะนาวผง ที่มีโพแทสเซียม 21 มิลลิอิควิวาเลนท์ ต่อซิเทรต 63 มิลลิอิควิวาเลนท์ต่อวัน (รับประทานโดยละลายสูตรมะนาวผง 1 ซองในน้ำ 1 แก้ว หรือ 200 มิลลิลิตร ดื่มประจำทุกวัน) เป็นระยะเวลา 3 เดือน มีประสิทธิภาพทางยาเทียบเท่ากับยาโพแทสเซียมซิเทรต เนื่องจากทำให้มีระดับของซิเทรตในปัสสาวะเพิ่มขึ้น (citraturic effect) และปัสสาวะเป็นด่างมากขึ้นหรือมีการเพิ่มขึ้นของค่า pH (alkalinizing action) นอกจากนี้ยังมีระดับของสารยับยั้งการก่อนิ่วอื่นในปัสสาวะสูงขึ้น และยังพบว่ายาสูตรมะนาวผง ช่วยลดการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น และการทำลายของเซลล์บุท่อไต (antioxidative action) ส่งผลทำให้แนวโน้มการทำงานของไตดีขึ้น ข้อดีอีกอย่างหนึ่งที่เหนือกว่ายาโพแทสเซียมซิเทรต คือ ไม่พบผลข้างเคียงจากการใช้ยาสูตรมะนาวผง ดังนั้นคณะวิจัยตั้งสมมุติฐานว่ายาสูตรมะนาวผงน่าจะนำมาใช้ในการรักษาโรคนิ่วไตของไทยได้ อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในผู้ป่วยไทยทั่วประเทศ จำเป็นต้องศึกษาถึงระดับความเป็นพิษของยาสูตรมะนาวผงทั้งในระดับเซลล์และ

สัตว์ทดลอง รวมทั้งต้องศึกษารูปแบบ citraturic response และผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นในอาสาสมัครคนปกติ

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของผลไม้กลุ่ม Citrus fruits(1)

	Content/Kg.				
	Citric acid (gm.)	Potassium (gm.)	Calcium (mg.)	Sodium (mg.)	Magnesium (mg.)
Orange	10.6	1.77	420	14	140
Grapefruit	13.7	1.80	180	16	130
Lemon	49.2	1.49	110	27	280
Raspberry	17.2	1.70	400	0	300
Pineapple	6.3	1.73	160	21	170
Cranberry	11.0	0.72	140	20	55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

การศึกษาในอาสาสมัครปกติ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะ ความเป็นกรด-ด่าง และระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะ รวมทั้งระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ภายหลังการได้รับสูตรมะนาวผง มีเกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria) และ เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ดังนี้

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria)

- อาสาสมัครเพศชายและหญิง อายุระหว่าง 18-45 ปี
- ดัชนีมวลกาย 18-25 kg/m^2
- สุขภาพดี ผ่านการตรวจสอบประวัติการใช้ยา การตรวจร่างกาย และ vital sign
- ผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการคลินิกเป็นปกติ
- ไม่มีประวัติแพ้ยา
- เข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจ และลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม

อาสาสมัครที่ให้ความยินยอมจะได้รับการตรวจคัดกรอง เพื่อดูว่ามีคุณสมบัติเหมาะสมตามเกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมการศึกษาวิจัย การตรวจคัดกรองประกอบด้วย การตรวจร่างกาย การซักประวัติ ตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการคลินิก ได้แก่ complete blood count (with differentials), fasting blood sugar, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin, total protein, albumin, HBs-antigen, anti-HIV และ urinalysis อาสาสมัครเพศหญิงจะได้รับการตรวจ Urine pregnancy test ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria)

- มีประวัติแพ้ยา
- มีประวัติป่วยเป็นโรคระบบทางเดินอาหาร โรคตับ โรคไต โรคภูมิแพ้ หรือโรคอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อ bioavailability ของสูตรมะนาวผง
- มีประวัติดื่มสุราเป็นประจำ และมีการใช้สารเสพติด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- มีประวัติสูบบุหรี่เป็นประจำ (มากกว่า 10 มวนต่อวัน) หรือหากมีการสูบบุหรี่ปานกลาง (น้อยกว่า 10 มวนต่อวัน) แต่ไม่สามารถอดการสูบบุหรี่ได้ก่อนเริ่มการศึกษาและระหว่างการศึกษา
- ได้รับการรักษาโรคด้วยยาใดๆ ภายใน 14 วันก่อนเริ่มการศึกษา
- เคยเข้าร่วมการทดลองการศึกษาทางคลินิกอื่นๆ ภายใน 1 เดือนก่อนเริ่มการศึกษา

ขนาดประชากรตัวอย่าง (sample size)

การศึกษาในอาสาสมัครปกติจำนวน 13 คน จำนวนประชากรที่ศึกษาอ้างอิงตามจำนวนประชากรที่ใช้ในการศึกษา Phase I clinical trial(43)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 2 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	**ผลิตภัณฑ์ของ** (Product of)
1. Autoclave	HVE-25, Dublin, Ireland
2. Autopipette 10, 100, 200, 1000 µl และ tips	Biorad, California, USA
3. Class II biohazard safety cabinet	Thermo Fisher Scientific, Ohio, USA
4. CO_2 Incubator	Thermo Scientific, Ohio, USA
5. Cryotube	Corning, New York, USA
6. Cuvettes (Plastic and Quartz)	Perkin Elmer, USA
7. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Scientific, Ohio, USA
8. Fluorescence plate reader	Biotek, USA
9. Freezer (-80°C)	Thermo Scientific, Ohio, USA
10. High performance liquid chromatography	Jasco, Japan
11. HPLC Columns (Prevail C18 5µ 150 mm x 4.6 mm)	GRACE, -
12. Inductively coupled plasma optical	Optima2100, Perkin Elmer, USA

emission spectroscopy (ICP-OES)	
13. Mebranes filter nylon 47 mm. 0.22µm.	Ageia Technologies, USA
14. Microcentrifuge	Centrifuge, Japan
15. Microplate reader	BioTek, Vermont, USA
16. pH meter	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
17. Sonicator	-
18. Spectrophotometer	Thermo Scientific, Ohio, USA
19. Spectrophotometer	Thermo sciencitific, USA
20. Syringe filter nylon 13mm. 0.22µm.	Ageia Technologies, USA
21. Tissue culture flasks 25 cm^2	Corning , New York, USA
22. Tissue culture flasks 75 cm^2	Corning, New York, USA
23. Tissue culture plates: 6-,24-,96-well	Corning, New York, USA
24. Water bath	GFL, Burgwedel, Germany

สารเคมี (Chemical substance)	**ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)**
1. 2-amino-2methyl-proponal buffer	SIGMA,Steinheim, Germany
2. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	SIGMA,Steinheim,Germany
3. 6-carboxy-2´,7´-dichlorodihydrofluo-rescein diacetate (DCFH-DA)	Molecular probes
4. Calcium oxalate monohydrate	MERK, Darmstadt, Germany
5. Citrate lyase	SIGMA,Steinheim,Germany
6. Citric acid	MERK, Darmstadt, Germany
7. DMSO (Dimethyl sulfoxide)	CARLO ERBA, Italy
8. Ethanol	Hyclone Laboratories,Inc., Utah, USA
9. Fetal bovine serum	MERK, Darmstadt, Germany
10. Hydrochloric acid	SIGMA,Steinheim, Germany
11. Lactate dehydrogenase	Mallinckrodt, Hazelwood, Unitate State
12. Malate dehydrogenase	SIGMA,Steinheim, Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. N-acetyl glucosaminidase substrate	MERK, Darmstadt, Germany
14. NADH	SIGMA,Steinheim, Germany
15. Orthophosphoric acid	MERK, Darmstadt, Germany
16. Oxalic acid	MERK, Darmstadt, Germany
17. PBS (phosphate buffer saline)	MERK, Darmstadt, Germany
18. Penicillin-Streptomycin solution	SIGMA,Steinheim, Germany
19. Picric acid	-
20. Potassium dihydrogen phosphate	SIGMA,Steinheim, Germany
21. Sodium chloride	MERK, Darmstadt, Germany
22. Thymol	MERK, Darmstadt, Germany
23. Trypan blue	SIGMA,Steinheim, Germany
24. Trypsin/ EDTA	Analytical reagent,Haryana, India

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. วิธีวิเคราะห์สารตัวอย่างในเลือด และปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี

ก่อนเข้าร่วมการวิจัยอาสาสมัครสุขภาพดีจะได้รับคำแนะนำการบริโภคอาหารที่มีซิเทรต และโพแทสเซียมต่ำ พร้อมบันทึกข้อมูลการบริโภคอาหารประจำวันตลอด 1 สัปดาห์จากนั้นอาสาสมัครทั้งหมดจะเข้ามาอยู่ที่ศูนย์ Chula Clinical Research Center, CRC คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 3 วัน เพื่อบริโภคอาหารแบบเดียวกันและจำกัดอาหารที่มี citrate และ potassium พร้อมงดอาหารหลัง 21.00 น. โดยไม่ต้องงดน้ำ ซึ่งอาสาสมัครทุกคนจะได้รับประทานอาหารที่จัดเตรียมไว้ให้ภายหลังจาก dosing แล้วที่ 4 ชั่วโมง และ 10 ชั่วโมง โดยอาสาสมัครทุกรายจะได้รับอาหารที่เหมือนกัน และในช่วงระยะเวลาที่เข้ามาพักที่ CRC อาสาสมัครจะเก็บตัวอย่างเลือด และปัสสาวะดังนี้

1.1 วิธีการเก็บสารตัวอย่างเลือด

1.1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดวันที่ 1 (control day) จะเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะที่หลอดเลือดดำบริเวณแขนครั้งละประมาณ 7 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 5, และ 10 ชั่วโมง โดยเก็บลงในหลอดสูญญากาศที่เคลือบด้วย heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด ตัวอย่างเลือดจะนำมาปั่นแยกเอาพลาสมาออกมา และเก็บแยกไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งถึงเวลาวิเคราะห์

1.1.2 การเก็บตัวอย่างเลือดวันที่ 2 (LPR day) อาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือดที่เวลาต่างๆ เหมือนในวันที่ 1 (control day) ภายหลังจากได้รับสูตรมะนาวผง โดยเก็บลงในหลอดสูญญากาศที่เคลือบด้วย EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด ตัวอย่างเลือดจะนำมาปั่นแยกเอาพลาสมาออกมา และเก็บแยกไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งถึงเวลาวิเคราะห์

1.2 วิธีการเก็บสารตัวอย่างปัสสาวะ

1.2.1 การเก็บปัสสาวะของวันที่ 1 อาสาสมัครทุกคนจะต้องปัสสาวะทิ้งทั้งหมดเพื่อทำให้กระเพาะปัสสาวะว่าง (โดยปัสสาวะนี้เป็นจะเป็นที่เวลา 0 นาที) และดื่มน้ำ 500 มิลลิลิตรทันที จากนั้นจะทำการเก็บปัสสาวะที่เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมดจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนถึงเวลาวิเคราะห์

1.2.2 การเก็บปัสสาวะของวันที่ 2 จะเก็บที่เวลาต่างๆ เหมือนกัน กับวันที่ 1 เปลี่ยนจากการดื่มน้ำ เป็นดื่มน้ำ 200 มิลลิลิตรต่อสูตรมะนาวผง 1 ซองโดยตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมดจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนถึงเวลาวิเคราะห์

2. วิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญในสูตรมะนาวผง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการในสูตรมะนาวผง ได้แก่ โปรตีน (ตามหลักการ Block digestion method), ไขมัน (ใช้หลักการ Acid hydrolysis), คาร์โบไฮเดรต (ตามหลักการ Carpenter Method) และพลังงาน (ตามหลักการ Carpenter Method) โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ห้องปฏิบัติการและวิจัยทางการแพทย์และการเกษตรแห่งเอเชีย (Asia Medical and Agricultural Laboratory and Research Center, AMARC) ซึ่งได้รับการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (Accredited Laboratory Complying with the ISO/IEC 17025 : 2005, Accreditation Number 1124/50) จากกระทรวงสาธารณสุข

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ และสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง และสารตัวอย่างปัสสาวะ

การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ และสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง และสารตัวอย่างปัสสาวะด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) โดยการนำสูตรมะนาวผงที่ละลายในน้ำกลั่น 200 ml เจือจางในอัตราส่วน 1:5 ด้วยน้ำกลั่น สำหรับสารตัวอย่างปัสสาวะเจือจางในอัตราส่วนเท่ากัน (1:5) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ และสารโลหะหนักด้วยเครื่อง ICP-OES (Optima 2100, Perkin Elmer, USA) โดยกำหนดให้สภาวะเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นดังนี้

RF Power	: 1400 W
Plasma / Aux. / Neb. Flow	: 15 / 0.5 / 0.40 L/min
Plasma Viewing	: Axial view
Sample flow rate	: 1.5 ml/min.
Read Time	: Min 5 sec, Max 5 sec
Read Delay	: 10 sec.
Flush Time	: 0 sec.
Analyze	: - Antimony (44) at wavelength 193.696 nm
	- Arsenic (As) at wavelength 206.836 nm
	- Calcium (Ca) at wavelength 317.933 nm
	- Cadmium (Cd) at wavelength 228.802 nm
	- Chromium (Cr) at wavelength 267.716 nm
	- Cobalt (Co) at wavelength 228.616 nm
	- Copper (Cu) at wavelength 327.393 nm
	- Iron (Fe) at wavelength 238.204 nm
	- Lead (Pb) at wavelength 220.353 nm
	- Magnesium (Mg) at wavelength 285.213 nm
	- Manganese (Mn) at wavelength 257.610 nm
	- Nickel (Ni) at wavelength 231.604 nm
	- Selenium (Se) at wavelength 196.026 nm
	- Vanadium (V) at wavelength 292.464 nm
	- Zinc (Zn) at wavelength 206.200 nm

2.3 การวิเคราะห์ Oxalate depletion ในหลอดทดลอง

หลักการของ Oxalate depletion ซึ่งอ้างอิงวิธีการทดลองจากงานวิจัยของ Chutipongtanate และคณะ (45) เพื่อดูประสิทธิภาพการลดอัตราการเกิดผลึก (crystal growth) ของซิเทรต โดยดูจากปริมาณของออกซาเลตอิสระ (free oxalate) ที่เหลืออยู่ในหลอดทดลอง จากคุณสมบัติของซิเทรตที่สามารถจับกับแคลเซียมได้ ทำให้ออกซาเลตไม่สามารถจับกับแคลเซียมได้ ดังนั้นถ้าหากปริมาณของ free oxalate มาก บ่งชี้ถึงการจับกันระหว่างซิเทรตกับแคลเซียมได้มาก โดยการวัด free oxalate จะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 241 nm. ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อ คือ ใส่สารละลาย 2 mM calcium chloride ($CaCl_2$) + 2 mM sodium oxalate (NaOx) อย่างละ 0.5 ml

ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใส่สารละลาย 15 µg/µl COM 10 µl ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงใส่น้ำกลั่น (หลอดควบคุม) หรือ ใส่ LPR 0.02, 0.1, 0.2, 1 และ 2 mg/ml (หลอดทดลอง) 100 µl ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 214 nm. ทุก 5 นาที ตลอดจนครบ 60 นาที โดยค่าที่ได้นำมาคำนวณเป็น %oxalate reduction เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

2.4 การวิเคราะห์การมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวิธี MTT assay

