การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวและผลของการรักษาด้วยมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่ว

นางสาวธนิดา จิระมงคลศิริ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

GLOBAL DNA METHYLATION IN PERIPHERAL BLOOD CELL AND THE EFFECT OF LIME POWDER REGIMEN IN UROLITHIASIS PATIENT

Miss Thanida Chiramongkolsiri

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาว และผลของการรักษาด้วยมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่ว
โดย	นางสาวธนิดา จิระมงคลศิริ
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฎฐ์ ประพันธ์วัฒนะ ดร. นายแพทย์ ฐสิณัส ดิษยบุตร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฎฐ์ ประพันธ์วัฒนะ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. นายแพทย์ ฐสิณัส ดิษยบุตร)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัชฌาสัย ศิริตันติกร)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ธนิดา จิระมงคลศิริ : การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวและผลของการรักษาด้วยมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่ว. (GLOBAL DNA METHYLATION IN PERIPHERAL BLOOD CELL AND THE EFFECT OF LIME POWDER REGIMEN IN UROLITHIASIS PATIENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ, ดร. นพ. ฐสิณัส ดิษยบุตร, 4 หน้า.

บทนำ: อุบัติการณ์การเกิดโรคนิ่วไตเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก และมีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูง ในปัจจุบันยังไม่มีสารทางชีวภาพใดที่ช่วยบ่งชี้ระดับการอักเสบและความเสี่ยงในการเกิดนิ่วซ้ำ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในดีเอ็นเอเม็ดเลือดขาว ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและเมแทบอไลท์ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติ และศึกษาผลของยาสูตรมะนาวผง (LPR) ต่อระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบ

ระเบียบวิธีวิจัย: ผู้เข้าร่วมโครงการจำนวน 100 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Renal stone patients; RSP) จำนวน 50 รายและกลุ่มควบคุมจำนวน 50 ราย (Control) ผู้เข้าร่วมโครงการได้รับการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยเก็บครั้งเดียวในกลุ่มควบคุม (Control group: 50 คน) และสามครั้งในกลุ่ม RSP ประกอบด้วย ระยะก่อนผ่าตัดนำนิ่วออก (RS group: 50 คน) ระยะหลังผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกและก่อนรับสูตรมะนาวผง (LPR0 group: 36 คน) และระยะหลังได้รับยาสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลา 6 เดือน (LPR6 group: 36 คน) จากนั้นทำการวิเคราะห์ระดับร้อยละ 5-methylcytosine (5-mC%) ของ DNA ในเม็ดเลือดขาว ตรวจวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมา และตรวจวัดระดับ IL-8 ครีเอตินิน สารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAS) ซิเทรตออกซาเลต กรดยูริก และโปรตีนในปัสสาวะ

ผลการวิจัย: RS มีระดับ 5-mC%, IL-8, protein carbonyl, ออกซาเลต, กรดยูริก และโปรตีน สูงกว่า Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.015$, $p<0.001$, $p<0.001$ และ $p=0.022$ ตามลำดับ) และมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และซิเตรทในปัสสาวะ ต่ำกว่า control ($p<0.001$) และพบว่าระดับ 5-mC% มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ IL-8 ($r=0.378$, $p<0.001$) ในขณะที่ทั้ง 5-mC% และ IL-8 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับออกซาเลต กรดยูริกและโปรตีน และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ TAS และซิเตรทอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การศึกษาผลของยาสูตรมะนาวผงต่อระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบ พบว่า LPR6 มีระดับ 5-mC% และระดับ IL-8 ต่ำกว่า LPR0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.014$ และ $p=0.005$ ตามลำดับ) เมื่อวิเคราะห์คุณค่าทางการวินิจฉัยของตัวบ่งชี้ระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบ พบว่า 5-mC% มีค่า AUC เท่ากับ 0.8155 (95% CI; 0.7110-0.8870) ที่ค่า cutoff 0.5% มีค่า sensitivity เท่ากับ 68.00% และค่า specificity เท่ากับ 74.00% สำหรับ IL-8 มีค่า AUC เท่ากับ 0.9514 (95% CI; 0.9408-1.000) ที่ค่า cutoff 247.1 pg/mg Cr มีค่า sensitivity เท่ากับ 94.00% และค่า specificity เท่ากับ 92.00%

สรุปผลการวิจัย: รายงานนี้เป็นรายงานการศึกษาแรกเกี่ยวกับระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ซึ่งพบว่ามีระดับที่สูงเมื่อเทียบกับคนปกติ และสัมพันธ์กับตัวบ่งชี้การอักเสบ IL-8 ในปัสสาวะ ข้อมูลวิจัยนี้ชี้แนะว่าการตรวจวัดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและการวัดปริมาณ IL-8 น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้เพิ่มเติมเพื่อติดตามโรคนิ่วไตกลับเป็นซ้ำได้ และอาจมีประโยชน์ในการช่วยติดตามผลการรักษาโรคนิ่วไตในอนาคต

ภาควิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต ....
สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....
ปีการศึกษา 2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....
	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

5574200230 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY
KEYWORDS: LIME POWDER REGIMEN (LPR) / EPIGENETICS / DNA METHYLATION / GLOBAL DNA METHYLATION / OXIDATIVE STRESS / INTERLEUKIN-8

THANIDA CHIRAMONGKOLSIRI: GLOBAL DNA METHYLATION IN PERIPHERAL BLOOD CELL AND THE EFFECT OF LIME POWDER REGIMEN IN UROLITHIASIS PATIENT. ADVISOR: PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, CO-ADVISOR: ASST. PROF. DR. PHISIT PRAPUNWATTANA, DR. THASINAS DISSAYABUTR, M.D., 4 pp.

Introduction: Renal stone disease is an emerging disease worldwide, with high recurrent rate. However, no biomarker can be used for evaluate the risk of stone recurrence. We investigated leukocyte global DNA methylation, urinary inflammation, oxidative stress and metabolites in renal stone patients, and the effect of Lime Powder Regimen (LPR) on global DNA methylation levels and inflammation.

Methods: One hundred participants, including 50 renal stone patients (RSP) and 50 healthy controls (Control group) were enrolled. Blood and 24-hour urine were collected once in Control group, and three times in RSP, including pre-operative period (RS group), post-operative and before-LPR treatment (LPR0 group), and after treatment with LPR for 6 months (LPR6). The percentage of 5-methylcytosine levels (5-mc%) in leukocyte DNA, levels of plasma protein carbonyl, levels of urinary IL-8, creatinine, total antioxidant status (TAS), citrate, oxalate, uric acid and protein were measured.

Results: The 5-mC%, IL-8, protein carbonyl, oxalate, uric acid, and protein were significantly higher in RS group than Control group ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.015$, $p<0.001$, $p<0.001$ and $p=0.022$, respectively), while the TAS and urinary citrate were lower ($p<0.001$). We found the positive correlation between 5-mC% and IL-8 ($r=0.378$, $p<0.001$), as well as the positive correlation between 5-mC% and IL-8 with the urinary oxalate, uric acid and protein, and the negative correlation with urinary TAS and citrate. In addition, the study about the effect of LPR on global DNA methylation and inflammation, we found that LPR6 had significant lower levels of 5-mC% and IL-8 than LPR0 ($p=0.014$ and $p=0.005$, respectively). In the aspect of Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis, the AUC of 5-mC% on renal stone disease was 0.8155 (95% CI; 0.7110-0.8870) at the cutoff point of 0.5%, with the sensitivity of 68.00% and specificity of 74.00%. While the AUC of IL-8 on renal stone disease was 0.9514 (95% CI; 0.9408-1.000) at the cutoff point of 247.1 pg/mg creatinine, with the sensitivity of 94.00% and specificity of 92.00%.

Conclusion: This was the first report to demonstrate the level of leukocyte global DNA methylation in renal stone patients which was higher than healthy controls, and positively associated with urinary IL-8. Our data suggested that the levels of global DNA methylation and urinary IL-8 could be used as a biomarker for recurrent renal stone disease, and the measurement of global DNA methylation and urinary IL-8 might be useful for RSP follow-up.

Department:	Biochemistry	Student's Signature	....
Field of Study:	Medical Biochemistry	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2013	Co-Advisor's Signature	....
		Co-Advisor's Signature	....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำ ให้คำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่มและการนำเสนอ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ และ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ ฐสิณัส ดิษยบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและให้ข้อแนะนำที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ที่ยินดีเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัชฌาสัย ศิริตันติกร อาจารย์ประจำภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณะแพทย์ และพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพประสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการคัดกรองผู้เข้าร่วมโครงการ ตลอดการการสัมภาษณ์ และการเก็บสารตัวอย่างในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถาวร สุภาพรม และผู้ช่วยศาสตราจารย์แก้ว อุดมศิริชาคร อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการติดต่อประสานงาน ปั่นแยกเลือดและปัสสาวะ ตรวจวัดปริมาตรปัสสาวะ รวมทั้งจัดส่งสารตัวอย่างมายังคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ คุณพงศักดิ์ พันธุ์สิน นักเทคนิคการแพทย์ หน่วยโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ให้คำแนะนำ และช่วยในการวิเคราะห์ระดับครีเอตินินในปัสสาวะ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านทั้งในและนอกภาควิชาชีวเคมี ที่ช่วยเหลือ ให้ความเมตตาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ นางสาวชญาณัฐ โพธิ์นอก นักวิเคราะห์สถิติ ฝ่ายบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้ความรู้และคำปรึษาการวิเคราะห์สถิติในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.รุ่งนภา หิรัญสถิต และนายเฉลิมพล ศรีจอมทอง นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชากุมารเวชศาสตร์ ตึกสิริกิตติ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และคำปรึกษาในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

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

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นผู้อุปการะทุกๆด้านของชีวิต ขอบคุณญาติ พี่ น้อง เพื่อนๆระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และเพื่อนๆในห้องทดลองทุกคน ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญภาพ .... ฌ

สารบัญตาราง .... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

ขอบเขตของการวิจัย 4

ข้อตกลงเบื้องต้น 4

ข้อจำกัดของการวิจัย 4

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

วิธีดำเนินการวิจัย 6

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

โรคนิ่วไต 7

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน 8

นิ่วไตกับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน 9

นิ่วไตกับการอักเสบ 9

ไซโตไคน์และเคโมไคน์ (cytokine and chemokine) 10

เอพิเจเนติก (epigenetics) 11

ยาสูตรมะนาวผง 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 14

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population) 14

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ 18

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ........ 19

การวิเคราะห์ข้อมูล........ 22

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 24

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ........ 46

รายการอ้างอิง 51

ภาคผนวก........ 59

ภาคผนวก ก........ 60

ภาคผนวก ข 62

ภาคผนวก ค........ 67

ภาคผนวก ง 69

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 สมมติฐานความสัมพันธ์ระหว่างโรคนิ่วและโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางเมแทบอลิก 3
ภาพที่ 2 กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน 12
ภาพที่ 3 กราฟ ROC เกิดจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราผลบวกจริง (sensitivity) และอัตราผลบวกเท็จ (specificity) 23
ภาพที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว 26
ภาพที่ 5 ROC curve analysis เพื่อหาค่า cutoff ของ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว 27
ภาพที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับ IL-8 ในปัสสาวะ 29
ภาพที่ 7 ROC curve analysis เพื่อหาค่า cutoff ของระดับ IL-8 ในปัสสาวะ... 30
ภาพที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ในพลาสมา 32
ภาพที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับ TAS ในปัสสาวะ.. 33
ภาพที่ 10 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณซิเตรทในปัสสาวะ 34
ภาพที่ 11 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ 35
ภาพที่ 12 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะ 36
ภาพที่ 13 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ 37
ภาพที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 5-mC% กับตัวบ่งชี้ชีวภาพต่างๆ ในปัสสาวะของ RS และ control... 40
ภาพที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ IL-8 กับตัวบ่งชี้ชีวภาพต่างๆ ในปัสสาวะของ RS และcontrol43
ภาพที่ 16 ผลของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ 5-mC% 44
ภาพที่ 17 ผลของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ IL-8 ผู้ป่วยโรคนิ่วไต....................................... 45

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระในมะนาวผง (5 กรัมต่อซอง) 13
ตารางที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 16
ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย... 17
ตารางที่ 4 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มประชากรศึกษา 24
ตารางที่ 5 ชนิดของนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไต.. 25
ตารางที่ 6 ผลการจำแนกกลุ่มประชากรตามค่า cutoff ของ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว.......................... 27
ตารางที่ 7 ผลการจำแนกกลุ่มประชากรตามค่า cutoff ของระดับ IL-8 ในปัสสาวะ 30
ตารางที่ 8 ความเสี่ยงของระดับ 5-mC% และระดับ IL-8 ต่อการเกิดโรคนิ่วไต.. 31

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคนิ่วไต (kidney stone disease, renal stone disease, nephrolithiasis หรือ urolithiasis) เป็นโรคนิ่วระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยมีอุบัติการณ์ของโรคแตกต่างไปตามแต่ละภูมิภาค (1) ซึ่งโรคนิ่วระบบทางเดินปัสสาวะถือเป็นปัญหาสาธารณสุขของไทยมายาวนาน โดยเฉพาะในชุมชนชนบทของไทยมีรายงานความชุกของโรคนิ่วไตตั้งแต่ร้อยละ 0.42 ถึงร้อยละ 17 ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดเพียงอย่างเดียว พบว่า มีอัตราการเกิดนิ่วซ้ำสูงในต่างประเทศมีรายงานพบร้อยละ 50 ในระยะ 5-10 ปีและสูงขึ้นเป็นร้อยละ 75 ในระยะเวลา 15 ปี (2) สำหรับในประเทศไทยที่โรงพยาบาลขอนแก่น พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำสูงถึงร้อยละ 24 และ 39 ภายหลังผ่าตัด 1 และ 2 ปีตามลำดับ (3) การเกิดนิ่วซ้ำและการผ่าตัดนิ่วหรือสลายนิ่วบ่อยๆ ส่งผลให้การทำงานของไตเสื่อมลง จนถึงเกิดภาวะไตวายเรื้อรังที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีสาเหตุจากหลายปัจจัย (multifactorial disease) อาจมีสาเหตุจากปัจจัยภายใน (intrinsic factors) ได้แก่ พันธุกรรม กายวิภาคของไต เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย เชื้อชาติ และโรคประจำตัวอื่น อาทิเช่น กลุ่มโรคทางเมแทบอลิก อันได้แก่ ภาวะอ้วน ความดันเลือดสูง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบและโรคเบาหวาน เป็นต้น หรือปัจจัยภายนอก (extrinsic factors) ได้แก่ พฤติกรรมการบริโภคอาหารและน้ำ ยา ภูมิอากาศ อาชีพ และความเครียด เป็นต้น หรืออาจร่วมกันทั้ง 2 สาเหตุ (4) ส่งผลให้มีความผิดปกติทางเมแทบอลิก (metabolic abnormalities) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายภาวะร่วมกันในปัสสาวะ (5) ทำให้เกิดความไม่สมดุลของปริมาณสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ เรียกว่า เกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิกของการเกิดนิ่ว