หลักการของการวิเคราะห์ cell viability โดยใช้วิธี MTT assay เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโตคอนเดรีย เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะมีเอนไซม์นี้ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยน MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองให้เป็น formazan salt ที่มีสีม่วง โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อ คือ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แต่ละหลุมมีเซลล์เริ่มต้นที่ 10,000 เซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) จากนั้นใส่สารละลายสูตรมะนาวผงตามความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mg% (dose dependent) และสารละลาย COM ที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 µg/cm^2 แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C, 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงไป 100 µl. และเขย่า 5-10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) สำหรับ time dependent เลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม แล้วเติมสารละลายสูตรมะนาวผงที่ความเข้มข้นเหมือน dose dependent แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารละลาย DMSO ลงไป 100 µl. จากนั้นเขย่า 5-10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)
การคำนวณหา % cell viability คำนวณดังนี้

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{(OD_{test} \times 100)}{OD_{control}}$$

OD_{test} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่ตัวอย่างสูตรมะนาวผง

$OD_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ไม่ใส่สูตรมะนาวผง

2.5 การวิเคราะห์การสร้าง ROS ในเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ 2,7-dichloro-dihydrofluorescin diacetate (DCFH-DA)

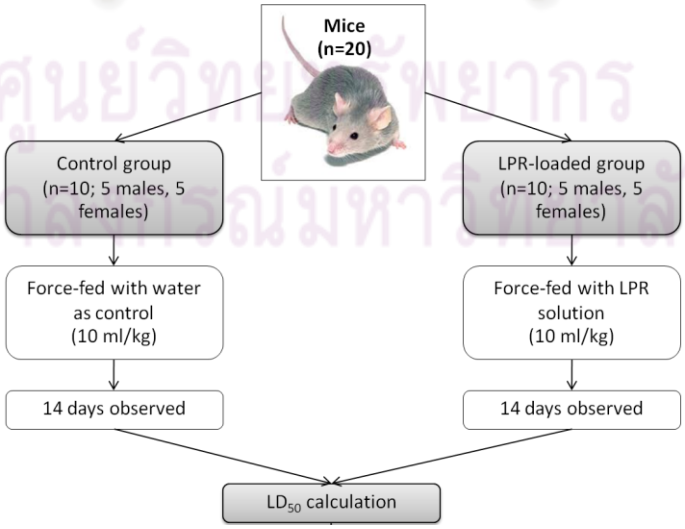
หลักการวัดปริมาณการสร้าง ROS โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ DCFH-DA คือ ROS ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์จะทำปฏิกิริยากับ DCFH-DA และเปลี่ยนไปเป็น DCF (dichloro-dihydrofluorescin) ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณของ ROS ในเซลล์ ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อ เป็นดังนี้ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์สีดำขนาด 96 หลุม (96-wells black plate) ให้เจริญเติบโตได้ประมาณ 80% confluence แล้วเติมสารละลาย 0.1 mM DCFH-DA ที่ละลายด้วย DMEM serum-free หลุมละ 100 µl. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่สารละลายสูตรมะนาวผงที่ความเข้มข้น เข้มข้น 0, 10, 50, และ100 mg% และสารละลายผลึก COM ที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 µg/cm^2 จากนั้นนำไปวัด fluorescent intensity ที่เวลา 0 นาที และ 60 นาที โดยกำหนด excitation ที่ 485 nm และ emission ที่ 535 nm

การคำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) คำนวณได้ดังนี้

$$AFU = \frac{\text{fluorescent intensity ที่เวลาใดๆ } (t_x)}{\text{fluorescent intensity ที่เวลาเริ่มต้น } (t_0)}$$

2.6 การวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงในสัตว์ทดลอง

การศึกษาวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงในสัตว์ทดลอง จะใช้หนู mice จำนวน 20 ตัว (ภาพที่ 4) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ในแต่ละกลุ่มจะมีเพศผู้ และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว โดยหนูกลุ่มควบคุมจะได้รับน้ำกลั่น และกลุ่มทดลองจะให้สูตรมะนาวผงความเข้มข้น 10 g/kg เป็นเวลา 14 วัน และคำนวณค่า LD_{50} การวิเคราะห์นี้ทำโดยศูนย์วิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข



ภาพที่ 4 แผนผังการทดสอบค่า LD_{50} ของ LPR ในหนู (mice)

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารซิเทรตในเลือดโดยวิธี Enzymetric Method

หลักการของการวิเคราะห์ปริมาณสารซิเทรต คือ การวัดระดับของ NAHD โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ คือ นำเลือด 200 µl ตกตะกอนโปรตีนด้วย 0.1 M Percholric acid ที่แช่เย็น จากนั้นวางทิ้งไว้ 5 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (โดยสารละลายมาตรฐาน 2 mM citric acid ทำเช่นเดียวกัน) จากนั้นนำส่วนใสมา 50 ไมโครลิตร แล้วใส่สาร 0.16 mol/L glycyglycine 1 ml, 0.19 mmol/L NAHD 50 µl และ MDH/LDH 10 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 340 nm จากนั้นใส่เอนไซม์ Citrate lyase 10 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยคำนวณค่าซิเทรตที่ได้จากการเทียบกับค่าสารละลายมาตรฐานที่วัดได้

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณสารซิเทรตในปัสสาวะโดยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณของซิเทรตในปัสสาวะด้วยเครื่อง HPLC ใช้หลักการของ Khaskhali และคณะ(46) โดยการนำปัสสาวะมา 1 ml นำไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสฉีด เพื่อวิเคราะห์ซิเทรตด้วยเครื่อง HPLC (Jasco, Japan) ฉีดผ่านตัวกรองหรือ filter ขนาด 0.22 µm ปริมาตร 0.5 ml. โดยใช้ Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 ,pH = 2.00) เป็น mobile phase และ flow rate = 1.00 ml/min ที่ความยาวคลื่น 210 nm ซึ่งกราฟของซิเทรตจะออกมาในนาทีที่ 4.20 โดยค่าที่ได้นี้จะนำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับค่าของสารละลายซิเทรตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2.5 mM (quality control ,%CV = 3) เพื่อคำนวณหาปริมาณของซิเทรต

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณสารโพแทสเซียมในปัสสาวะ

การวิเคราะห์ปริมาณของโพแทสเซียมในปัสสาวะ วิเคราะห์โดยหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะโดยวิธี DPPH

นำสารตัวอย่างมา 20 µl จากนั้นใส่ 10 mM, pH 7.4 Sodium phosphate buffer 400 µl และใส่ 0.1 mM 2,2-dipheny-2-picryl hydrazyl (DPPH) 400 µl จากนั้นวางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที แล้วจึงนำไปวัดที่ OD 520 nm

การวิเคราะห์ข้อมูล (Statistical analysis)

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล ซึ่งจะแสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) หรือ median และ interquartile range (IQR) สำหรับหรับตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) ความถี่และร้อยละสำหรับตัวแปรที่เป็นกลุ่ม (categorical variables) โดยนำเสนอในภาพของกราฟหรือตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้ในสรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังนี้

- One way ANOVA test หรือ Kruskal-Wallish test ใช้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median ของสองกลุ่มขึ้นไปที่เป็นอิสระต่อกัน
- Two sample T-test หรือ Mann-Whitney test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median ของสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Pearson's correlation test หรือ Spearman's rank correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่องสองตัวแปร
- Chi-square test ใช้ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่เป็นกลุ่ม

หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ตรงตามข้อตกลงเบื้องต้น (Assumptions) ของ parametric tests ที่ จะเลือกใช้ non-parametric tests ที่เหมาะสมแทน โปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ Stata version 8 และ SPSS version 10 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญในสูตรมะนาวผง

องค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญในสูตรมะนาวผง 5 กรัม (1 ซอง) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (total carbohydrate) ไขมันรวม (total fat) โปรตีนรวม (protein) และพลังงานรวม (total energy) เท่ากับ 3.28, 0.05, 0.17 มิลลิกรัม และ 14.2 กิโลแคลอรี่ (ตารางที่ 3)

เมื่อละลายสูตรมะนาวผง 1 ซอง ในน้ำ 200 มิลลิลิตร (2.5 g%) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ย เท่ากับ 3.75

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และแร่ธาตุต่าง ๆในสูตรมะนาวผง

ปริมาณซิเทรตในสูตรมะนาวผง เท่ากับ 4,792 มิลลิกรัมต่อซอง และมีปริมาณแร่ธาตุ (trace elements) แคลเซียม แมกนีเซียม ทองแดง เหล็ก แมงกานีส ซิลีเนียม และสังกะสี ในสารละลายสูตรมะนาวผง เท่ากับ 310.90, 19.70, 0.05, 0.20, 0.06, 0.11 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

การศึกษาองค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง

การศึกษาองค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง 5 กรัม (1 ซอง) พบว่ามีปริมาณสารหนู (arsenic, As) นิกเกิล (nickel, Ni) ตะกั่ว (lead, Pb) แอนติโมนี (antimony, An) วานาเดียม (vanadium, V) เท่ากับ 0.07, 0.06, 0.02, 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ไม่พบ แคดเมียม (cadmium, Cd) โคบอลต์ (cobalt, Co) และโครเมียม (chromium, Co) ในสารละลายสูตรมะนาวผง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบทางโภชนาการของสูตรมะนาวผง (LPR)

Nutritional constituents	Amount (mg/5 g LPR)	Equivalent amount (g/100 g fresh lime juice)	USDA reference(g/100 g fresh lime juice)*
Total Carbohydrate	3.28	65.56	8.42
Total Fat	0.05	0.94	0.07
Protein	0.17	3.30	0.42
Total Energy (kcal)	14.20	283.9	25.0

* USDA = United States Department of Agriculture

ตารางที่ 4 แสดงองค์ประกอบทางเคมี และแร่ธาตุต่างๆ ในสูตรมะนาวผง (LPR)

Chemical constituents	Amount (ppm)	OPDE-DF USP (mg/day)	RDA (mg/day)
Citrate (mg/sachet)	4,792.00	nd	nd
Calcium (Ca)	310.90	nd	800-1200
Magnesium (Mg)	19.70	nd	30-420
Copper (Cu)	0.05	0.05	0.20-1.30
Iron (Fe)	0.20	15.0	0.27-27.00
Manganese (Mn)	0.06	7.0	0.00-2.60
Selenium (Se)	0.11	nd	0.01-0.07
Zinc (Zn)	0.40	15.0	2-13

USP: United States Pharmacopoeia

OPDE-DF: Oral Permitted Daily Exposure for Dosage Forms

RDA: Recommended Dietary Allowances

nd: no data

ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง (LPR)

Chemical constituents	Amount (ppm)	ALDC-HM USP reference (ppm)	OPDE-DF USP reference (mg/day)	RDA (mg/day)
Arsenic (As)	0.07	1.5	0.015	-
Cadmium (Cd)	UD	0.5	0.025	-
Cobalt (Co)	UD	nd	0.10	-
Chromium (Cr)	UD	25	0.15	0.0002-0.05
Nickel (Ni)	0.06	25	nd	-
Lead (Pb)	0.02	1	0.01	-
Antimony (44)	0.01	nd	0.02	-
Vanadium (V)	0.01	25	nd	-

USP : United States Pharmacopoeia

ALDC-HM : Acceptable Limits for Daily Consumption of Heavy Metals

OPDE-DF : Oral Permitted Daily Exposure for Dosage Forms

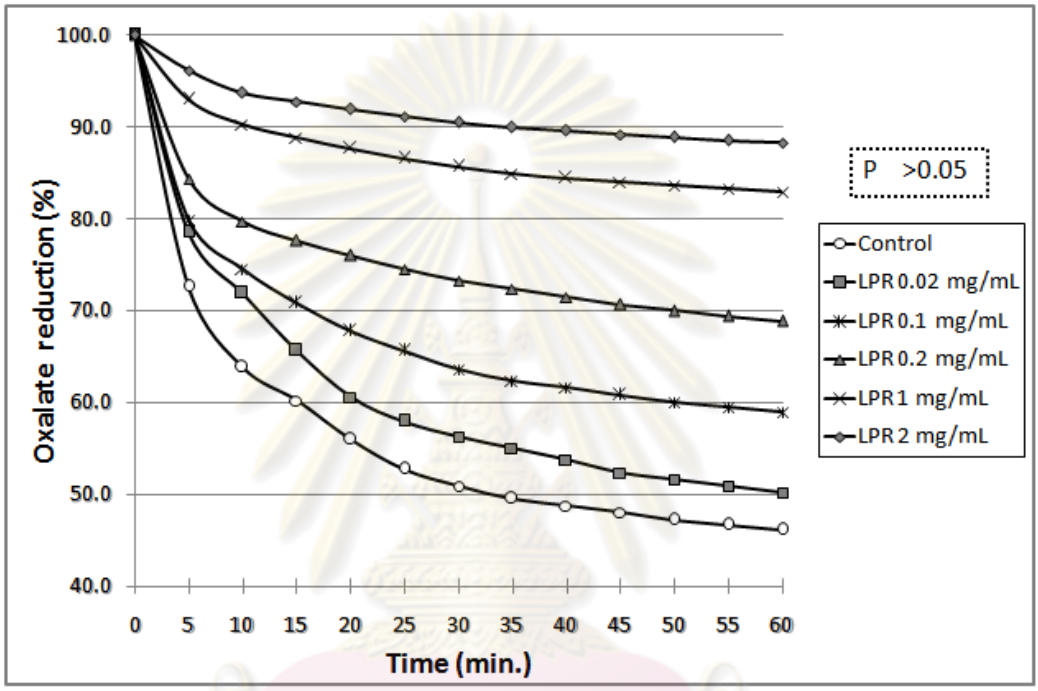
RDA : Recommended Dietary Allowances

UD : undetectable

nd : no data

<u>การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของสูตรมะนาวผงต่อการเกิด crystal growth</u>

ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเกิด crystal growth พบว่า ทุก 5 นาที ปริมาณการลดลงของ free oxalate ช้าลงตามลำดับความเข้มข้นของ LPR (0.02, 0.1, 0.2, 1, และ 2 mg/ml) ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P >0.05) ดังภาพที่ 5 แสดงว่า LPR มีสมบัติยับยั้งการเจริญของผลึก COM (crystal growth inhibitor)



ภาพที่ 5 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเกิด crystal growth พบว่า ปริมาณการลดลงของ free oxalate จะช้าลงตามความเข้มข้นของ LPR เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P >0.05)

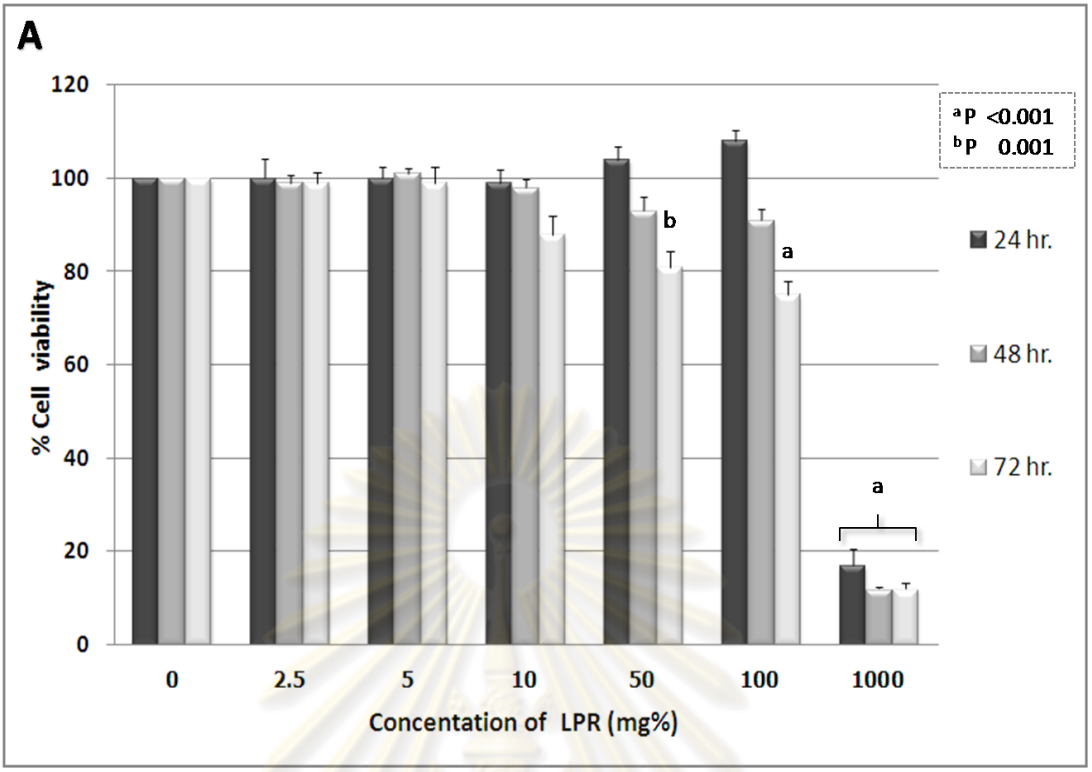
<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการมีชีวิต (cell viability)ของเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cell)</u>