การรักษาโรคนิ่วทางศัลยกรรม ได้แก่ การสลายนิ่วและการผ่าตัด มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดก้อนนิ่วออก ไม่ใช่การรักษาที่สาเหตุของการเกิดนิ่ว (causative treatment) ผู้ป่วยมีโอกาสกลับเป็นนิ่วซ้ำได้เหมือนเดิม ถ้าไม่รักษาต่อเนื่องรวมทั้งไม่ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมทั้งการบริโภคอาหารและน้ำ เมื่อต้องสลายนิ่วซ้ำทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรัง ส่งผลต่อการเกิดโรคไตวายเรื้อรังตามมา ดังนั้นผู้ป่วยควรได้รับการรักษาด้วยยาร่วมด้วยเพื่อป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ ยาโพแทสเซียมซิเตรท(potassium citrate) หรือเกลือซิเตรทในรูปอื่นเป็นยาที่นิยมใช้ในปัจจุบันสำหรับป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ กลไกการออกฤทธิ์ของยาคือจะทำให้ปัสสาวะมีความเป็นด่างมากขึ้น (alkalinizing effect) และเพิ่มปริมาณการขับออกของซิเตรทในปัสสาวะ (citraturic effect) สามารถลดการเกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะและลดอัตราการเกิดนิ่วซ้ำได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามยาโพแทสเซียมซิเตรทมีผลข้างเคียง (side

effects) ต่อผู้ป่วยมาก เช่น ระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ปวดหัว เป็นต้น ต่อมา ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และคณะได้พัฒนาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคนิ่ว โดยผลิตยาสูตรมะนาวผง (lime powder regimen, LPR) ที่มีปริมาณซิเตรท63 mEq ต่อซอง และโพแทสเซียม 21 mEq ต่อซอง เป็นขนาดที่ใกล้เคียงที่มีการแนะนำให้ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่ายาสูตรมะนาวผงมีฤทธิ์ alkalinizing และ citraturic actions และสามารถยืดระยะเวลาการเกิดนิ่วซ้ำ (recurrence-free period) และลดระดับความเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้ (6)

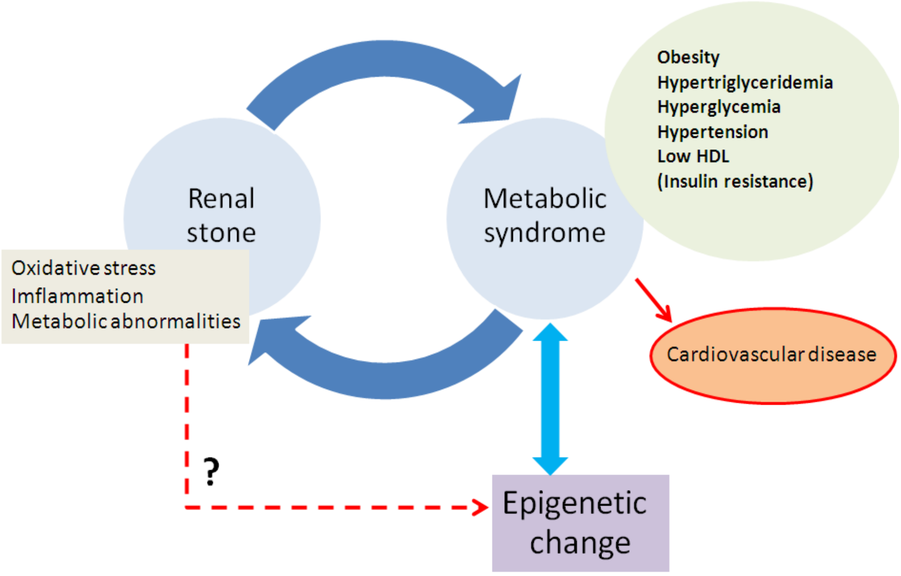
เป็นที่ทราบดีแล้วว่าสารก่อนิ่วและผลึกนิ่ว เช่น ออกซาเลตหรือผลึกแคลเซียมออกซาเลต จะทำให้เซลล์บุท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) เพิ่มมากขึ้นจนทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (7) ซึ่งการเกิดอนุมูลอิสระส่งผลให้เซลล์บุท่อไตถูกทำลาย ส่งเสริมให้มีการติดค้างของผลึกในท่อไตสูงขึ้น (8) นอกจากนี้สารอนุมูลอิสระและผลึกนิ่วยังกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตหลั่งสารตัวกลางอักเสบ เช่น cytokines และ chemokines เพื่อดึงดูดให้เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาช่วยกำจัดผลึกนิ่ว ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบมีความสัมพันธ์กัน (9) ในปี 2010 Suen และคณะ(10) ตรวจวัดตัวบ่งชี้การอักเสบในผู้ป่วยโรคนิ่วเทียบกับคนปกติ โดยตรวจวัด cytokines และ chemokines หลายชนิดพบว่า interleukin-8 (IL-8) เป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างชัดเจนระหว่างผู้ป่วยและคนปกติ

ความเครียดจากออกซิเดชันมีผลต่อกระบวนการเมทิลเลชันของ DNA ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการควบคุมเหนือพันธุกรรม (epigenetic change) ที่เกิดจากการเติมหมู่เมทิลให้กับนิวคลีโอไทด์ชนิด cytosine (C) บริเวณ CpG islands การเติมหมู่เมทิลของ DNA อาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) โดยได้รับหมู่เมทิลจาก S-adenosyl methionine (SAM) กระบวนการนี้มักเกิดที่ตำแหน่งทรานสคริปชันโปรโมเตอร์ (transcription promoter) ของยีน ซึ่งจะทำให้ยีนนั้นไม่มีการแสดงออก (gene silencing) ระดับการเติมหมู่เมทิลมี 2 แบบ ได้แก่ ระดับการเติมหมู่เมทิลลดลง (hypomethylation) และระดับการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้น (hypermethylation) สำหรับเซลล์ปกตินั้นการเกิดเมทิลเลชันมักจะเกิดที่เบส cytosine บริเวณที่มีรหัสของยีนและไม่พบที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์บริเวณ CpG islands แต่ในเซลล์มะเร็งกลับพบภาวะเมทิลเลชันระดับสูงบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน (promoter hypermethylation) และพบภาวะเมทิลเลชันในระดับต่ำทั่วทั้งจีโนม (global DNA hypomethylation) (11, 12)

เนื่องจากเมื่อเร็วๆนี้มีรายงานว่าสิ่งแวดล้อมและการบริโภคอาหารเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการควบคุมเหนือลำดับเบส ส่งผลต่อยีนก่อโรคต่างๆ ทั้งโรคมะเร็งและโรคที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่รวมเรียกว่า เมแทบอลิกซินโดรม (metabolic syndrome) การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเหนือระดับพันธุกรรม ได้แก่ รายงาน DNA methylation เป็นตัวบ่งชี้ของโรคหลอดเลือดหัวใจ (13) โรคความดันเลือดสูง (14) โรคไขมันในเลือดสูง (15) โรคอ้วน (16, 17)

โรคเบาหวานและภาวะดื้อต่ออินซูลิน (18, 19) ปัจจุบันเป็นที่ทราบดีว่าโรคกลุ่มเมแทบอลิกมีความสัมพันธ์กับโรคนิ่วไต นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษานิ่ว จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงภายใน 20 ปี มากกว่าคนปกติ (19) ความเชื่อมโยงหนึ่งที่อธิบายความสัมพันธ์การเกิดกลุ่มโรคเมแทบอลิกกับโรคนิ่วไต ได้แก่ ภาวะดื้อต่ออินสุลินทำให้ปัสสาวะเป็นกรดและมีซิเตรทในปัสสาวะต่ำ (20, 21)