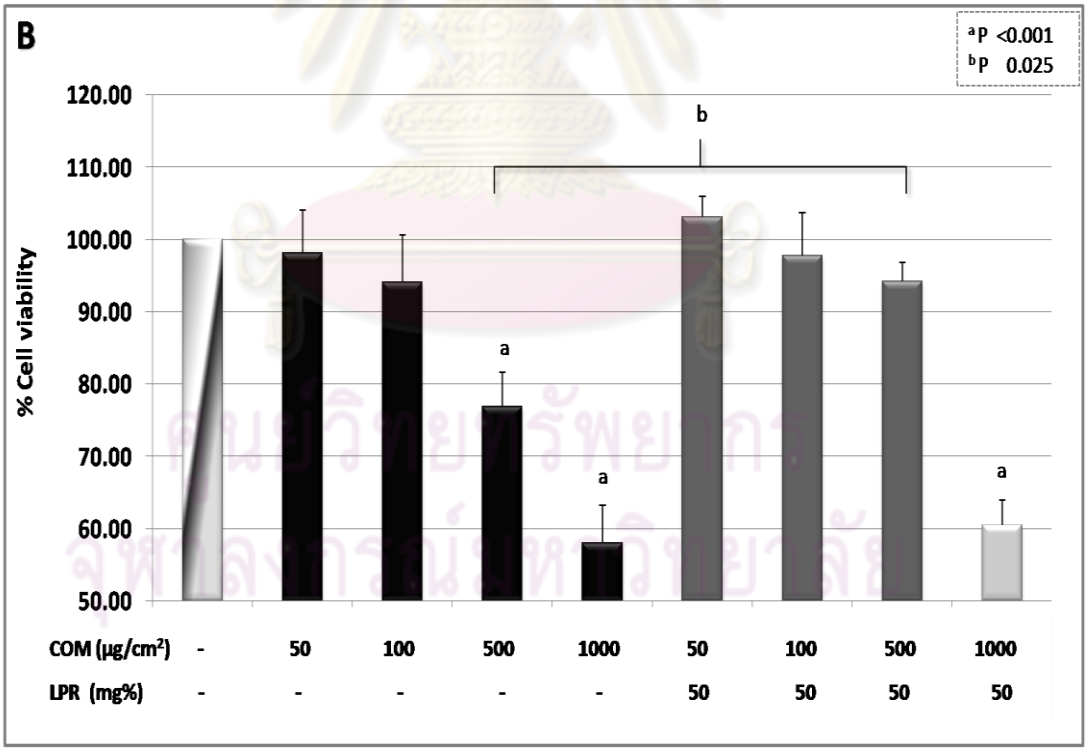
ผลของสูตรมะนาวผงต่อ cell viability ของ HK-2 cell พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผง ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 50 และ 100 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell viability เพิ่มสูงขึ้นแต่ไม่พบนัยสำคัญ (P > 0.05) ขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 1,000 mg% ส่งผลให้ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสูตรมะนาวผง (P <0.001) (ภาพที่ 6A) และที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า cell viability เริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของสูตรมะนาวผง 10, 50 และ 100 mg% และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 1,000 mg% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P <0.001) เช่นเดียวกัน

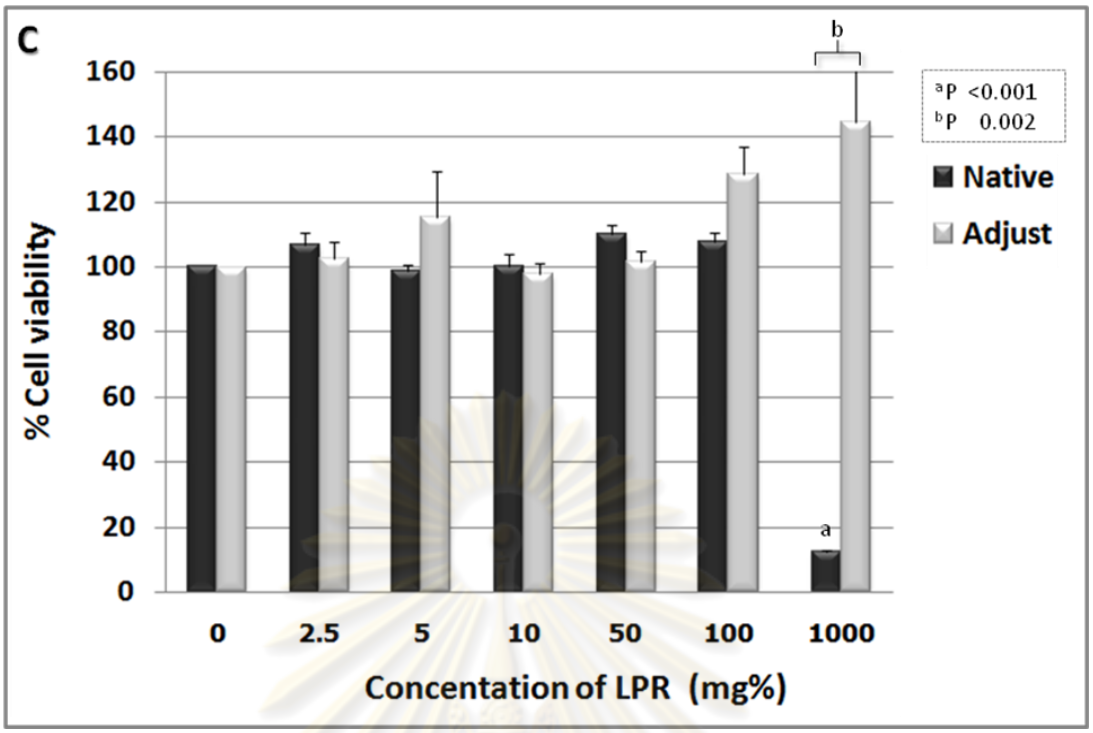
เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า cell viability เริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของสูตรมะนาวผง 5 และ 10 mg% และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 1,000 mg% ตามลำดับ (P = 0.001, <0.001, <0.001 ตามลำดับ) ดังภาพที่ 6A

เป็นที่ทราบกันดีว่าผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (COM) เป็นพิษต่อเซลล์บุผิวท่อไต ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ผลึก COM มีผลทำให้ cell viability ของ HK-2 cell ลดลง โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของผลึก COM เท่ากับ 500 และ 1,000 μg/cm^2 (ภาพที่ 6B) และเมื่อศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อ cell viability ของ HK-2 cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า cell viability ของ COM-treated HK-2 cell เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 500 μg/cm^2 COM สูตรมะนาวผง LPR สามารถเพิ่ม cell viability ของ HK-2 cell ได้อย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.025) (ภาพที่ 6B) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สูตรมะนาวผง LPR สามารถลดความเป็นพิษของผลึก COM ต่อ HK-2 cell ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเซลล์ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 1,000 μg/cm^2 สูตรมะนาวผง (50 mg%) ไม่สามารถเพิ่ม cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 1.000) (ภาพที่ 6B) อาจเป็นเพราะมีปริมาณ COM มากเกินกว่าที่สูตรมะนาวผง 50 mg% หากเพิ่มปริมาณสูตรมะนาวผงขึ้นอาจช่วยลดพิษของ COM ที่ความเข้มข้นสูงๆ ได้

จากภาพที่ 6A ความเข้มข้นของสูตรมะนาวผง 1,000 mg% ทำให้ HK-2 cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าที่ความเข้มข้นสูง สูตรมะนาวผงเป็นพิษต่อเซลล์ ผู้วิจัยคาดว่าการลดลงของ cell viability น่าจะเป็นผลมาจากความเป็นกรดของสูตรมะนาวผง ซึ่งโดยทั่วไป HK-2 cell จะเจริญได้ดีที่ pH ประมาณ 7.25 หากภาวะเป็นกรดมากเซลล์จะตาย จึงทำการทดสอบผลของ pH ของสูตรมะนาวผงต่อ cell viability ของ HK-2 cell ผลการทดสอบพบว่าเมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงที่ไม่ได้ปรับ pH (native pH LPR) ที่ความเข้มข้น 1,000 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (P <0.001) (ภาพที่ 6C) ขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงที่ปรับค่า pH ให้เป็น 7.25 (adjusted pH LPR) ที่ความเข้มข้น 1,000 mg% ส่งผลให้ cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.002) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าที่ทุกความเข้มข้นของสูตรมะนาวผงที่ปรับค่า pH ให้เป็นกลาง (2.5, 5, 10, 50, 100 และ1,000 mg%) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ cell viability อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 6C) ดังนั้นการลดลงของ cell viability ที่ความเข้มข้นสูงของสูตรมะนาวผงเป็นผลมาจากความเป็นกรดมากเกินไป (acid-induced cell death) (47)


A
120
100
80
60
40
20
0
% Cell viability
0
2.5
5
10
50
100
1000
Concentation of LPR (mg%)
aP <0.001
bP 0.001
24 hr.
48 hr.
72 hr.
a
b
a
a


B
aP <0.001
bP 0.025
120.00
110.00
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
% Cell viability
b
a
a
a
COM (µg/cm²) - 50 100 500 1000 50 100 500 1000
LPR (mg%) - - - - - 50 50 50 50

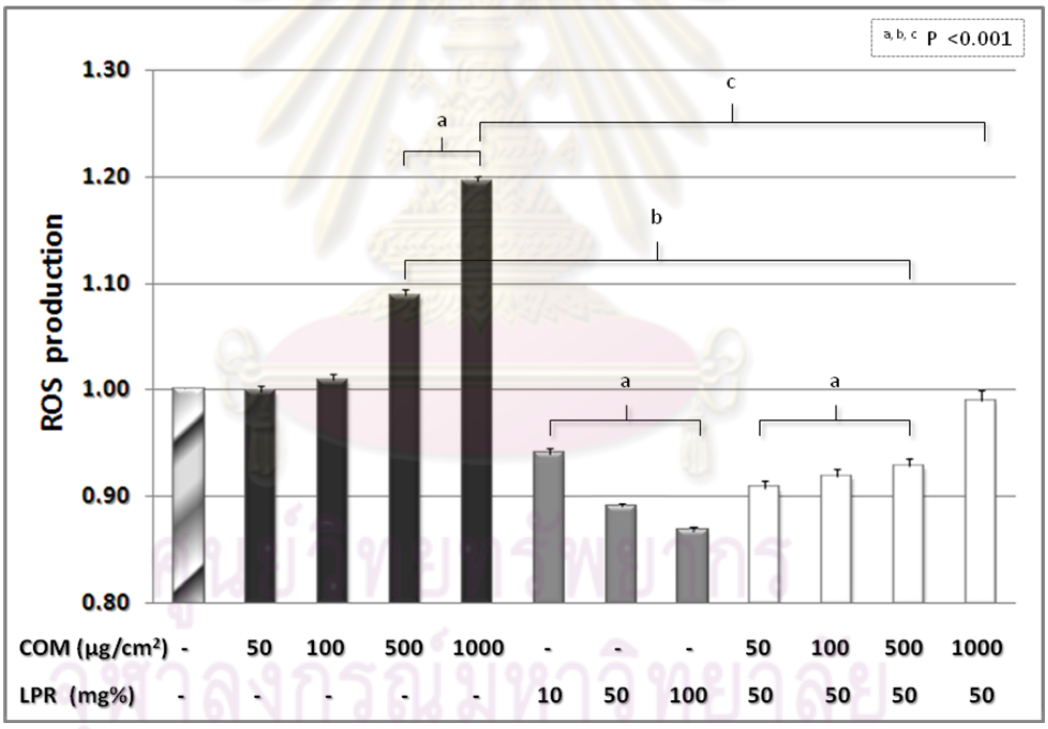


ภาพที่ 6 แสดงผลของสูตรมะนาวผง (LPR) ต่อ cell viability ของ HK-2 cell และ COM-treated HK-2 cell A: เมื่อ HK-2 cell ได้รับ LPR เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 50, 100 และ 500 mg% พบว่า cell viability (%) เพิ่มมากขึ้นตามลำดับแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อได้รับ LPR ที่ความเข้มข้นสูง 1,000 mg% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ LPR ($P < 0.001$) B: ผลของ LPR ต่อ HK-2 cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM (COM-treated HK-2 cell) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า กลุ่ม HK-2 cell ที่ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 500 $\mu g/cm^2$ ร่วมกับ LPR ที่ความเข้มข้น 50 mg% ทำให้ cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ COM 500 $\mu g/cm^2$ อย่างเดียว ($P = 0.025$) C: เมื่อเซลล์ได้รับ LPR ที่ปรับ pH เป็น 7.25 (adjusted pH LPR) พบว่า cell viability ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของ adjusted pH LPR ที่ได้รับ และที่ความเข้มข้น 1,000 mg% พบว่า adjusted pH LPR สามารถเพิ่ม cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ native pH LPR ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ($P = 0.002$)

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระ (ROS production) ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cell)</u>

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผง (LPR) ต่อการสร้าง reactive oxygen species (ROS) พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ LPR ระดับของการสร้าง ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตาม

ความเข้มข้นของ LPR ที่สูงขึ้น (10, 50 และ100 mg%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ LPR (P <0.001) (ภาพที่ 7) ในทางตรงกันข้ามเมื่อเซลล์ที่ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 μg/cm^2 พบว่าระดับ ROS เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P <0.001) และเมื่อเซลล์ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ1,000 μg/cm^2 ร่วมกับได้รับ LPR ที่ความเข้มข้น 50 mg% พบว่า ระดับ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P <0.001) ยกเว้นที่ความเข้มข้นของ COM 1,000 μg/cm^2 ไม่พบการลดลงของ ROS อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับผลึก COM อย่างเดียว (ความเข้มข้น 500 และ1,000 μg/cm^2) กับเซลล์ที่ได้รับทั้งผลึก COM และ LPR (COM ความเข้มข้น 500, 1,000 μg/cm^2 ร่วมกับ LPR 50 mg%) พบว่าเซลล์ที่ได้รับทั้งผลึก COM และ LPR มีระดับการสร้าง ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.001) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลของ LPR และการยับยั้งการสร้าง ROS ใน HK-2 cell พบว่า LPR ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg% ทำให้ระดับ ROS ลดลงตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P <0.001) ในเซลล์ที่ได้รับ COM ที่ 500 และ 1,000 μg/cm^2 มีระดับการสร้าง ROS สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P <0.001) ขณะที่ในเซลล์ที่ได้รับ COM ที่ 50, 100 และ 500 μg/cm^2 ร่วมกับ LPR 50 mg% พบว่า ระดับ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกับเซลล์ที่ได้รับ COM อย่างเดียว (P <0.001)

<u>การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ของสูตรมะนาวผงในสัตว์ทดลอง</u>

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงต่อสัตว์ทดลอง โดยทดลองในหนูถีบจักร (mice) จำนวน 20 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองที่ได้รับ LPR ทางปากครั้งเดียว ขนาด 10.0 กรัม/กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น จากนั้นสังเกตุอาการเป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มทดลองทุกตัวหลังได้รับ LPR ประมาณ 3 นาที มีอาการคล้ายคลื่นไส้ แต่อาการเหล่านี้หายไปและกลับสู่ภาวะปกติหลังได้รับ LPR แล้ว 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 14 วัน หนูทุกตัวมีชีวิตรอด ดังนั้น ขนาดของ LPR ที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่า >10.0 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Toxicity Rating 5-6 (practically non-toxic or relatively harmless) ตามเกณฑ์ของ Hodge and Sterner Toxicity Scale (48) และจากผลการผ่าชันสูตร ศพ ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหพยาธิวิทยาของหนูกลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะ และความเป็นกรด-ด่าง ระดับโพแทสเซียม และสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะ</u>

กลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา

การศึกษาครั้งนี้มีประชากรเริ่มต้นเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ จำนวน 15 ราย เปลี่ยนใจขอถอนตัวก่อนการเริ่มโครงการ 1 ราย และขอถอนตัวเนื่องจากไม่สบายเป็นไข้หวัดใหญ่ในวันเริ่มโครงการ 1 ราย จึงเหลืออาสาสมัครเข้าร่วมโครงการทั้งสิ้น จำนวน 13 ราย แบ่งเป็นเพศชาย 8 ราย (61.5%) และเพศหญิง 5 ราย (38.5%) อายุเฉลี่ยของประชากรทั้งหมดเท่ากับ 34±4 ปี และ ค่า BMI เท่ากับ 23±2 kg/m^2 (ตารางที่ 6) อาสาสมัครทั้ง 13 รายผ่านการตรวจผลทางห้องปฏิบัติการว่ามีสุขภาพดี ผลการตรวจกรองสุขภาพแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี

<u>ข้อมูลพื้นฐาน</u>	<u>เพศชาย</u>	<u>เพศหญิง</u>	<u>รวม</u>
จำนวน (%)	8 (61.5)	5 (38.5)	13 (100)
อายุ (ปี)	34±5	33±3	34±4
BMI (kg/m^2)	24±1	21±3	23±2

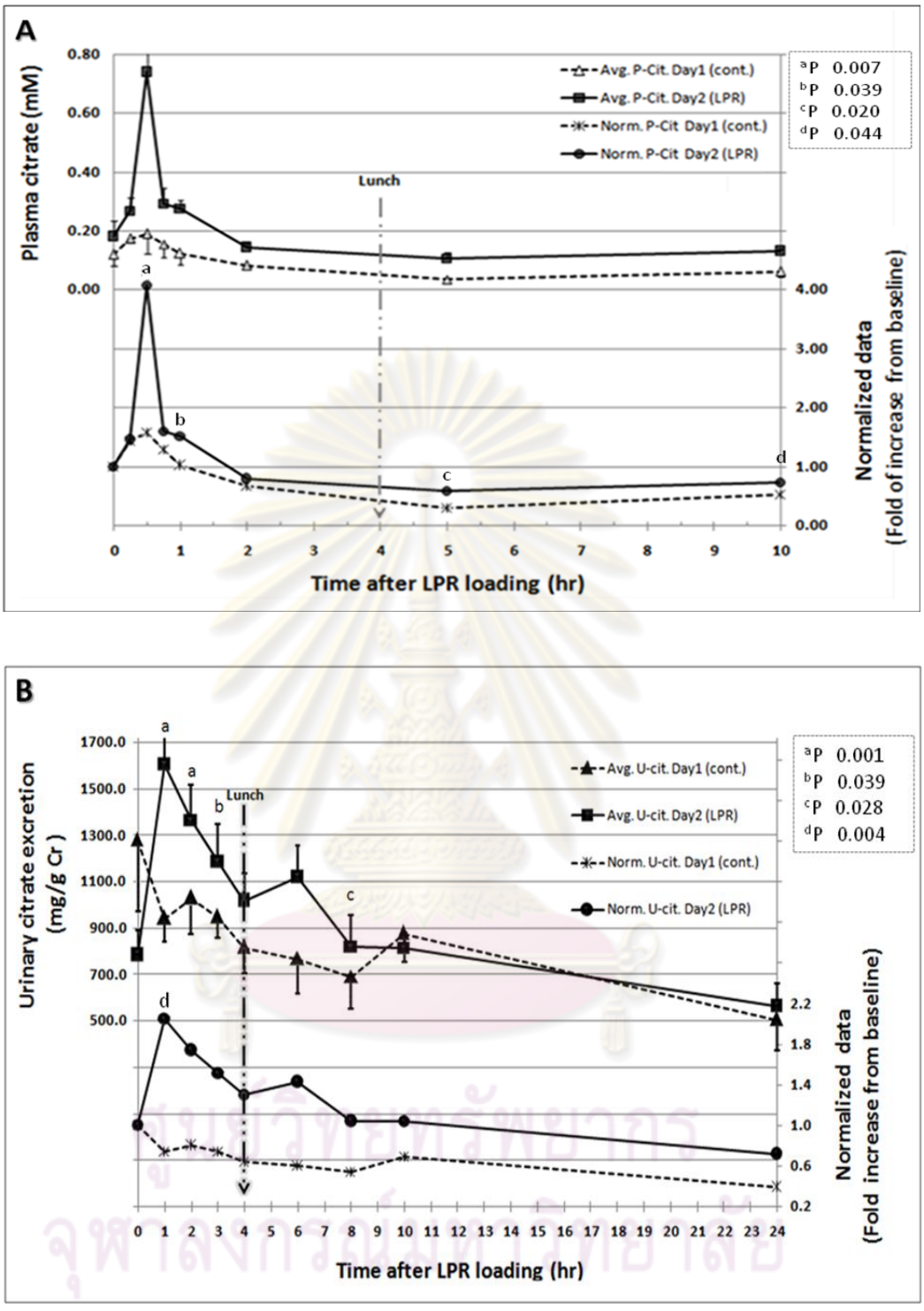
ตารางที่ 7 ผลการตรวจกรองสุขภาพทางห้องปฏิบัติการว่าอาสาสมัครจำนวน 13 คน มีสุขภาพดี

Subject No.	Hb (g/dl)	Hct (%)	FBS (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	CrCl	Total Bilirubin (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	TCO2 (mmol/L)	Anti-HIV	HBsAg
1	13.4	40.0	85.0	9.0	0.6	120.5	0.7	33.0	35.0	108.0	143.0	4.0	31.0	Neg	Neg
2	12.1	36.0	80.0	7.0	0.6	124.5	1.0	24.0	12.0	61.0	141.0	4.2	29.0	Neg	Neg
3	17.0	49.0	85.0	12.0	0.8	129.1	0.7	44.0	45.0	71.0	141.0	4.3	33.0	Neg	Neg
4	12.4	38.0	88.0	9.0	0.6	111.5	0.7	18.0	8.0	58.0	143.0	3.8	30.0	Neg	Neg
5	13.8	41.0	82.0	13.0	0.7	92.5	0.8	19.0	11.0	76.0	143.0	4.4	30.0	Neg	Neg
6	12.4	37.0	91.0	12.0	0.6	129.1	1.1	16.0	12.0	75.0	143.0	4.2	30.0	Neg	Neg
7	14.1	42.0	82.0	10.0	0.9	107.3	0.7	21.0	20.0	78.0	144.0	4.6	33.0	Neg	Neg
8	15.3	47.0	83.0	12.0	0.9	104.2	1.1	41.0	35.0	56.0	146.0	4.6	32.0	Neg	Neg
9	14.9	45.0	90.0	11.0	1.0	91.6	0.8	32.0	36.0	62.0	144.0	4.3	31.0	Neg	Neg
10	15.6	46.0	87.0	10.0	1.0	95.1	0.6	25.0	22.0	59.0	144.0	4.3	30.0	Neg	Neg
11	14.2	43.0	104.0	10.0	0.8	113.1	0.6	37.0	26.0	59.0	142.0	4.1	30.0	Neg	Neg
12	15.0	43.0	80.0	14.0	1.3	87.7	1.2	33.0	23.0	63.0	143.0	4.5	30.0	Neg	Neg
13	15.1	46.0	95.0	10.0	1.0	92.4	0.9	28.0	17.0	46.0	143.0	4.2	30.0	Neg	Neg
Mean	**14.3**	**42.5**	**87.1**	**10.7**	**0.8**	**107.6**	**0.8**	**28.5**	**23.2**	**67.1**	**143.1**	**4.3**	**30.7**	-	-
SD	**1.4**	**4.0**	**6.8**	**1.9**	**0.2**	**15.0**	**0.2**	**9.0**	**11.6**	**15.3**	**1.3**	**0.2**	**1.3**	-	-
Min	**12.1**	**36.0**	**80.0**	**7.0**	**0.6**	**87.7**	**0.6**	**16.0**	**8.0**	**46.0**	**141.0**	**3.8**	**29.0**	-	-
Max	**17.0**	**49.0**	**104.0**	**14.0**	**1.3**	**129.1**	**1.2**	**44.0**	**45.0**	**108.0**	**146.0**	**4.6**	**33.0**	-	-

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณซิเทรตในเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี</u>

ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณซิเทรตในเลือดและปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า โปรไฟล์ของระดับซิเทรตในเลือดของอาสาสมัคร ในวันที่ 1 (control day) และวันที่ 2 (LPR loading day) แตกต่างกันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.12±0.05 และ 0.27±0.20 mM ตามลำดับ (ภาพที่ 8A) โดยในวันที่ 2 ปริมาณของซิเทรตในเลือดของอาสาสมัครสูงสุดภายหลังจากได้รับ LPR 30 นาที และสูงกว่าในวันที่ 1 ณ เวลาเดียวกัน แต่ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลาเริ่มต้น (t_0, ก่อนได้รับ LPR) ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน (t_i/t_0) พบว่า วันที่ 2 ระดับของซิเทรตในเลือดของอาสาสมัครเพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับ LPR ($P = 0.049$) และนาทีที่ 30 ของวันที่ 1 ($P = 0.007$) ภายหลังครึ่งชั่วโมงหลังได้รับ LPR ระดับของซิเทรตในเลือดของอาสาสมัครลดลงตามลำดับที่ 45 นาที และชั่วโมงที่ 1, 2, 5 และ10 โดยยังคงมีระดับของซิเทรตในเลือดสูงกว่าวันที่ 1 โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 1, 5 และ10 ระดับของซิเทรตในเลือดในวันที่ 2 สูงกว่าวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.040$, 0.020 และ 0.044 ตามลำดับ) ดังภาพที่ 8A

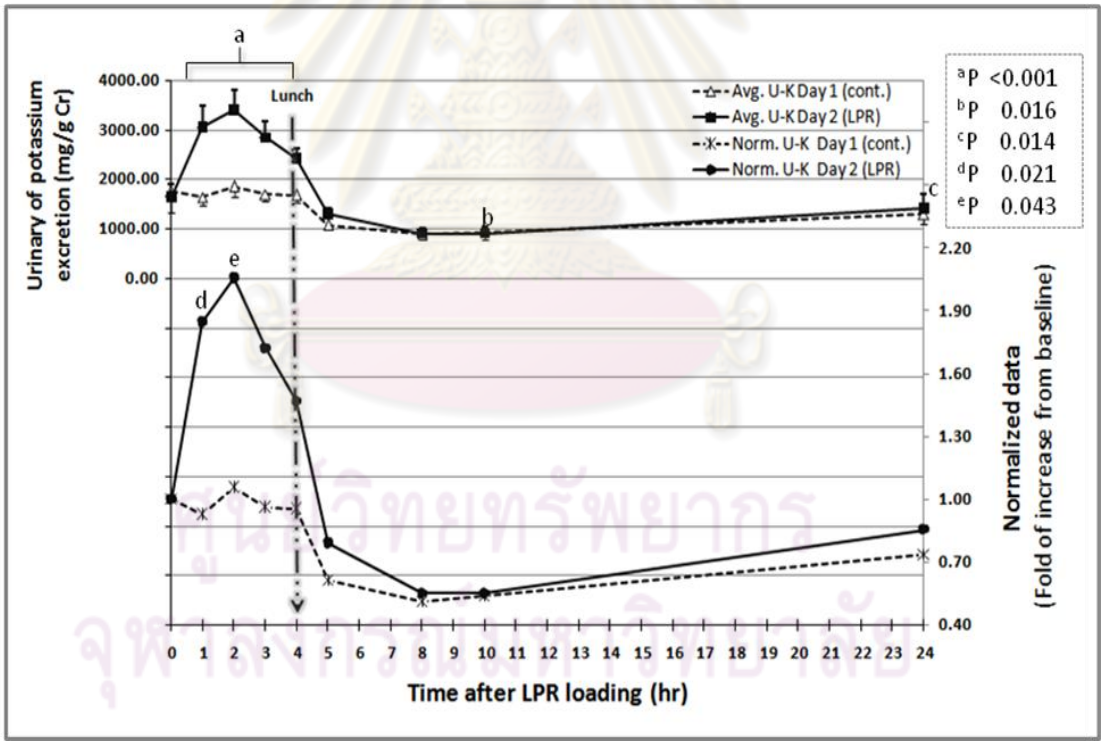
ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงซิเทรตในปัสสาวะ พบว่า โปรไฟล์ของระดับซิเทรตในปัสสาวะของอาสาสมัคร ในวันที่ 1 และวันที่ 2 แตกต่างกันเช่นเดียวกันกับระดับซิเทรตในเลือด (ภาพที่ 8B) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 868.4±206.2 และ 1,032.9±306.4 mg/g Cr ตามลำดับ ในวันที่ 2 ภายหลังจากได้รับ LPR ซิเทรตถูกขับออกมาในปัสสาวะสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 และเริ่มลดลงในชั่วโมงถัดไปตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับนาทีเริ่มต้น (t_0) และในวันที่ 2 ระดับซิเทรตในปัสสาวะในชั่วโมงที่ 1, 2, 3 และ 8 สูงกว่านาทีเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$, 0.001, 0.039, และ 0.028 ตามลำดับ) และเมื่อปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่า ในชั่วโมงที่ 1 ของวันที่ 2 มีระดับซิเทรตในปัสสาวะสูงกว่าในวันที่ 1 ที่เวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.004$) (ภาพที่ 8B) สรุปผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการรับประทาน LPR สามารถเพิ่มระดับซิเทรตในเลือดสูงสุดที่นาทีที่ 30 และขับออกในปัสสาวะสูงสุดในนาทีที่ 60



ภาพที่ 8 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับซิเทรตในเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี A: ปริมาณของซิเทรตในเลือดของอาสาสมัครสูงสุดในนาทีที่ 30 ภายหลังได้รับ LPR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.007) เมื่อเปรียบเทียบกับในวันที่ 1 ณ เวลาเดียวกัน B: ระดับซิเทรตในปัสสาวะสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 หลังจากได้รับ LPR และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.001) เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0)

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพแทสเซียมในปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี</u>