เนื่องจากปัจจุบันมีหลายการศึกษาที่หาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงเหนือลำดับเบสในเม็ดเลือดขาวกับโรคต่างๆ การสูบบุหรี่ การดื่มสุรา ภาวะอักเสบ การติดเชื้อ การบริโภคอาหาร และการขาดสารอาหาร เป็นต้น (22) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงการควบคุมเหนือลำดับเบสในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และตั้งสมมติฐานว่าโรคนิ่วไตซึ่งจัดเป็นหนึ่งในโรคที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิกน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเหนือระดับพันธุกรรมเกิดขึ้นร่วมด้วย ดังที่แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สมมติฐานความสัมพันธ์ระหว่างโรคนิ่วและโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางเมแทบอลิก

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงเหนือระดับพันธุกรรม ตัวบ่งชี้ภาวะการอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและเมแทบอไลท์ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติ อีกทั้งผู้วิจัยยังต้องการศึกษาผลของการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลานาน 6 เดือนต่อการเปลี่ยนแปลงการควบคุมเหนือลำดับเบสและภาวะอักเสบในผู้ป่วยโรคนิ่วไตโดยผู้วิจัยคาดหวังว่าการเปลี่ยนแปลงเหนือระดับพันธุกรรมในผู้ป่วยโรคนิ่วไตอาจจะมีความสัมพันธ์

กับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของภาวะต่างๆ ดังที่กล่าวข้างต้น และเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิกหลายชนิดได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติ
- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์
- เพื่อศึกษาผลของการให้ยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ขอบเขตของการวิจัย

สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาว พลาสมาและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมในโครงการวิจัย เรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ซึ่งยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ

ข้อตกลงเบื้องต้น

- เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมือนั้นๆ
- สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาว พลาสมาและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมในโครงการวิจัย เรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ

ข้อจำกัดของการวิจัย

สารตัวอย่างที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นสารตัวอย่างจากโครงการวิจัย เรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ซึ่งได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคนด้านการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข โดยมีรหัสโครงการ ได้แก่ 171 (14-2554)

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Lime powder regimen (LPR) คือ สูตรมะนาวผงที่คิดค้นโดย ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์และอาจารย์สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ซึ่งผลิตที่เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยแปรรูปน้ำมะนาวและเติมสารให้มีอัตราส่วนโพแทสเซียมให้ได้ 21 มิลลิอิควิวาเลนท์ และซิเตรท63 มิลลิอิควิวาเลนท์ ต่อซอง (5 กรัม) และทำให้อยู่ในรูปของผงมะนาวโดยวิธีการอบแห้งแบบแช่แข็งหรือการอบแห้งโดยการระเหิด (freeze-dried method)
- Epigenetics หรือการควบคุมเหนือพันธุกรรม เป็นการควบคุมการแสดงออกที่ไม่เกี่ยวข้องกับลำดับเบส (sequence) ของยีน ตัวอย่างเช่น การดัดแปลงโครมาติน (chromatin modification) การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation) เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของยีน
- DNA methylation ปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอ เป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอโดยการเติมหมู่เมทิลไปแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน (cytosine) และเบสเป็นเบสไซโตซีนที่อยู่ติดกับเบสกัวนีน (guanine) (CpG dinucleotide) โดยการเติมหมู่เมทิลต้องอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT)
- Global DNA methylation การศึกษาการเติมหมู่เมทิลของ DNA ทั้งจีโนม ระดับการเติมหมู่เมทิล ได้แก่ ระดับการเติมหมู่เมทิลลดลง (hypomethylation) และระดับการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้น (hypermethylation)
- Oxidative stress หรือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ ภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ มีระดับสารอนุมูลอิสระสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ทำให้สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและถูกทำลายตามมา
- Interleukin-8 เป็น chemokine ประกอบด้วย 99 กรดอะมิโน เป็นสมาชิกใน CXC family มี cysteine 2 ตัวขั้นด้วยกรดอะมิโนอื่น 1 ตัว มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ T lymphocytes และ basophils เหนี่ยวนำให้ neutrophils หลั่ง lysosomal enzymes ในภาวะที่ถูกกระตุ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวและภาวะอักเสบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติ
- ทราบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์

- ทราบผลของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เกี่ยวข้องกับกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติจากโครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต" ซึ่งทำการรวบรวมสารตัวอย่างเม็ดเลือดขาว พลาสมาและปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โดยสารตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตประกอบด้วย 3 ระยะ ได้แก่

ระยะที่ 1 เป็นผู้ป่วยก่อนผ่าตัดนำนิ่วออก (RS group) จำนวน 50 คน

ระยะที่ 2 เป็นผู้ป่วยหลังผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกเป็นระยะเวลา 1 เดือนและได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีก้อนนิ่วเหลืออยู่ จากนั้นถูกสุ่มเลือกเพื่อรับยาสูตรมะนาวผง (LPR0 group) จำนวน 36 คน

ระยะที่ 3 เป็นผู้ป่วยภายหลังได้รับยาสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน (LPR6 group) จำนวน 36 คน

กลุ่มควบคุม (Control group) ได้แก่ คนปกติซึ่งไม่ป่วยเป็นโรคนิ่วไตและอยู่ในภูมิลำเนาเดียวกับผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ จำนวน 50 คน

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวมรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์
2. จัดทำนิพนธ์ต้นฉบับภาษาไทย (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารยูโร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคนิ่วไต

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่พบมากในอัตราตั้งแต่ร้อยละ 1-20 ของประชากรในโลก และเป็นปัญหาที่พบไม่เพียงแต่ในประเทศในแถบโลกที่สามแถบเอเชียและอัฟริกาเหนือเท่านั้น แต่เป็นโรคที่สามารถพบได้แม้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหราชอาณาจักร ประเทศในแถบยุโรปและคาบสมุทรสแกนดิเนเวียและสหรัฐอเมริกาอีกด้วย ประเทศไทยพบอุบัติการณ์เกิดร้อยละ 0.42-17 (2, 23, 24) ซึ่งพบอุบัติการณ์สูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (25)

นิ่วเกิดจากปัสสาวะมีความอิ่มตัวยวดยิ่งของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาเลต ยูเรต สภาวะที่มีสารก่อนิ่วเหล่านี้มีอยู่ในปัสสาวะมากเกินไป เช่น ภาวะ hypercalciuria ซึ่งอาจจะเกิดจากการสลายแคลเซียมในกระดูกที่มากเกินไป ส่งผลให้แคลเซียมเข้าสู่กระแสเลือดและไหลเวียนไปสู่ไตมากขึ้น จึงถูกขับออกมาในปัสสาวะมาก จากนั้นแคลเซียมจะรวมตัวกับสารก่อนิ่วที่ประจุลบอื่นๆ เช่น ออกซาเลต ฟอสเฟต เป็นต้น กลายเป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ และตกตะกอนกลายเป็นนิ่วในที่สุด (26, 27) ส่วนสารที่ป้องกันการก่อผลึกในปัสสาวะเรียกว่า “สารยับยั้งนิ่ว” ซึ่งสารยับยั้งนิ่วที่สำคัญได้แก่ ซิเตรท โพแทสเซียมและแมกนีเซียม หากสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะสูงเพียงพอจะสามารถยับยั้งการก่อตัวของผลึกนิ่วได้ โดยสารยับยั้งนิ่วจะไปแย่งจับกับสารก่อนิ่ว เช่น ซิเตรทจับกับแคลเซียม หรือ แมกนีเซียมจับกับออกซาเลต ทำให้เกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีและขับออกไปพร้อมกับน้ำปัสสาวะ แต่ในผู้ป่วยโรคนิ่วพบว่า มีระดับสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะต่ำ ซึ่งน่าจะเป็นเหตุส่งเสริมให้เกิดการตกตะกอนของสารก่อนิ่วได้ง่ายขึ้น (6) ปัจจัยเสี่ยงด้านความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคนิ่วในไตของคนไทย คือ การมีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะต่ำ ได้แก่ ภาวะซิเตรทในปัสสาวะต่ำพบประมาณร้อยละ 70-90 และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำพบประมาณร้อยละ 40-60 (28-30) นอกจากนี้การเกิดนิ่วอาจเกิดจากสาเหตุอื่นได้แก่