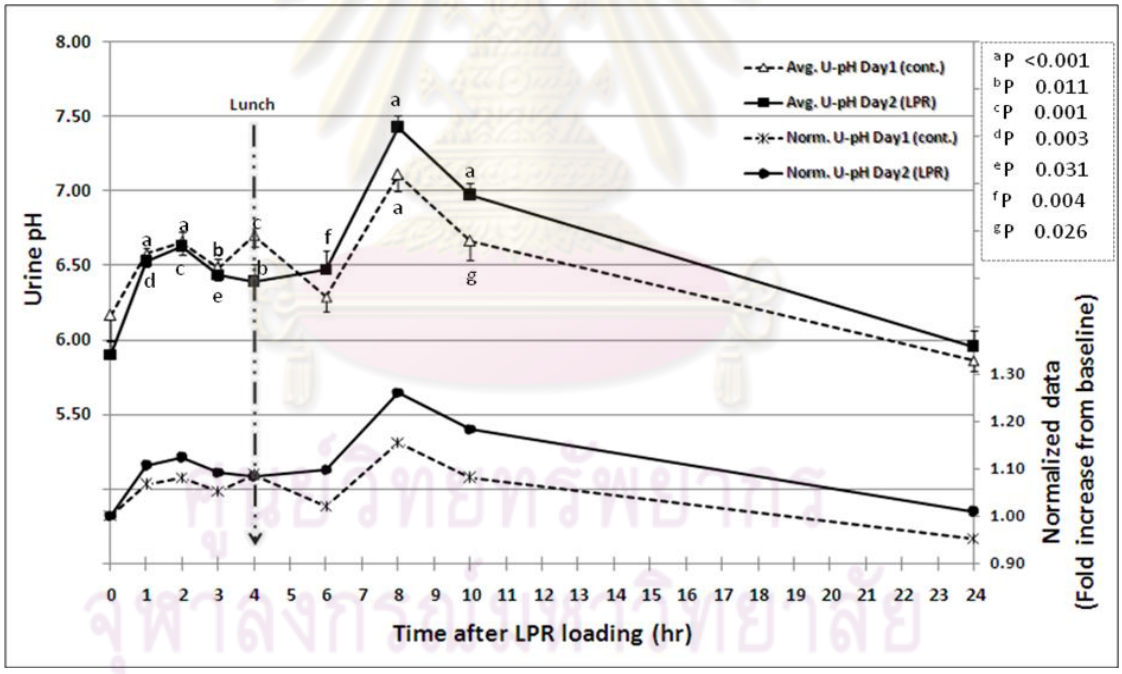
ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพแทสเซียมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ระดับของโพแทสเซียมในปัสสาวะของอาสาสมัครในวันที่ 2 แตกต่างอย่างเด่นชัดจากวันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,431.8±377.3 และ 1,995.8±955.4 mg/g Cr ตามลำดับ หลังได้รับ LPR ในวันที่ 2 ระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 ซึ่งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับที่ t_0 ($P < 0.001$) (ภาพที่ 9) จากนั้นระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มลดลงตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่า หลังได้รับ LPR ระดับของโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเดียวกันในวันที่ 1 ($P = 0.021$ และ 0.043 ตามลำดับ) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) ของวันที่ 2

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี</u>

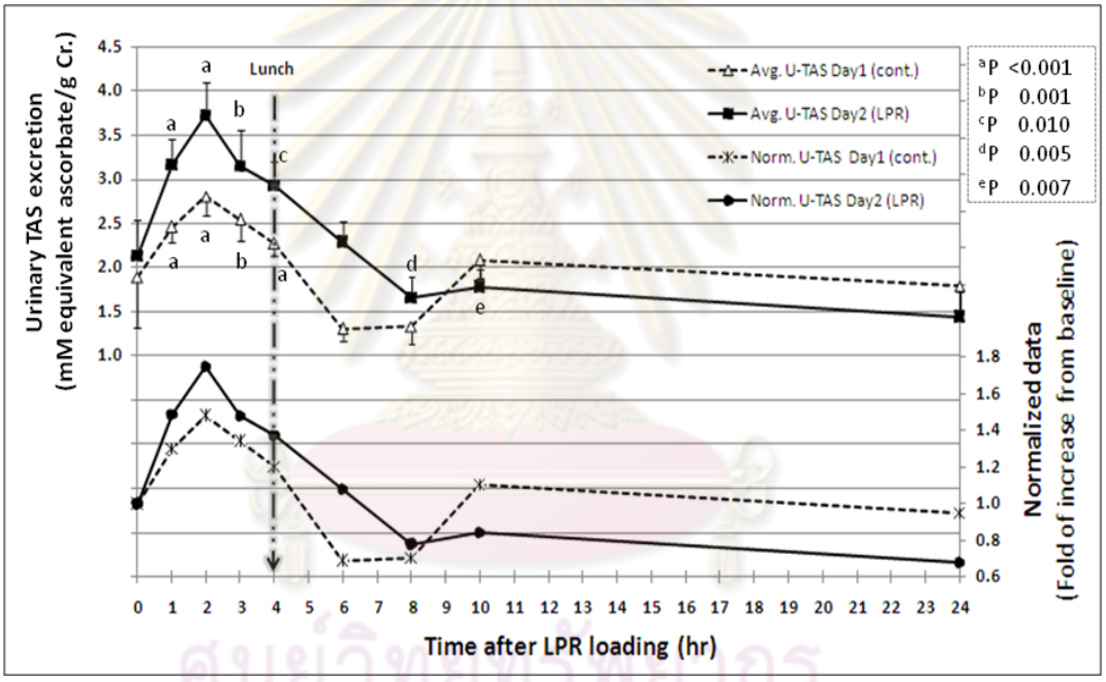
ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า โปรไฟล์ของค่า pH ของปัสสาวะระหว่างวันที่ 1 และวันที่ 2 ค่อนข้างใกล้เคียงกัน วันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยของ pH ในปัสสาวะเท่ากับ 6.50±0.36 และวันที่ 2 เท่ากับ 6.52±0.47 ในวันที่ 1 ระดับ pH เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 8 และ10 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) (P= 0.003, 0.001, 0.031, <0.001 และ 0.026 ตามลำดับ) และในวันที่ 2 ระดับของ pH เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกันในชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 5 และ 8 เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา t_0 (P <0.001, <0.001, 0.011, <0.001 และ <0.001 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่าในวันที่ 2 ที่อาสาสมัครได้รับ LPR ค่า pH ของปัสสาวะมีแนวโน้มสูงกว่าวันที่ 1 ในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการรับประทาน LPR มีแนวโน้มที่จะเพิ่มค่า pH ของปัสสาวะ (urinary alkalinizing effect) ได้



ภาพที่ 10 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ทั้งวันที่ 1 และวันที่ 2 ค่า pH ของปัสสาวะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ10 ตามลำดับ และเริ่มลดลงภายหลังจาก 10 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) ของวันเดียวกัน เมื่อปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน (normalization) วันที่ 2 ที่ได้รับ LPR มีแนวโน้มที่จะเพิ่มค่า pH ของปัสสาวะได้สูงกว่าวันที่ 1 (control day)

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant status, TAS) ในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี</u>

ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า โปรไฟล์ของระดับ TAS ในปัสสาวะในของวันที่ 1 และวันที่ 2 แตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.05±0.52 และ 2.47±0.79 %/g Cr ตามลำดับ ในวันที่ 1 ระดับ TAS ในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 1 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) (P <0.001) และเช่นเดียวกันในวันที่ 2 ระดับ TAS ในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา t_0 (P <0.001) เมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่า ระดับของ TAS ในวันที่ 2 ชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 มีแนวโน้มที่สูงกว่าในวันที่ 1 ช่วงเวลาเดียวกัน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของ TAS ในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดีพบว่า ทั้งวันที่ 1 และ 2 ระดับ TAS เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (t_0) (P <0.001) เมื่อปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน (normalization) พบว่า ระดับ TAS ในปัสสาวะของอาสาสมัครในวันที่ 2 ในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังได้รับ LPR สูงกว่าในช่วงเวลาเดียวกันของวันที่ 1

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของสูตรมะนาวผง มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ไขมันรวม โปรตีนรวม และพลังงานรวมสูงกว่าในน้ำมะนาวสด (กรัม/100 กรัมของน้ำผลมะนาวสด) ที่รายงานโดย USDA และจากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าในสูตรมะนาวผงหนึ่งซองมีปริมาณซิเทรตสูง (4,792 มิลลิกรัมต่อซอง) และออกซาเลตต่ำ ปริมาณแร่ธาตุแมงกานีส ซีลีเนียม แคลเซียม แมกนีเซียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เกินค่ามาตรฐานที่อนุญาตให้มีได้ในอาหารและยา (ALDC-HM, OPDE-DF) แต่ต่ำกว่าค่า RDA เช่นเดียวกันกับปริมาณสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง ที่พบว่ามีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานที่อนุญาตให้มีได้ในอาหารและยา (ALDC-HM, OPDE-DF) สรุปได้ว่า สูตรมะนาวผงมีปริมาณซิเทรตสูง ซึ่งน่าจะใช้เป็นยาที่ยับยั้งการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้ อีกทั้งมีสารโลหะหนักอยู่ในปริมาณที่ต่ำมากหรือแทบไม่มีเลย จึงน่าจะปลอดภัยสำหรับผู้ป่วยในการรับประทานต่อเนื่องเป็นเวลานาน

จากข้างต้น จะเห็นว่าสูตรมะนาวผงนี้มีความปลอดภัยทางโภชนาการในระดับสากล และจากผลการวิจัยก่อนหน้าพบว่าสูตรมะนาวผงมีแนวโน้มที่จะป้องกันการเกิดนิ่วไต และรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรมะนาวผงต่อการลดอัตราการเกิดผลึกนิ่ว (crystal growth) จากการทดสอบด้วยวิธี Oxalate depletion assay พบว่า LPR มีประสิทธิภาพลดการเกิด crystal growth ได้ และจากการวิเคราะห์ผลข้างเคียงของ LPR ต่อเซลล์บุท่อไต (HK-2 cells) เพื่อดูอัตราการรอดชีวิต (cell viability) ของ HK-2 cells พบว่า ที่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับ LPR ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mg% ส่งทำให้ cell viability (%) ของ HK-2 cells เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6A และ 6B) แต่ที่ความเข้มข้นที่ 1,000 mg% ทำให้ cell viability ของ HK-2 cells ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6A) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากความเป็นกรดของ LPR เนื่องจากปรับ pH ของ LPR ให้เท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ (pH = 7.25) พบว่ามี cell viability สูงกว่า LPR ที่ไม่ได้ปรับ pH (ภาพที่ 6C) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้น 1,000 mg% ของ LPR ทำให้ cell viability ลดลง เป็นผลมาจากความเป็นกรดของ LPR และเวลาที่ได้รับ LPR นานขึ้น ดังนั้นค่า optimal ของ LPR ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ควรมีความเข้มข้นไม่เกิน 50 mg% และจากการศึกษาผล LPR ต่อ cell viability ของ COM-treated cells ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า HK-2 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM ที่ความเข้มข้น 500 $\mu g/cm^2$ ร่วมกับการได้รับ LPR ที่ความเข้มข้น 50 mg% พบว่า cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มที่ได้รับ COM 500 μg/cm^2 อย่างเดียว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า LPR สามารถช่วยยับยั้งอัตราการตายของ HK-2 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM ได้

จากการศึกษาผลของ LPR ต่อการสร้าง ROS พบว่าระดับของ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามความเข้มข้นที่ได้รับ LPR ในปริมาณที่มากขึ้น (10, 50 และ100 mg% ตามลำดับ) สรุปได้ว่า LPR ไม่เป็นพิษต่อ HK-2 cells และมีคุณสมบัติสามารถช่วยลดการสร้าง ROS production ได้ และจากผลของ LPR ต่อ HK-2 cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM ที่พบว่า LPR ที่ความเข้มข้น 50 mg% สามารถช่วยลดการสร้าง ROS ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยผลึก COM ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 500 μg/cm^2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับผลึก COM ที่ 500 และ 1,000 μg/cm^2 กับกลุ่มที่ได้รับผลึก COM ที่ 500 และ 1,000 μg/cm^2 ร่วมกับได้รับ LPR ที่ 50 mg% พบว่ากลุ่มที่ได้รับทั้ง COM กับ LPR สามารถช่วยยับยั้งการสร้าง ROS ได้ จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า LPR มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิด ROS ใน HK-2 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM ได้

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติของมะนาวผงที่มีปริมาณของสารยับยั้งการเกิดนิ่วสูง และทดสอบผลข้างเคียงไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์บุท่อไต ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน ในหนูถีบจักร โดยให้ LPR ทางปากครั้งเดียวขนาดความเข้มข้นสูง และพบว่าขนาดของสูตรมะนาวผงที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) > 10 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า LPR ไม่มีผลข้างเคียงต่อหนู อีกทั้งหนูทุกตัวที่ได้รับ LPR มีชีวิตอยู่รอดครบกำหนด 14 วัน และเมื่อผ่าชันสูตรศพไม่พบความผิดปกติที่อวัยวะภายใน ดังนั้นจากการศึกษาผลของ LPR ทั้งใน HK-2 cells และในสัตว์ทดลอง สามารถสรุปได้ว่า LPR ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 100 mg% ไม่มีความเป็นพิษทั้งในเซลล์บุท่อไตที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และไม่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองในระยะเฉียบพลัน เพื่อยืนยันผลความปลอดภัยของ LPR ในสัตว์ทดลอง จึงควรทำการทดสอบความเป็นพิษของ LPR ในระยะเรื้อรัง (chronic toxicity test) ต่อไป

จากการวิเคราะห์ผลของ LPR ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรตในเลือดและปัสสาวะระดับโพแทสเซียม ค่า pH และ ค่า TAS ในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี สามารถสรุปได้ว่า ภายหลังจากได้รับ LPR ไปแล้ว ซิเทรตจะถูกดูดซึมเข้าไปที่กระแสเลือดสูงสุดในนาทีที่ 30 และจะถูกขับออกทางปัสสาวะสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 ตามด้วยโพแทสเซียม และ TAS ในชั่วโมงที่ 2 นอกจากนี้ LPR ยังส่งผลให้ค่า pH ในปัสสาวะสูงขึ้นด้วย ดังนั้นจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยสรุปได้ว่า สูตรมะนาวผงมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วได้ โดยเพิ่มระดับซิเทรต โพแทสเซียม และค่าความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะ และสามารถช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์บุท่อไต และที่สำคัญไม่พบผลข้างเคียงต่อเซลล์บุท่อไตและในอาสาสมัครสุขภาพดี

อภิปรายผลการวิจัย

<u>การศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญ ทางเคมี แร่ธาตุ และสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง</u>

จากการศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ พบว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตรวม พลังงานรวม ไขมันรวม และโปรตีนรวม ในสูตรมะนาวผงมีค่าสูงกว่าค่าอ้างอิงมาตรฐานของ USDA ซึ่งเป็นข้อมูลจากต่างประเทศ แม้ว่าจะใช้มะนาวพันธุ์เดียวกัน (Lime, *Citrus aurantifolia*) ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าน่าจะมีปัจจัยหลายต่างๆ ที่ทำให้มีปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ขั้นตอนการแปรรูปของสูตรมะนาวผงในงานวิจัยนี้ สภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกัน การเพาะปลูก เป็นต้น และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของโลหะหนักที่เป็นพิษต่อร่างกายในสูตรมะนาวผงพบว่ามีปริมาณน้อยมากหรือไม่มีเลย ซึ่งไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานอ้างอิงของยาของประเทศอเมริกา (United States Pharmacopoeia, USP) (49) เป็นข้อมูลยืนยันว่าการรับประทานสูตรมะนาวผงปลอดภัยต่อการเป็นพิษจากโลหะหนัก

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการมีชีวิต (cell viability)ของเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells)</u>

สารซิเทรตซึ่งมีบทบาทเป็นตัวยับยั้งที่สำคัญก่อการเกิดผลึกนิ่ว จากการจับกันของตัวกระตุ้นการเกิดนิ่ว เช่น ออกซาเลต มีรายงานการศึกษาปริมาณของซิเทรตในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ พบว่าผลไม้ที่มีปริมาณของซิเทรตมากที่สุดคือ มะนาว ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มผลไม้กลุ่ม citrus fruit (50) จากหลายงานวิจัย ได้ศึกษาคุณสมบัติของซิเทรตจากมะนาวต่อการเป็นสารยับยั้งการเกิดผลึกนิ่ว พบว่า สารซิเทรตจากธรรมชาตินี้ มีคุณสมบัติช่วยลดอัตราการเกิดผลึกนิ่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ (6, 9, 44, 51-53) ซึ่งจากการศึกษาในสูตรมะนาวผงครั้งนี้ พบปริมาณสารซิเทรตซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเกิดผลึกนิ่วสูง และพบปริมาณออกซาเลตซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการเกิดผลึกนิ่วในปริมาณที่ต่ำมาก ดังนั้นจากคุณสมบัติของสูตรมะนาวผงที่กล่าวมาข้างต้นนี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดนิ่วต่อไป

การเกิดภาวะ oxidative stress ส่งผลทำให้เกิด ROS production เพิ่มสูงขึ้น และทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลง ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ตามมา มีรายงานการศึกษาวิจัยของ Habibzadegah-Tari (26) ใน HK-2 cells พบว่าผลึก COM ที่ความเข้มข้น 133 μg/cm^2 กระตุ้นให้เกิด ROS มากขึ้น และส่งผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) เพิ่มขึ้น นำไปสู่การกระตุ้นกระบวนการอักเสบ เมื่อเซลล์บุท่อไต (renal epithelial cell) ได้รับผลึก COM ส่งผลให้เกิด oxidative stress และ renal epithelial cell ถูกทำลาย กระตุ้นกระบวนการอักเสบ ดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage เข้ามามาก

และทำลายโครงสร้างของ tubulointerstitium ส่งเสริมให้เกิด ROS สูงขึ้นอีก ในที่สุดกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) และทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ลดลง ดังนั้นหากสามารถยับยั้งกระบวนการต่างๆ ที่ทำให้เกิด ROS ได้ก็จะส่งผลให้ cell viability เพิ่มมากขึ้น มีรายงานวิจัยศึกษาผลของน้ำมะนาว และน้ำส้มต่อการยับยั้งการตกผลึกของ calcium oxalate (CaOx) (52) ในหลอดทดลอง โดยดูจากอัตราการเกิดผลึก CaOx (crystallization) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 1) 4 mmol/L calcium + 0.5 mmol/L oxalate (control group) กับกลุ่ม 2) 4 mmol/L calcium + 0.5 mmol/L oxalate + lemon juice (lemon juice group) และกลุ่ม 3) 4 mmol/L calcium + 0.5 mmol/L oxalate + orange juice (orange juice group) พบว่า ทั้งน้ำมะนาว และน้ำส้มมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเกิด crystallization โดยน้ำมะนาวจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำส้ม ($P > 0.05$)

จากการวิเคราะห์ผลของสูตรมะนาวผง ต่อ cell viability และ ROS production ใน COM-treated HK-2 cells ให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นที่พบว่า เมื่อ HK-2 cells ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ cell viability ลดลง และ ROS เพิ่มขึ้น และจากผลของ LPR ที่สามารถเพิ่ม cell viability และลดการเกิด ROS เมื่อทดลองกับ COM-treated HK-2 cells แล้ว พบว่าสามารถลดระดับ ROS และเพิ่ม cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาผลของ LPR ต่อการลดการเกิด crystal growth ของผลึก COM ในหลอดทดลอง โดยวิธี oxalate depletion assay พบว่า LPR ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถลดการเกิด crystal growth ได้มากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Oussama และคณะ (7) ที่ทดลองผลของน้ำมะนาวต่อการเกิด crystallization ของผลึก CaOx พบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำมะนาวที่ 25% ลดการเกิด crystallization ได้ และที่ 50, 75 และ 100% ของน้ำมะนาวช่วยลดการเกิด crystallization อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของ LPR ต่อการยับยั้ง crystal growth ต่อ cell viability และต่อ ROS production ผู้วิจัยจึงสรุปได้ว่า LPR มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการต่อต้านการเกิดนิ่ว จึงนำมาศึกษาต่อในระดับ *in vivo* ต่อไป

<u>การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงในสัตว์ทดลอง</u>

จากรายงานการศึกษาของ Touhami และคณะ (5) ได้ศึกษาผลของน้ำมะนาวต่อการป้องกันการเกิดโรคนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะในหนูทดลอง (Wistar rats, n=6/group) โดยกระตุ้นให้หนูทดลองเกิดนิ่วด้วย ethylene glycol และให้น้ำมะนาวที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100% เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า ผลทางพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อไต หนูกลุ่มที่ถูกกระต้นให้เกิดนิ่ว ร่วมกับการได้รับน้ำมะนาวที่ความเข้มข้นที่มากขึ้นตามลำดับ สามารถช่วยลดการเกิดผลึกนิ่ว

ได้มากขึ้นตามลำดับ สรุปว่าน้ำมะนาวมีผลช่วยลดการเกิดนิ่วได้ ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงในหนู mice (n=10/group) โดยให้ LPR นาน 14 วัน พบว่า ค่า LD_{50} ของ LPR มีค่ามากกว่า 10 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของ LPR ต่ำมาก หรือสามารถเปรียบเทียบได้จาก คนที่มีน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม รับประทาน LPR 100 ซองแล้วยังไม่พบผลข้างเคียงใดๆ ดังนั้นจากการศึกษาทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง และในหนูทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า LPR มีความปลอดภัยสูง

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารซิเทรตในเลือดและปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี</u>

สภาวะปกติของร่างกายจะรักษาสมดุลระดับความเข้มข้นของซิเทรตในพลาสมา โดยซิเทรตในกระแสเลือดจะถูกนำไปใช้ หรือถูกเมตาบอไลท์ได้อย่างรวดเร็วโดยเฉพาะที่ไต จากรายงานการศึกษาของ Sakhee และคณะ (54) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารซิเทรตในพลาสมา และปัสสาวะในคนปกติโดยให้รับประทานกรดซิตริก 40 mEq ครั้งเดียว พบว่า ระดับของซิเทรตในเลือด เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับกรดซิตริกในนาทีที่ 30 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 และระดับของซิเทรตในปัสสาวะจะเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 ภายหลังได้รับกรดซิตริก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของซิเทรตในเลือดและปัสสาวะของ LPR ในครั้งนี้ ได้พบว่าระดับของซิเทรตในเลือดเพิ่มสูงสุดภายใน 30 นาที และลดลงอย่างรวดเร็วใน 15 นาทีต่อมา และในปัสสาวะระดับของซิเทรตเพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 และค่อยๆ ลดลงตามลำดับในชั่วโมงต่อมา ซึ่งการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Sakhee คือ ซิเทรตทั้งในเลือดและปัสสาวะออกมาเร็วกว่า ซึ่งปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรตเพิ่มขึ้น เช่น การได้รับกรดซิตริกทำให้ร่างกายเกิดภาวะเป็นด่างเพิ่มขึ้น (alkalosis), ได้รับอาหารที่ เมื่อถูกเมตาบอไลท์แล้วทำให้เป็นด่างเพิ่มขึ้น (ผัก และผลไม้), ฮอร์โมน (calcitonin, estrogen, progesterone)เป็นต้น และปัจจัยที่ทำให้การขับซิเทรตลดลง เช่น ได้รับกรดที่ทำให้ร่างกายเกิดภาวะที่มีกรดเพิ่มขึ้น (acidosis), ได้รับอาหารที่เมื่อถูกเมตาบอไลท์แล้วทำให้เป็นกรดมากขึ้น เช่น เนื้อสัตว์, ฮอร์โมนเพศชาย, ภาวะอดอาหาร, การออกกำลังกายมากเกินไป และการอยู่ในภูมิอากาศร้อนเป็นเวลานาน เป็นต้น

<u>การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารโพแทสเซียม, ความเป็นกรด-ด่าง และสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี</u>

จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโพแทสเซียมในปัสสาวะ พบปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 ภายหลังจากได้รับ LPR ไปแล้วซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน อย่างไรก็ตามถ้า

โพแทสเซียมภายในเซลล์ต่ำ จะส่งผลให้ภายในเซลล์มีความเป็นกรดสูงขึ้น (มี H^+ มากขึ้น) ทำให้ซิเทรตภายในเซลล์ลดลง ทำให้ซิเทรตทางด้าน tubular lumen ถูกดึงเข้าเซลล์มากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณของซิเทรตลดลงจึงทำให้เกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วตามมาได้ จากการศึกษาผลของ LPR ต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างในปัสสาวะของอาสาสมัครไม่พบความแตกต่างระหว่างก่อน และหลังได้รับ LPR โดยค่าเฉลี่ยของ pH ในปัสสาวะของวันที่ 1 เท่ากับ 6.50 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Murayama และคณะ (55) ที่มีค่าเฉลี่ยของ pH ในปัสสาวะประมาณ 5.8 และรายงานวิจัยของ Kamal และคณะ (56) ที่มีค่าเฉลี่ยของ pH ในปัสสาวะประมาณ 6.07 ในคนปกติ ส่วนในวันที่ 2 ที่ได้รับ LPR ค่าpH ในปัสสาวะโดยเฉลี่ยเพิ่มเป็น 6.52 แสดงว่า LPR มีแนวโน้มที่จะเพิ่มค่า pH ในปัสสาวะได้

จากรายงานการศึกษาของ Tosukhowong และคณะ (44) ได้ให้ผู้ป่วยโรคนิ่วไต (n=13) รับประทานมะนาวผง (มีซิเทรต 63 mEq, โพแทสเซียส 21 mEq) ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าระดับของโพแทสเซียม ความเป็นด่าง และซิเทรตในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับมะนาวผงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบปริมาณของโพแทสเซียม และสารต้านอนุมูลอิสระ (glutathione, GSH) ในเลือดเพิ่มขึ้น และระดับของ malondialdehyde (MDA) ในปัสสาวะลดลง ซึ่ง MDA นี้เป็นผลิตผลจากกระบวนการ peroxidation ของไขมัน และโปรตีนจากกระบวนการ oxidation ดังนั้นจึงส่งผลให้การทำงานของเซลล์บุท่อไตกลับมาทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งในการวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาผลของ LPR ต่อการเปลี่ยนแปลงของ TAS ในปัสสาวะที่พบว่าระดับของ TAS ในปัสสาวะจะสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 2 ภายหลังได้รับ LPR ไปแล้ว ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน จากการเพิ่มขึ้นของ TAS นี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของ LPR ที่นอกจากช่วยเพิ่มซิเทรต โพแทสเซียม และภาวะความเป็นด่างในปัสสาวะแล้ว ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาโพแทสเซียมซิเทรต แล้วไม่พบการเพิ่มขึ้นของ GSH ในเลือด เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างหลังให้ยาโพแทสเซียม-ซิเทรต กับมะนาวผง 3 เดือน (44) ดังนั้น LPR จึงมีคุณสมบัติที่ดีกว่าในด้านการเพิ่มขึ้นของ GSH ในเลือดเมื่อเทียบกับการใช้ยาโพแทสเซียม-ซิเทรตที่ใช้เป็นยารักษาโรคนิ่วในปัจจุบัน นอกจากรายงานการศึกษาของ ปิยะรัตน์และคณะแล้ว ยังมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติของน้ำผลไม้ต่อการป้องกันและลดการเกิดโรคนิ่วได้ (5-9, 52)

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่เหมาะสมของสูตรมะนาวผง ต่อการนำไปพัฒนาศึกษาต่อเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต เพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดโรคนิ่วไตในประเทศไทย และเป็นการวิจัยและพัฒนายารักษาผู้ป่วยโรคนิ่วโดยใช้สมุนไพรพื้นบ้านที่มีคุณภาพมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (nutraceutical) มีความปลอดภัยสูง และราคาที่ย่อมเยาได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของสารต่างๆในเลือดและปัสสาวะ ควรควบคุมรายการอาหารที่รับประทานในแต่ละมื้อของวันที่1 และ 2 ให้เหมือนกัน เพื่อการวิเคราะห์ผลที่แม่นยำมากขึ้น

จากการศึกษาคุณสมบัติของสูตรมะนาวผงในงานวิจัยนี้ เป็นที่น่าสนใจต่อการนำมาใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต และพัฒนาเป็นยารักษาโรคนิ่วไตในอนาคตต่อไปได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

(1.) MARC A. S., LOW R.K., McDONALD M., Shami G.S., and Stoller M.L. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nepholithiasis. The Journal of Urology. 1996;156(3):907-9.

(2.) Larrauri J.A., Rup R.P., Bravo L., and Saura-Calixto F. High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity. The Journal of Food Research International. 1996;29(8):757-62.

(3.) Kuljarachanan T., Devahastin S., and Chiewchan N. Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. The Journal of Food Chemistry. 2009;113(4):944-9.

(4.) พจน์ ศรีบุญลือ, ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์, วิฑูรย์ ประสงค์วัฒนา, และ เกรียง ตั้งสง่า. โรคนิ่วไต : ความรู้พื้นฐาน สาเหตุ การวินิจฉัย การป้องกันรักษา. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2543.

(5.) Touhami M., et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. The Journal of BioMed Central of Urology. 2007;7(1):18.

(6.) Koff S.G., Paquette E.L., Cullen J., Gancarczyk K.K., Tucciarone P.R., and Schenkman N.S. Comparison between lemonade and potassium citrate and impact on urine pH and 24-hour urine parameters in patients with kidney stone formation. The Journal of Urology. 2007;69(6):1013-6.

(7.) Oussama A., Touchami M., and Mbarri M. In vitro and in vivo study of effect of lemon juice on urinary lithogenesis. Archivos espa oles de urolog a. 2005;58(10):1.

(8.) Seltzer M.A., Low R.K., McDonald M., Shami G.S., and Stoller M.L. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. The Journal of urology. 1996;156(3):907-9.

(9.) Penniston K.L., Steele T.H., and Nakada S.Y. Lemonade therapy increases urinary citrate and urine volumes in patients with recurrent calcium oxalate stone formation. The Journal of Urology. 2007;70(5):856-60.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(10.) ปิยะรัตน์ โตสุโขวงค์, ฉัตรชัย ยาจันทร์ทา, ชาญชัย บุญหล้า, ทศพล ศศิวงศ์ภักดี, และ เกรียง ตั้งสง่า. โรคนิ่วไต : พยาธิสรีระวิทยา การรักษา และการสร้างเสริมสุขภาพ. Chulalongkorn Medical Journal. 2006;50(2):103-23.

(11.) Saepoo S., Adstamongkonkul D., Tosukhowong P., Predanon C., Shotelersuk V., and Boonla C. Comparison of urinary citrate between patients with nephrolithiasis and healthy controls. Chulalongkorn Medical Journal. 2009 Jan - Feb;53(1):51 - 65.

(12.) Youngjermchan P., et al. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. Chulalongkorn Medical Journal. 2006 September;50(9):605-21.

(13.) Tosukhowong P., et al. Citraturic, alkalinizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. Urological Ressearch. 2008 Aug;36(3-4):149-55.

(14.) Robinson M.R., et al. Impact of long-term potassium citrate therapy on urinary profiles and recurrent stone formation. The Journal of Urology. 2009 Mar;181(3):1145-50.

(15.) Wabner C.L., and Pak C.Y. Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors. The Journal of Urology. 1993 Jun;149(6):1405-8.