-การตีบแคบของทางเดินปัสสาวะ ทำให้มีปัสสาวะคั่งค้างภายในไต (31)

-ความเข้มข้นของน้ำปัสสาวะ เกิดเนื่องจากผู้ป่วยดื่มน้ำน้อยกว่าปกติ หรือสูญเสียน้ำออกจากร่างกายมากกว่าปกติ ผู้มีอาชีพเกษตรกรทำงานกลางแจ้งจะมีการเสียเหงื่อมาก ทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นสูง โอกาสที่สารละลายในปัสสาวะจะตกผลึกจึงมีมากขึ้นและอาจเกี่ยวข้องกับเกลือแร่ที่ละลายอยู่ในน้ำที่ใช้ดื่ม การออกกำลังกายอย่างหนักทำให้มีการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ไปกับเหงื่อทำให้ปัสสาวะจะมีปริมาณซิเตรทต่ำ ซึ่งการขาดซิเตรททำให้แคลเซียมรวมกับออกซาเลตเป็นแคลเซียมออกซาเลต หรือแคลเซียมรวมกับฟอสเฟตเป็นแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งละลายน้ำได้ไม่ดี (6, 32)

-ความเป็นกรดด่างของปัสสาวะ กรดยูริกจะตกตะกอนได้ดีในปัสสาวะที่ pH ต่ำกว่า 5.5 ในขณะที่ปตกตะกอนได้ดีในปัสสาวะที่ pH 5.5-7.5 และแคลเซียมฟอสเฟตตกตะกอนได้ดีในปัสสาวะที่ pH สูงกว่า 7.5 ซึ่งคนปกติในช่วง 06.00 น. ปัสสาวะจะมีความเป็นกรดที่ pH 5.2 ในช่วง 18.00 น. จะมีความเป็นกลาง pH 7.0 จึงมีโอกาสเกิดผลึกได้ทั้งผลึกกรดยูริกและผลึกแคลเซียมซึ่งการรวมตัวกันของผลึกทำให้เกิดเป็นก้อนนิ่วในที่สุด (2)

-ยาบางชนิดทำให้เกิดนิ่วได้ เช่น ยาขับปัสสาวะ ยากลุ่ม carbonic anhydrase inhibitors ยาระบายหรือยาลดกรดที่รับประทานอยู่เป็นเวลานานทำให้เกิดนิ่วด้วยกลไกผ่านทางเมแทบอลิก (33, 34)

-โภชนาการและรูปแบบการดำเนินชีวิต พบว่า มีผลต่อการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะ ค่าความอิ่มตัวยวดยิ่งของแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะแปรผันตรงกับค่าดัชนีมวลกาย (BMI) (2)

นิ่วไตสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของก้อนนิ่ว คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ ซึ่งพบมากที่สุดประมาณร้อยละ 70-80 (35)ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต นิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอตเฟต หรือแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก นิ่วอีกชนิดคือ นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ พบประมาณร้อยละ 15-20 ได้แก่ นิ่วกรดยูริก นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และนิ่วซีสตีน (36)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ ภาวะของความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระและกระบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระในเซลล์ หรือร่างกายโดยเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระ (32) ทำให้มีอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เป็นผลิตผลของอนุมูลอิสระอันมีความไวและอันตรายในปริมาณที่สูง เกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะต้านทานไว้ได้ ทำให้เซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ถูกคุกคามจากการถูกออกซิไดส์ และเมื่อถูกออกซิไดส์เซลล์จะบาดเจ็บและถูกทำลาย สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุลมี 2 สาเหตุ คือ

- ความบกพร่องของกระบวนการป้องกันอันตรายจากการเกิดออกซิเดชัน โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระลดลง เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมีปริมาณลดลงหรือการทำงานผิดไปจากปกติ ซึ่งสาเหตุของการเกิดความบกพร่อง ได้แก่ การกลายพันธุ์ ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถของเอนไซม์ในการทำหน้าที่ต้านออกซิเดชัน เช่น superoxide dismutase, glutathione peroxidase สูญเสียการทำงาน หรือมีการสูญเสียสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในกระบวนการป้องกันอนุมูลอิสระ เช่น glutathione วิตามินซี วิตามินอี ไม่เพียงพอด้วยสาเหตุต่างๆ รวมถึงการขาดสารอาหารและแร่ธาตุ เช่น Zn, Mg, Fe, Co, Se และสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ เช่น สารประกอบโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยส์

- มีการเกิดหรือผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น เช่น การที่ร่างกายได้รับออกซิเจนมากเกินไป หรือมีการกระตุ้นระบบที่สร้างอนุมูลอิสระ เช่น ในภาวะที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง phagocyte จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดอนุมูลอิสระและผลิตผลที่เกี่ยวข้องจำนวนมาก มีผลทำให้เกิดความเสียหายและการถูกทำลาย (37)

นิ่วไตกับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

สารก่อนิ่วและผลึกสามารถกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การศึกษาของ Habibzadegah-Tari และคณะรายงานว่า ผลึกแคลเซียมออกซาเลตกระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) สังเคราะห์ ROS เพิ่มมากขึ้น (38) ซึ่ง ROS สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลต่างๆได้ ซึ่งส่งเสริมการทำลายและการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไต งานวิจัยของ Boonla และคณะ (39) ศึกษาระดับการขับออกของ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ 8-OHdG สูงกว่ากลุ่มคนปกติ ซึ่งปริมาณของ 8-OHdG ที่สูงในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต แสดงให้เห็นถึงการทำลาย DNA จากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative DNA damage) นอกจากนี้ปริมาณของ 8-OHdG ในปัสสาวะที่สูงขึ้นยังมีความสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของท่อไตที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงให้เห็นทางคลินิกว่า โรคนิ่วสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตที่สูงขึ้น

นิ่วไตกับการอักเสบ

โดยกลไกการป้องกันของร่างกาย (body defense mechanism) ผลึกนิ่วที่เกิดขึ้นในปัสสาวะจะถูกนำเข้าเซลล์บุท่อไตและถูกย่อยสลายโดยไลโซโซม หากผลึกมีปริมาณมาก (chronic crystal overload) จะถูกส่งต่อไปยัง renal interstitium ทำให้เกิดกลุ่มผลึกในเนื้อไต (interstitial nephrocalcinosis หรือ Randall’s plaques) ผลึกนิ่วปริมาณมากสามารถกระตุ้นเซลล์บุผิวท่อไตให้หลั่งสาร เพื่อไปดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะ monocytes เข้ามากำจัดผลึกนิ่ว ทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ (inflammation) และส่งผลให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตและเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มการสังเคราะห์สารตัวกลางของการอักเสบมากขึ้น เช่น monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) interleukin 6 (IL-6) prostaglandin E_2 และ osteopontin เป็นต้น (40) หลายงานวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ที่กระตุ้นเซลล์ด้วยผลึกแคลเซียมออกซาเลต พบว่า มีการแสดงออกของ MCP-1 มากขึ้น และเมื่อมีปริมาณของแคลเซียมออกซาเลตมากขึ้น เซลล์บุท่อไตจะถูกทำลายมากขึ้น (38, 41-43) การศึกษาในสัตว์ทดลองโดย De Water และคณะ (44) พบว่าผลึกนิ่วใน

ท่อไตจะเคลื่อนเข้าสู่ renal interstitium เพื่อดึงดูดเซลล์อักเสบต่างๆ เข้ามาใน intersitium ส่งผลกระตุ้นการอักเสบ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะหลั่ง chemokines และ cytokines ทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้นและเซลล์บุท่อไตถูกทำลายมากขึ้น ทำให้ไตสูญเสียหน้าที่ ดังนั้นการเกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเกิดการบาดเจ็บและเกิดภาวะอักเสบ รวมทั้งกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซม โดยเฉพาะส่วนที่มีผลึกเกาะและเนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการเสียหายมาก ส่งผลให้เกิดพังผืด (fibrosis) ในที่สุด (45) ในปี 2010 Suen และคณะ (10) ตรวจวัดตัวบ่งชี้การอักเสบในปัสสาวะในผู้ป่วยโรคนิ่วเทียบกับคนปกติ พบว่า IL-8 เป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างชัดเจนระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วและคนปกติ

ไซโตไคน์และเคโมไคน์ (cytokine and chemokine)

cytokine และ chemokine จัดเป็นโปรตีนที่ถูกปล่อยออกมาในขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลง และในการทำหน้าที่ต่างๆที่จะเป็นตัวควบคุม เป็นตัวกำหนดการทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันและควบคุมการเกิด Trafficking ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและการจัดเรียงตัวของเซลล์ในอวัยวะที่เกี่ยวข้อง cytokine จะถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการตอบสนองในขณะที่ร่างกายเกิดการบาดเจ็บหรือไม่ก็เป็นการตอบสนองต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยจะทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางและเป็นตัวควบคุมในกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกัน กลไกการทำงานของ cytokine คือ จะไปจับที่ตัวรับที่อยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความจำเพาะและจะมีการส่งสัญญาณผ่านขบวนการ secondary messengers โดยเฉพาะพวก Tyrosine Kinase กระตุ้นให้มีการตอบสนองให้มีการปล่อย cytokine ออกมามากขึ้น สมาชิกในกลุ่มของ cytokine เช่น IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TGF-β, TNF เป็นต้น สำหรับ chemokine จัดเป็นโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่ง โดยจะทำหน้าที่ไปกระตุ้น leukocytes ในบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บหรือติดเชื้อ โดยโครงสร้างจะมีส่วนที่เป็น cysteine residues ที่จะเป็นตัวกำหนดความแตกต่างกันของแต่ละกลุ่มของ chemokine โดยจะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ C, CC, CXC และ CX_3C chemokines โดย C family มี cysteine 1 ตัว CC family มี 2 ตัว CXC family มี cysteine 2 ตัวขั้นด้วยกรดอะมิโนอื่น 1 ตัว และ CX_3C family มีกรดอะมิโนอื่น 3 ตัวขั้น cysteine residues (46)

IL-8 เป็น chemokine ชนิดหนึ่ง ประกอบด้วย 99 กรดอะมิโน subunit เป็น homodimer ถูกสร้างโดย macrophage และ cell อื่นๆ เช่น epithelial cell จะถูกเก็บใน vesicle บทบาทหน้าที่ของ IL-8 จะยับยั้งการทำงานของ T lymphocytes และ basophils เหนี่ยวนำให้ neutrophils หลั่ง lysosomal enzymes สารหรือภาวะที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-8 คือ

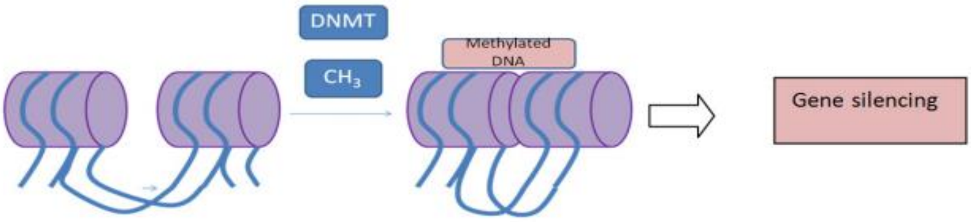
TNF, IL-1 และสารที่พบในเชื้อโรค IL-8 จะมีผลทำให้เกิดกระบวนการ activation และ chemotaxis ในเซลล์ neutrophils (47-49)

เอพิเจเนติก (epigenetics)

เอพิเจเนติกหรือการควบคุมเหนือลำดับเบส คือ การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของ DNA กระบวนการเอพิเจเนติกมีหลายประการ ประกอบด้วยดีเอ็นเอเมทิเลชัน (DNA methylation) การดัดแปลงฮีสโตน (histone modifications) และการควบคุมโดย microRNA (miRNA) (50) ซึ่งการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถผันกลับได้และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกรุ่นหลานได้ (51)

การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกนั้นมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของการดัดแปรทางเคมีชนิดต่างๆ ที่โครมาติน (chromatin) ซึ่งอาจเรียกรวมๆกันได้ว่า “การดัดแปรทางเอพิเจเนติก (epigenetic modification) ” เช่นการเติมหมู่เมทิล (methyl –CH_3) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์เกิดจากหมู่เมทิล (CH_3) ไปจับกับ DNA และยับยั้งการแสดงออกของยีน เป็นผลให้จำนวนของ mRNA ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนมีจำนวนลดลง ดังนั้นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเมทิลเลชัน (hyper / hypomethylation) จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนและหน้าที่ของเซลล์ด้วย ตัวอย่าง เช่น ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง (cancer) โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (autoimmune disease) และผู้สูงอายุ (aging) จะพบการลดลงของเมทิลเลชันไปทั่วทั้งจีโนม (global hypomethylation) (52)

กลไกการเติมหมู่เมทิล (methylation) ของ DNA เกิดที่ตำแหน่ง CpG nucleotide ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีลำดับเบส cytosine (C) และ guanine (G) อย่างหนาแน่นเรียกว่า CpG island โดยมักพบภายในบริเวณ transcription promoter ของ DNA ในเซลล์ปกตินั้นการเกิด methylation มักจะเกิดที่ cytosine บริเวณที่มีรหัสของยีน แต่ไม่พบที่ตำแหน่ง promoter บน CpG island เมื่อตำแหน่งของ CpG island เกิด methylation ขึ้นจะทำให้หยุดการ transcription ของ promoter นั้นๆ การเกิด DNA methylation จะเป็นการเปลี่ยนตำแหน่ง cytosine ให้เป็น 5-methylcytosine (5mC) โดยการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง C-5 ของ cytosine residue ซึ่งอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ซึ่งจะทำให้ยีนนั้นไม่มีการแสดงออก ดังแสดงในรูปที่ 2 (53)



ภาพที่ 2 ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นการเติมหมู่เมทิล ($-CH_3$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีน (cytosine; C) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNMT) ซึ่งจะทำให้ยีนนั้นไม่มีการแสดงออก