(16.) Levey A.S., et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Annals of Internal Medicine. 2009;150(9):604.

(17.) Ramello A, Vitale C., and Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. Journal of the American Society of Nephrology. 2000:45-50.

(18.) Fan J., Chandhoke P., and Grampsas S. Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 1999;10:S376.

(19.) Taylor E.N., Stampfer M.J., and Curhan G.C. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in men: new insights after 14 years of follow-up. Journal of the American Society of Nephrology. 2004;15(12):3225.

(20.) Yanagawa M., et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. International Journal of Urology. The Journal of Urology. 1997;4(6):537-40.

(21.) Koff S.G., Paquette E.L., Cullen J., Gancarczyk K.K., Tucciarone P.R., and Schenkman N.S. Comparison between lemonade and potassium citrate and impact on urine pH and 24-hour urine parameters in patients with kidney stone formation. The Journal of Urology. 2007 Jun;69(6):1013-6.

(22.) Tosukhowong P., et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand : update 2007. Asian Biomedicine. 2007;1(1):87-95.

(23.) Taylor E.N., Stampfer M.J., and Curhan G.C. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. Journal of The American Medical Association. 2005;293(4):455.

(24.) Ramello A., Vitale C., and Marangella M., Epidemiology of nephrolithiasis. Journal of nephrology. 2001;13:S45.

(25.) Khan S.R. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. The Journal of Urological Research. 1995;23(2):71-9.

(26.) Habibzadegah-Tari P., Byer K.G., and Khan S.R. Reactive oxygen species mediated calcium oxalate crystal-induced expression of MCP-1 in HK-2 cells. The Journal of Urological Research. 2006;34(1):26-36.

(27.) Thamilselvan S., Byer K.J., Hackett R.L., and Khan S.R. Free radical scavengers, catalase and superoxide dismutase provide protection from oxalate-associated injury to LLC-PK1 and MDCK cells. The Journal of Urology. 2000 Jul;164(1):224-9.

(28.) Boonla C., Wunsuwan R., Tungsanga K., and Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. The Journal of Urological Research. 2007 Aug;35(4):185-91.

(29.) Khan S.R. Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. Nephron Experimental Nephrology. 2004;98(2):e55-60.

(30.) Umekawa T., Chegini N., and Khan S.R. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by renal epithelial cells in culture on exposure to calcium oxalate, phosphate and uric acid crystals. Nephrology Dial Transplant. 2003 Apr;18(4):664-9.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(31.) Habibzadegah-Tari P., Byer K., and Khan S.R. Oxalate induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in HK-2 cells involves reactive oxygen species. The Journal of Urological Research. 2005 Dec;33(6):440-7.

(32.) Chen S., Gao X., Sun Y., Xu C., Wang L., and Zhou T. Analysis of HK-2 cells exposed to oxalate and calcium oxalate crystals: proteomic insights into the molecular mechanisms of renal injury and stone formation. The Journal of Urological Research. 2010 Feb;38(1):7-15.

(33.) DeWater R., et al. Calcium oxalate nephrolithiasis: effect of renal crystal deposition on the cellular composition of the renal interstitium. American Journal Kidney Disease. 1999 Apr;33(4):761-71.

(34.) Khan S.R. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. Clinical Expeimental Nephrology. 2004 Jun;8(2):75-88.

(35.) Boonla C., et al. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in stone-containing kidneys. British Journal of Urology International. 2008 May;101(9):1170-7.

(36.) Boonla C., et al. Fibrosis and evidence for epithelial mesenchymal transition in the kidneys of patients with staghorn calculi. British Journal of Urology International. 2011 Mar;16

(37.) Sriboonlue P., et al. Blood and urinary aggregator and inhibitor composition in controls and renal-stone patients from northeastern Thailand. The Journal of Nephron. 1991;59(4):591-6.

(38.) Simpson DP. Effect of nephrectomy on citrate metabolism in rat. American Journal of Physiol. 1963;205:1049-52.

(39.) Sakhaee K., Alpern R., Poindexter J., and Pak C.Y. Citraturic response to oral citric acid load. The Journal of Urology. 1992 Apr;147(4):975-6.

(40.) Soygur T., Akbay A., and Kupeli S. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and residual fragments after shockwave lithotripsy in lower caliceal calcium oxalate urolithiasis: a randomized controlled trial The Journal of Endourol. 2002;16:149-52.

(41.) Zuckerman J.M. and Assimos D.G. Hypocitraturia: pathophysiology and medical management. The Journal of Urological Research. 2009;11(3):134-44.

(42.) Touhami M., et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. BioMed Central Urology. 2007;7-18.

(43.) Tung P., and Rubin R.H. *New drug evaluation and drug regulation, in Principle of Pharmacology - The pathophysiology basis of drug therapy*. Editon 2005;789-801.

(44.) Tosukhowong P., et al. Citraturic, alkalinizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. The Journal of Urological Research. 2008;36(3):149-55.

(45.) Chutipongtanate S., and Thongboonkerd V. Red Blood Cell Membrane Fragments but Not Intact Red Blood Cells Promote Calcium Oxalate Monohydrate Crystal Growth and Aggregation. The Journal of Urology. 2010;184(2):743-9.

(46.) Khaskhali M.H., and Bhanger M.I. Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. The Journal of Chromatography B. 1996;675 147-51.

(47.) Nedergaard M., Goldman S.A., Desai S., and Pulsinelli W.A. Acid-induced death in neurons and glia. The Journal of Neuroscience. 1991;11(8):2489.

(48.) Hodge H.C. and Sterner J.H. Tabulation of toxicity classes. American Industrial Hygiene Association Quarterly. 1949;10(4):93-6.

(49.) DeStefano A., Zaidi K., Cecil T., and Giancaspro G. Elemental Impurities-Information. Pharmacopeial Forum. 2010;36(1):2-9

(50.) Penniston K.L., Nakada S.Y., Holmes R.P., and Assimos D.G. Quantitative assessment of citric acid in lemon juice, lime juice, and commercially-available fruit juice products. The Journal of endourology. 2008;22(3):567-70.

(51.) Mohammed T., et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. BioMed Central Urology. 2007;7:18.

(52.) Kulaks Z.L., Sofikerim M., and Evik C. In vitro effect of lemon and orange juices on calcium oxalate crystallization. International Urology and Nephrology. 2008;40(3):589-94.

(53.) Odvina C.V. Comparative value of orange juice versus lemonade in reducing stone-forming risk. Clinical Journal of The American Society of Nephrology. 2006;1(6):1269.

(54.) Sakhaee K., Nicar M., Hill K., and Pak C.Y.C. Contrasting effects of potassium citrate and sodium citrate therapies on urinary chemistries and crystallization of stone-forming salts. The Journal of Kidney International. 1983;24(3):348-52.

(55.) Murayama T., Sakai N., Yamada T., and Takano T. Role of the diurnal variation of urinary pH and urinary calcium in urolithiasis: a study in outpatients. International Journal of Urology. 2001;8(10):525-31.

(56.) Kamel K., Cheema-Dhadli S., Shafiee M., Davids M., and Halperin M. Recurrent uric acid stones. Quarterly Journal of Medicine. 2005;98(1):57.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. **การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์แร่ธาตุ และสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง**

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1, 2, 5 และ10 mg/L

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งต้น 100 mg/L มา 10 ml. จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 ml. จะได้ความเข้มข้น 10 mg/L
- ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10 mg/L มา 10, 20, 50 และ100 ml. ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 ml. จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1, 2, 5, และ10 mg/L ตามลำดับ

1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- เจือจางสารตัวอย่างปัสสาวะอัตราส่วน 1:5 โดยปิเปตปัสสาวะมา 2 ml.
- เติมน้ำกลั่น 7 ml. จากนั้นผสมสารตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. **การเตรียมสารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์บุท่อไต (HK-2 cells)**

2.1 เตรียม Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)

- ใส่ fetal bovine serum (FBS) ลงไป 100 ml (10% FBS) ใน DMEM 900 ml.
- ใส่ 100U/ml penicillin/streptomycin ลงไป 10 ml. (1% penicillin/streptomycin)

2.2 Phosphate buffer saline (1X PBS) (10 mM Disodium hydrogen phosphate, (Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))

- ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) มา 1.42 g.
- ชั่ง NaCl (MW=58.44) มา 8.18 g.
- ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml.
- ปรับ pH = 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 ml. ด้วยน้ำกลั่น

3. **การเตรียมสารเคมีในการทดสอบการทำลายเซลล์ (cytotoxicity) ของซีรั่ม โดยวิธี MTT colorimetric assay**

3.1 เตรียม 5 mg/ml MTT stock solution

- ชั่ง MTT มา 50 mg ละลายใน 10 ml.ของ 1X PBS
- แบ่งเก็บใส่หลอดละ 1 ml. แล้วเก็บ 4°C นาน 1 เดือน

3.2 เตรียม 0.5 mg/ml MTT working solution

- นำ 5 mg/ml MTT stock solution มา 1 ml.

- ใส่ serum free medium 9 ml. จากนั้นผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. **การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ ROS Production ในเซลล์บุท่อไต**

4.1 เตรียม stock solution ของ 1 M 6-carboxy-2′,7′-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)

- ชั่ง DCFH-DA (MW: 675.43) มา 5 mg.
- ใส่ DMSO 7.4 ml. ละลายให้เข้ากัน
- แบ่งใส่หลอดละ 1 ml. แล้วเก็บที่ -20°C

4.2 เตรียม working solution 0.1 M DCFH-DA

- นำ stock solution 1 M DCFH-DA ตั้งทิ้งไว้จนละลาย
- ใส่ complete medium 9 ml. จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5. **การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ครีเอตินีนในปัสสาวะ**

5.1 เตรียม 0.04 M picric acid

- ชั่ง picric acid (MW=229.10) มา 9.164 g.
- ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 L

5.2 เตรียม 1.4 N Sodium hydroxide (NaOH)

- ชั่ง NaOH (MW=40.0) มา 5.6 g.
- ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 ml.

6. **การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีนในปัสสาวะ**

6.1 เตรียม Coomassie brilliant blue (CBB) reagent

- ผสม CBB stain : acid reagent = 3:2
- นำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จำนวน 2 ครั้ง ก่อนจึงนำไปใช้

7. **การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ N-acetyl glucosaminidase (20)ในปัสสาวะ**

7.1 เตรียม citrate buffer 0.1 mM pH 4.15

- ชั่ง 0.045 M sodium citrate มา 13.23 g/L
- ชั่ง 0.055 M citric acid มา 11.55 g/L
- ปรับ pH = 4.15 ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml.

7.2 เตรียม NAG substrate (10 mM pH 4.15)

- ชั่ง 4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamine มา 171.1 mg.
- ละลายใน citrate buffer 50 ml. และปรับ pH = 4.15

7.3 เตรียม AMP buffer (0.75 M pH 10.2)

- ชั่ง 2-amino-2-methyl-propanol มา 9.42 g.
- ปรับ pH = 10.2 และละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 50 ml.

7.4 เตรียม 0.15 M sodium chloride (NaCl)

- ชั่ง NaCl มา 8.766 g.
- ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 L

8. การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ปริมาณซิเทรตในปัสสาวะ

8.1 เตรียม 25 mM Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) pH 2.0

- ชั่ง KH_2PO_4 มา 3.402 g.
- ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับ pH = 2 ด้วย orthophosphoric acid (H_3PO_4)
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 ml.
- นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ

(Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการวิจัย ผลทางยาของสูตรมะนาวผงต่อเซลล์บุท่อไตที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึกนิ่ว และผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรตและภาวะต้านอนุมูลอิสระในอาสาสมัครสุขภาพดี

(Medicinal effect of lime powder regimen in HK-2 cells exposed to lithogenic crystals and its citraturic and antioxidative responses in healthy volunteers)

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นายพูนสิน พวงไพโรจน์

ที่อยู่ 98/518 ม.พฤษลดา ต.บางแม่นาง อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี 11140

เบอร์โทรศัพท์ (02) 256-4482 ต่อ 4717 มือถือ (084) 644-3596

ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ (02) 256-4482 ต่อ 4717 มือถือ (081) 733-8700

ชื่อ อาจารย์ แพทย์หญิง ดร.ปาจรีย์ ลิลิตการตกุล

ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ (02) 256-4481 มือถือ (081) 613-4664

ชื่อ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ (02) 256-4482 ต่อ 4717 มือถือ (081) 518-7618

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ที่มี ผลการตรวจสุขภาพปกติ ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

<u>เหตุผลความเป็นมา</u>

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาสาธารณสุขของไทยมาเป็นเวลานาน ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรทั้งในวัยแรงงานและผู้สูงอายุ โรคนิ่วไตเกิดจากความผิดปกติขององค์ประกอบในปัสสาวะ ทำให้มีการตกผลึกของสารในปัสสาวะเป็นก้อนนิ่วและอุดตันทางเดินปัสสาวะ ภาวะที่มีสารซิเทรตในปัสสาวะต่ำ ทำให้ขาดสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคนิ่วไต โดยภาวะนี้พบได้มากถึงร้อยละ 90 ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตในประเทศไทย การรักษาโรคนิ่วไตทำได้โดยการสลายนิ่วหรือการผ่าตัด แต่พบว่าภายหลังการรักษาด้วยวิธีการเหล่านี้แล้วผู้ป่วยจะมีการบาดเจ็บของเนื้อไต ได้แก่ เนื้อไตมีการอักเสบบวม ร่วมกับการที่ผู้ป่วยยังมีภาวะสารซิเทรตต่ำทำให้มีการเกิดนิ่วซ้ำ ซึ่งภาวะการณ์เกิดนิ่วซ้ำนี้หากเกิดขึ้นบ่อยครั้งจะนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังได้ ปัจจุบันพบว่าการรับประทานสารสังเคราะห์ของเกลือซิเทรต เพื่อเพิ่มปริมาณซิเทรตในปัสสาวะและทำให้ปัสสาวะอยู่ในภาวะที่เป็นด่าง ช่วยลดการเติบโตของก้อนนิ่วและการเกิดนิ่วซ้ำได้

มะนาว เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของไทยและเป็นพืชที่มีปริมาณซิเทรตสูงมาก ปัจจุบันได้มีการประดิษฐ์สูตรมะนาวผงที่มีคุณสมบัติในการรักษาและป้องกันการเกิดซ้ำโรคนิ่วไต โดยสูตรมะนาวผงนี้ประกอบด้วยสารสำคัญในการป้องกันนิ่ว ได้แก่ ซิเทรต โพแทสเซียม และแมกนีเซียม และยังมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี เบตาแคโรทีน โพลีฟีนอล และฟลาโวนอย งานวิจัยนี้ให้สูตรมะนาวผงในรูปสารละลาย (ละลาย 1 ซอง ในน้ำดื่ม 200 มิลลิลิตร) และเมื่อวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3.77±0.023 ซึ่งสูงกว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำอัดลมที่ขายตามท้องตลาดทั่วไป เท่ากับ 2.45±0.01 นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ระดับโลหะหนักในสูตรมะนาวผงพบว่าระดับสารโลหะหนัก ได้แก่ อาร์ซีนิก(arsenic), แคดเมียม (cadmium), โครเมียม (chromium), ตะกั่ว (lead), นิกเกิล (nickel) อยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำกว่าค่าที่พบ

ได้ในอาหาร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการได้รับสูตรมะนาวผงจะปลอดภัยจากความเป็นพิษของโลหะหนัก