ในปี 2005 Fraga และคณะ พบว่าในช่วงปีแรกของชีวิตฝาแฝดซึ่งเกิดจากไข่ใบเดียวกันจะมีการควบคุมเหนือลำดับเบสไม่แตกต่างกัน เมื่ออายุมากขึ้นฝาแฝดจะแสดงความแตกต่างอย่างเด่นชัด เนื่องจากอิทธิพลของทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน เช่น การสูบบุหรี่ กิจกรรมทางกายภาพ การบริโภค เป็นต้น จึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าผู้ที่มี genotype ที่เหมือนกัน อาจจะมี phenotype แตกต่างกันเนื่องจากการควบคุมเหนือพันธกรรมที่ไม่เหมือนกันอันเป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อมนั่นเอง (54)

ในปี 2007 Stenvinkel และคณะ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง renal function, hyperhomocysteinaemia, inflammation และ aberrant DNA methylation พบว่าการอักเสบสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับการเติมหมู่เมทิล ทั้งในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบและมะเร็งกระเพาะอาหาร เนื่องจาก IL-6 ส่งผลต่อการเปลี่ยนการควบคุมเหนือลำดับเบสในเซลล์ผ่านการควบคุมของ DNA methyltransferase gene (55) เป็นจุดเริ่มต้นของทฤษฎีที่ว่า ภาะ global DNA hypermethylation มีความสัมพันธ์กับภาวะอักเสบเรื้อรังและโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรัง อาทิเช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรมมีหลากหลายชนิด ทั้งอาหาร ยา และอื่นๆ ในปี 2012 Zhu และคณะ ศึกษาความสัมพันธ์อายุ เพศ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ และดัชนีมวลกายกับ DNA methylation ในเม็ดเลือดขาวของคนปกติ พบว่าอายุ เพศ การดื่มแอลกอฮอล์ โภชนาการและสัดส่วนชนิดของเม็ดเลือดขาว เกี่ยวข้องกับระดับ methylation (56)

ยาสูตรมะนาวผง

ยาสูตรมะนาวผง คือ สูตรยาสมุนไพรจากมะนาวที่คิดค้นโดย ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และ อาจารย์สุชาดา ไชยสวัสดิ์ โดยแปรรูปน้ำมะนาวและทำให้อยู่ในรูปของผงมะนาวด้วยวิธีการอบแห้งแบบแช่แข็งหรือการอบแห้งโดยการระเหิด (freeze-dried method) และผลิตที่เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มะนาวมีปริมาณวิตามินซีสูง รวมทั้งยังมีสารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์

และวิตามินอี (ตารางที่ 1) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์บุท่อไตจากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันเป็น MDA นอกจากนี้มะนาวยังมีปริมาณซิเตรทโพแทสเซียมและแมกนีเซียม ซึ่งเป็นสารยับยั้งการก่อนิ่วที่สูงมากอีกด้วย จากการศึกษาของศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์และคณะ พบว่า ผู้ป่วยนิ่วไตที่ผ่านการรักษาทางศัลยกรรมเมื่อรับประทานยาสูตรมะนาวผง ซึ่งมีองค์ประกอบโพแทสเซียม 21 มิลลิอิควิวาเลนท์ ต่อซิเตรท63 มิลลิอิควิวาเลนท์ เป็นระยะเวลา 3 เดือน สามารถเพิ่มปริมาณซิเตรทหรือสารต้านการก่อนิ่วในปัสสาวะและเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ ลดความเสี่ยงการเกิดนิ่ว รวมถึงลดความเครียดจากออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ (6)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระในมะนาวผง (5 กรัมต่อซอง)

องค์ประกอบทางเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อซอง)
Citrate	4092 (63 mEq)
Potassium	819 (21 mEq)
Sodium	6.58 (0.29 mEq)
Calcium	78.90
Phosphate	4.10
Oxalate	0.26
Magnesium	3.78
Vitamin C	27.30
Polyphenols	9.20
Flavonoids	8.80
Beta-carotene	0.042 µmol
Vitamin E	0.029 µmol
Cryptozanthine	0.013 µmol
Lycopene	0.04 µmol

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

สารตัวอย่าง (Sample population) ของกลุ่มประชากรเป้าหมายประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (renal stone patients, RSP) และกลุ่มควบคุม (control group) โดยสารตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตประกอบด้วย 3 ระยะ ได้แก่

ระยะที่ 1 เป็นผู้ป่วยก่อนผ่าตัดนำนิ่วออก (RS group)

ระยะที่ 2 เป็นผู้ป่วยหลังผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกเป็นระยะเวลา 1 เดือนและได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีก้อนนิ่วเหลืออยู่ จากนั้นถูกสุ่มเลือกเพื่อรับยาสูตรมะนาวผง (LPR0 group)

ระยะที่ 3 เป็นผู้ป่วยซึ่งได้รับยาสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน (LPR6 group)

เกณฑ์การคัดเข้าศึกษา (Inclusion criteria) สำหรับสารตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วย

- อายุ $\geq$ 18 ปี ทั้งเพศหญิงและชาย
- มีก้อนนิ่วในไตหรือกรวยไตหรือท่อไต
- มีภาพถ่ายทางรังสียืนยันการพบก้อนนิ่ว

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) สำหรับสารตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วย

- หญิงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- ไม่สามารถช่วยเหลือตนเองได้ หรือ มีความผิดปกติใดๆ ที่เป็นผลให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้
- ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้ด้วยเหตุผลใดก็ตาม
- ผู้ป่วยเปลี่ยนถ่ายไต
- กายวิภาคของไตผิดปกติ
- ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูงจากความผิดปกติของฮอร์โมนหรือโรคกระดูก เช่น hyperparathyroidism, sarcoidosis, Paget's disease
- โรคแพ้ภูมิคุ้มกันตัวเอง (Autoimmune disease) ที่ส่งผลต่อการทำงานของไต เช่น SLE
- ติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะเรื้อรังและเกิดซ้ำๆ
- ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ที่ได้รับยา indinavir
- มะเร็งทุกชนิด
- ไม่สามารถลงนามในใบยินยอมได้

เกณฑ์การคัดเข้าศึกษา (Inclusion criteria) สำหรับสารตัวอย่างจากกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

- ไม่มีประวัติได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคนิ่วไตมาก่อน
- ไม่มีอาการที่เข้าได้กับโรคนิ่วไต
- ตรวจไม่พบเลือดในปัสสาวะ (โดยใช้ urine strip test)
- อายุ$\geq$ 18 ปี ทั้งเพศหญิงและชาย
- อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกลุ่มประชากรตัวอย่าง และมีเพศกับอายุใกล้เคียงกันกับผู้ป่วย
- ยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงในโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจ และลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) สำหรับสารตัวอย่างจากกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

- ไม่สามารถช่วยเหลือตนเองได้ หรือ มีความผิดปกติใดๆ ที่เป็นผลให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้
- ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้ด้วยเหตุผลใดก็ตาม
- เป็นโรคไตวายเรื้อรังตั้งแต่ระดับที่ 3 ขึ้นไป ตามเกณฑ์การวินิจฉัยของ WHO (GFR < 60ml/min/1.73 m^2)
- ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจโต ขาดเลือด หรือผิดปกติอื่นๆ ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย
- เป็นโรคเรื้อรัง หรือโรคเฉียบพลันใดๆ รวมถึงมีผลข้างเคียงจากการรักษาที่มีผลให้องค์ประกอบของปัสสาวะผิดปกติ เช่น Nephrotic syndrome, metabolic bone disease, malignancy with bone metastasis, chronic liver disease, protein-calorie malnutrition, diuretic therapy, uricosuric drugs usage เป็นต้น
-

ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size)

หาขนาดตัวอย่างของการศึกษาในคน 2 กลุ่ม ที่เป็นอิสระต่อกัน

ต้องการศึกษาระดับ IL-8 ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับคนปกติ จะต้องใช้ประชากรกลุ่มละกี่คน มีรายงาน (10) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วจำนวน 38 ราย มีระดับ IL-8 เฉลี่ย 104.66 ± 159.70 pg/mg Cr ส่วนกลุ่มคนปกติ 29 ราย เป็น 7.76 ± 8.90 pg/mg Cr

กำหนด

$\alpha = 0.05$

$\beta = 0.10$

$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96$ (two tail)

$Z_{\beta} = Z_{0.10} = 1.28$

สูตร n/group = $2(Z_{\alpha/2}+Z_{\beta})^2\sigma^2/(\overline{X}_1-\overline{X}_2)^2$

$\overline{X}_1$= ค่าเฉลี่ยในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่ว= 104.66

$\overline{X}_2$= ค่าเฉลี่ยในกลุ่มคนปกติ= 7.76

σ^2 = Pool variance

$$= \frac{(n_1-1)S_1^2+(n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}$$

= 14551.834

n/group = $2(1.96+1.28)^2(14551.834)/(104.66-7.76)^2$

จะต้องศึกษาในกลุ่มคนกลุ่มละ 33 คน

โดยการศึกษานี้ศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานีในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 และกลุ่มควบคุมเป็นผู้มีสุขภาพดี ซึ่งอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกลุ่มประชากรผู้ป่วย ที่เข้าร่วมในแผนงานวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนายาจากมะนาวผงของไทยเพื่อการรักษาโรคนิ่วไต” ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว (COA No. 663/2013)

จากการคำนวณขนาดตัวอย่างข้างต้นต้องศึกษาในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 33 ราย ผู้วิจัยทำการคัดเลือกสารตัวอย่าง RS จำนวน 50 ราย Control จำนวน 50 ราย LPR0 จำนวน 36 ราย และ LPR6 จำนวน 36 ราย

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1. Autoclave	HVE-25, Dublin, Ireland
2. Autopipette 10,100, 200, 1000 µl และ tips	Biorad, California, USA
3. Centrifuge tubes 15 ml	CORNING, New York, USA
4. Cuvettes (Plastic and Quartz)	Thermo Scientific, Ohio, USA
5. Distilled water maker	-
6. Freezer (-80°C)	-

7. Hot air oven	MEMMERT, Schwabach, Germany
8. Microplate reader	Thermo Scientific, Ohio, USA
9. Microtube 1.5 ml	Corning, New York, USA
10. Microcentrifuge	Spectrafuge, LABNET, USA
11. NanoDrop	EV60 UV-Visible,Thermo scientific, USA
12. pH meter	TOLEDO, Ohio, USA
13. Spectrophotometer	Thermo Scientific, Ohio, USA
14. Vortex mixer	VORTEX-2 GENIE, USA
15. Water baths	GFL, Burgwedel, Germany

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี (Chemical substance)	**ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)**
1. Citrate lyase	SIGMA, Steinheim,Germany
2. Citric acid	MERK, Darmstadt, Germany
3. Ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
4. Isopropanol	MERCK, Darmstadt, Germany
5. Dinitrophenylhydrazine (DNPH)	Riedel-de Haën, Hannover, Germany
6. Ethyl acetate	BDH, England
7. Guanidine hydrochloride (GdmCl)	USB corporation, Ohio, USA
8. Hydrochloric acid	BDH, England
9. Lactate dehydrogenase	Mallinckrodt, Hazelwood, Unitate State
10. Malate dehydrogenase	SIGMA, Steinheim, Germany
11. NADH	SIGMA, Steinheim, Germany
12. Orthophosphoric acid	MERK, Darmstadt, Germany
13. Oxalic acid	MERK, Darmstadt, Germany
14. PBS (phosphate buffer saline)	MERK, Darmstadt, Germany
15. Picric acid	BAKER, New Jersy, USA
16. Potassium phosphate, monobasic	-
17. Sodium chloride	USB corporation, Ohio, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CHULALONGKORN UNIVERSITY

18. Sodium phosphate, dibasic	BAKER, New Jersy, USA
19. Trichloroacetic acid	BDH, England
20. Tris base	USB corporation, Ohio, USA
21. Sodium hydroxide	-
22. Boric acid	BDH, England
23. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	SIGMA, Steinheim, Germany
24. Ammonium acetate	SIGMA, Steinheim, Germany
25. 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl	SIGMA, Steinheim, Germany

การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ซึ่งจะถูกเก็บเมื่อผู้ป่วยตอบรับเข้าร่วมโครงการ และลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ได้แก่ ก่อนทำการผ่าตัดนำนิ่วออก หลังผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกแล้วพร้อมทั้งได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีก้อนนิ่วเหลืออยู่ (หรือระยะก่อนได้รับยาสูตรมะนาวผง) และหลังจากผู้ป่วยได้รับมะนาวผงเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน โดยอาสาสมัครจะได้รับอุปกรณ์การเก็บปัสสาวะ ประกอบด้วยกระบอกเพื่อเก็บปัสสาวะ และขวดพลาสติกเพื่อตวงปริมาตรปัสสาวะซึ่งมียาปฏิชีวนะเคลือบอยู่ การเก็บปัสสาวะกระทำที่บ้านของผู้เข้าร่วมโครงการ โดยทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงโดยไม่ต้องแช่ตู้เย็นหรือน้ำแข็ง (แนะนำเริ่มเก็บตั้งแต่ 8.00 น. ของวันแรกไปจนถึง 8.00 น. ของวันที่สอง) เพื่อนำส่งทีมแพทย์พยาบาล ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จากนั้นตัวอย่างที่ได้จะถูกส่งไปยังภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี เพื่อวัดปริมาตรทั้งหมด และเก็บตัวอย่างปัสสาวะประมาณ 500 มิลลิลิตร ปั่นเพื่อแยกเซลล์และน้ำปัสสาวะออกจากกัน จากนั้นทำการจัดส่งสารตัวอย่างมายังภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยจะนำปัสสาวะเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

การเก็บตัวอย่างเลือด

ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ได้เก็บตัวอย่างเลือด ซึ่งจะถูกเก็บเมื่อผู้ป่วยตอบรับเข้าร่วมโครงการ และลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ได้แก่ ก่อนทำการผ่าตัด

นำนิ่วออก หลังผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกแล้วพร้อมทั้งได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีก้อนนิ่วเหลืออยู่ และหลังจากผู้ป่วยได้รับมะนาวผงเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน โดยการเจาะเลือดจะเจาะจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ซึ่งจะกระทำโดยทีมแพทย์พยาบาล โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี เก็บตัวอย่างพลาสม่าโดยการปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของพลาสม่าเก็บที่ -80 องศาเซลเซียสก่อนการวิเคราะห์ ส่วนเม็ดเลือดขาว (buffy coat) และเม็ดเลือดแดง (Red blood cell) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทีมแพทย์พยาบาลโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จะทำการจัดส่งสารตัวอย่างมายังภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งในการทำวิจัยนี้ทางผู้วิจัยจะใช้เพียงเม็ดเลือดขาวซึ่งจะถูกเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. ตรวจวัดระดับเมทิลเลชันของ DNA ด้วย Methylflash™ Methylated DNA quantification kit (Colorimetric)

สกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN, USA) ตรวจสอบปริมาณ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (EV60 UV-