นอกจากนี้สูตรมะนาวผงยังได้ผ่านการทดสอบหาพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เพื่อทดสอบฤทธิ์และความเป็นพิษเฉียบพลัน เพื่อศึกษาขนาดของสูตรมะนาวผงที่ทำให้หนูตายร้อยละ 50 หรือค่าที่มีผลทำให้หนูทดลอง 100 ตัว ตายไป 50 ตัว (median lethal dose,LD_{50}) ที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่า หนูทุกตัวมีชีวิตรอดภายหลังได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน และผลการชันสูตรทางพยาธิวิทยาด้วยตาเปล่าไม่พบความผิดปกติของอวัยวะใดๆ ดังนั้นขนาดของสูตรมะนาวผงที่ทำให้หนูตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ควรมีค่ามากกว่า 10.0 กรัมต่อกิโลกรัม

ผลการวิจัยที่ผ่านมาของคณะวิจัยนี้ ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต จำนวน 13 คน ที่ได้รับสูตรมะนาวผง 5 กรัม ละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร ดื่มประจำทุกวัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้ง 13 คน มีระดับของซิเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น, มีความเป็นด่างมากขึ้น และยังมีระดับของสารยับยั้งการก่อนิ่วตัวอื่นในปัสสาวะสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรมะนาวผง ช่วยลดการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการทำลายของเซลล์บุท่อไต ส่งผลทำให้แนวโน้มการทำงานของไตดีขึ้น ดังนั้นสูตรมะนาวผงอันเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาตินี้อาจนำมาใช้ทดแทนยาโพแทสเซียมซิเทรต และช่วยลดค่าใช้จ่ายของการรักษาโรคนิ่วไต และความเสี่ยงของผู้ป่วยต่อการใช้ยาโพแทสเซียมซิเทรตได้

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษา</u>

ยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีชื่อว่า สูตรมะนาวผง เพื่อใช้รักษาโรคนิ่วไต ซึ่งเป็นยาที่อยู่ในกระบวนการศึกษา เพื่อยืนยันถึงประสิทธิภาพ และความปลอดภัยในการใช้ยา ในการรักษาสำหรับผู้ป่วยโรคนิ่วไต เพื่อชะลอการโตของก้อนนิ่ว และป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ และยาสูตรมะนาวผงนี้มีรสชาด ดีบริโภคง่าย

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาในครั้งนี้ คือ ศึกษาการดูดซึมของยาสูตรมะนาวผงที่เข้าสู่ร่างกาย และการกระจายตัวของในร่างกาย รวมถึงการขับถ่ายยาออกจากร่างกาย โดยการศึกษานี้จะศึกษาปริมาณของสารซิเทรต และสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ในเลือดและปัสสาวะ โดยมีจำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ อาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 15 คน

<u>วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย</u>

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านจะได้รับการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการก่อนเข้าร่วมการวิจัย ได้แก่ การตรวจความเข้มข้นของเลือด เบาหวาน การ

ตรวจการทำงานของตับและไต เพื่อคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมตรงกับในการวิจัย เมื่อผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการระบุว่า ท่านผ่านเกณฑ์การคัดกรองแล้ว ทางผู้วิจัยจะขอให้ท่านงดเครื่องดื่มมึนเมา (แอลกอฮอล์) และงดสูบบุหรี่ รวมถึงยาทุกชนิด 2 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมวิจัย และตลอดเวลาที่เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะได้รับความรู้รวมถึงคำแนะนำการบริโภคอาหารที่มีปริมาณซิเทรต และโพแทสเซียมต่ำ พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลการบริโภคอาหารประจำวันตลอด 7 วันแรกของการเข้าร่วมวิจัย จากนั้นผู้วิจัยจะขอให้ท่านเข้ามาพักอยู่ที่ศูนย์วิจัยทางคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chula Clinical Research Center) อาคาร อ.ป.ร. ชั้น 7 ภายใต้การดูแลของแพทย์พยาบาล และคณะวิจัย ระยะเวลาทั้งหมดที่ท่านจะอยู่ในโครงการวิจัย คือ 3 วัน 3 คืน คือ ช่วงเวลา 18.00 น. ของวันที่ 7, 8 และวันที่ 9 ของโครงการวิจัย โดยผู้วิจัยจะขอให้ท่านงดอาหารหลัง 21.00 น. (ไม่ต้องงดน้ำ) จนกระทั่งเวลาเช้าของวันที่ 8 และเช้าวันที่ 9 เพื่อบริโภคอาหารแบบเดียวกันกับอาสาสมัครท่านอื่น และจำกัดอาหารที่มีปริมาณซิเทรต และโพแทสเซียมสูง

การวิจัยในวันที่ 8 ท่านจะได้รับการเจาะเลือดที่หลอดเลือดดำบริเวณแขน ประมาณ 1 ช้อนชา (7 มิลลิลิตร) ที่เวลา 6.00-7.00, 7.15, 7.30, 7.45, 8.00, 9.00, 12.00, และ 17.00 น. โดยก่อนการเจาะเลือดท่านจะต้องปัสสาวะทิ้งทั้งหมด เพื่อทำให้กระเพาะปัสสาวะว่าง จากนั้นดื่มน้ำประมาณ 1 ขวดเล็ก (500 มิลลิลิตร) ทันที และเก็บปัสสาวะที่เวลา 6.00-7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, 13.00, 15.00, 17.00 และสิ้นสุดที่ 7.00 น. เช้าของวันที่ 9 (และ 7.00 น. เช้าของวันที่ 10)

การวิจัยในวันที่ 9 ก่อนการเจาะเลือดท่านจะต้องปัสสาวะทิ้งทั้งหมด เพื่อทำให้กระเพาะปัสสาวะว่าง จากนั้นดื่มน้ำสูตรมะนาวผงที่ละลายในน้ำดื่ม 200 มิลลิลิตร ให้หมดในครั้งเดียว สำหรับการเจาะเลือด และเก็บปัสสาวะจะเก็บเหมือนในวันที่ 8

ท่านจะได้รับประทานอาหาร ซึ่งทางผู้วิจัยจะเป็นผู้กำหนดให้ โดยท่านจะได้รับอาหารที่เหมือนกับอาสาสมัครท่านอื่น

ตัวอย่างเลือดจะนำมาปั่นเพื่อแยกเอาเฉพาะพลาสมา จากนั้นจะเก็บพลาสมาและปัสสาวะไว้ที่อุณหภูมิลบ 70 องศาเซลเซียส (-70°C) ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของซิเทรตและสารต้านอนุมูลอิสระโดยจะทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี ห้อง 717/1 ชั้น 7 อาคารแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการศึกษาจะถูกเก็บไว้ในช่องแข็งตู้เย็นอุณหภูมิ ลบ 70 องศาเซลเซียส (-70°C) เป็นเวลา 1 ปี หลังจากนั้นนำไปทำลายทิ้งตามหลักการปฏิบัติการที่ดีทางห้องปฏิบัติการ

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรใช้วัคซีน หรือรับประทานยาอื่น จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา ขอให้ท่านปรึกษาผู้ทำวิจัย ทั้งนี้เนื่องจากวัคซีน หรือยาดังกล่าวอาจมีผลต่อยาสูตรมะนาวผงที่ท่านได้รับจากผู้ทำวิจัย ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ความเสี่ยงจากการรับประทานยาทุกชนิดอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้ทั้งสิ้นไม่มากก็น้อย แพทย์ผู้ทำการวิจัยขอชี้แจงถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่อาจสัมพันธ์กับยาที่ศึกษาทั้งหมดดังนี้

มีข้อมูลที่แสดงว่ายาที่มีสารซิเทรตเป็นองค์ประกอบอาจมีผลกระทบต่อกระเพาะอาหาร โดยอาจทำให้มีการระคายเคืองกระเพาะอาหาร ดังนั้นระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัยจะมีการติดตามดูแลสุขภาพของท่านอย่างใกล้ชิด

กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่พบอาการระคายเคืองกระเพาะอาหาร เช่น อาการปวดแสบท้อง คลื่นไส้อาเจียน ระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัย ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสุขภาพของท่าน ท่านสามารถติดต่อผู้วิจัยหลัก นายพูนสิน พวงไพโรจน์ ได้ที่หมายเลขโทรศัพท์ (084) 644-3596

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือด (ซึ่งพบได้น้อยมาก)

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

<u>การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง</u>

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

<u>ประโยชน์ที่อาจได้รับ</u>

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ โดยตรงจากการเข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการให้การรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้ในอนาคต

<u>วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร</u>

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาหลายแบบ สำหรับการรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางกับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

<u>ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย</u> ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านงดการใช้ยาอื่นนอกเหนือจากที่ผู้ทำวิจัยได้จัดให้ รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาอื่นนอกเหนือจากยาที่ใช้ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านนำยาที่ใช้ในการศึกษาของท่านทั้งหมดที่เหลือจากการรับประทานมาให้ผู้ทำวิจัยทุกครั้งที่นัดหมายให้มาพบ

<u>อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย</u>

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอมไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถ

ติดต่อกับผู้ทำวิจัย คือ นายพูนสิน พวงไพโรจน์ ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

<u>ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย</u>

ท่านจะได้รับยาสูตรมะนาวผงในโครงการวิจัยโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย ในระหว่างการศึกษานี้ท่านจะได้รับเงินชดเชย ค่ายานพาหนะ และการเสียเวลา ตลอดจนความไม่สะดวกสบายในการเข้าร่วมการวิจัย โดยท่านจะได้รับเงินชดเชยรวมทั้งสิ้น 5,000 บาท โดยจะแบ่งจ่ายงวดแรกเป็นค่าเดินทางในวันตรวจคัดกรองว่าผ่านเกณฑ์ตามโครงการที่กำหนด จำนวน 500 บาท และงวดที่สองจะจ่าย เมื่อสิ้นสุดโครงการวิจัยจำนวน 4,500 บาท

<u>การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย</u>

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัย

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านรับประทานยาที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการศึกษา
- ท่านตั้งครรภ์ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย
- ท่านเกิดอาการข้างเคียง หรือความผิดปกติของผลทางห้องปฏิบัติการจากการได้รับยาที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านแพ้ยาที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้

<u>การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร</u>

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้ เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

<u>สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น

9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
ตัวอย่างใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ผลทางยาของสูตรมะนาวผงต่อเซลล์บุท่อไตที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึกนิ่ว และผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเทรต และภาวะต้านอนุมูลอิสระในอาสาสมัครสุขภาพดี

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่.....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย โดยทางคณะผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

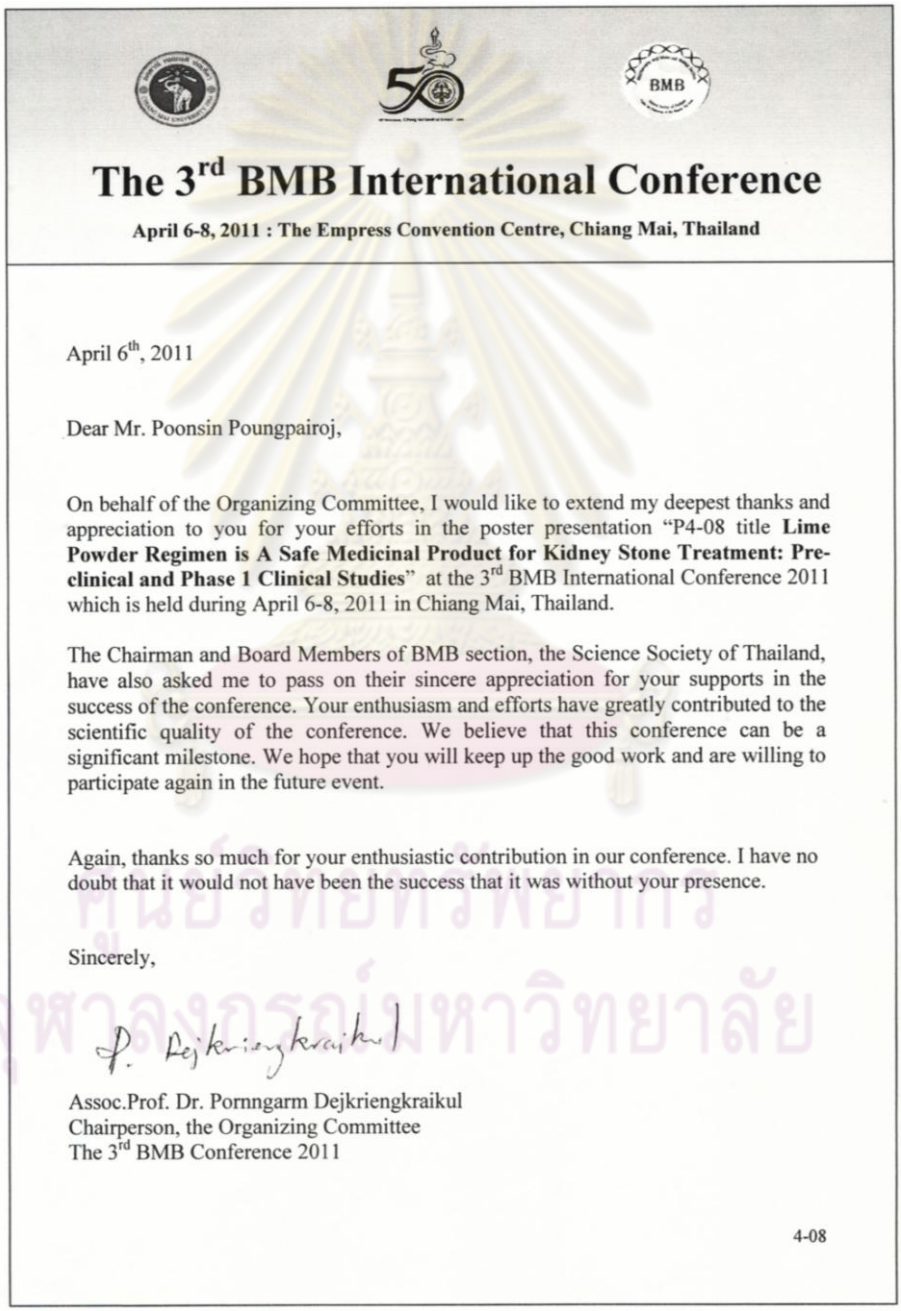
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ผลงานวิทยานิพนธ์จากการนำเสนอในการประชุมวิชาการนานาชาติทางชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล ครั้งที่ 3 (The 3rd Biochemistry and Molecular Biology Conference) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 6-8 เมษายน 2554 ณ ดิเอ็มเพรส คอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ จ.เชียงใหม่



The 3rd BMB International Conference

April 6-8, 2011 : The Empress Convention Centre, Chiang Mai, Thailand

April 6th, 2011

Dear Mr. Poonsin Poungpairoj,

On behalf of the Organizing Committee, I would like to extend my deepest thanks and appreciation to you for your efforts in the poster presentation "P4-08 title **Lime Powder Regimen is A Safe Medicinal Product for Kidney Stone Treatment: Pre-clinical and Phase 1 Clinical Studies**" at the 3rd BMB International Conference 2011 which is held during April 6-8, 2011 in Chiang Mai, Thailand.

The Chairman and Board Members of BMB section, the Science Society of Thailand, have also asked me to pass on their sincere appreciation for your supports in the success of the conference. Your enthusiasm and efforts have greatly contributed to the scientific quality of the conference. We believe that this conference can be a significant milestone. We hope that you will keep up the good work and are willing to participate again in the future event.

Again, thanks so much for your enthusiastic contribution in our conference. I have no doubt that it would not have been the success that it was without your presence.

Sincerely,

P. Dejkriengkraikul

Assoc.Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul
Chairperson, the Organizing Committee
The 3rd BMB Conference 2011

4-08

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นายพูนสิน พวงไพโรจน์
วัน เดือน ปีเกิด	25 พฤษภาคม 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ตำแหน่ง	นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีทาง-การแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปี พ.ศ.2551

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย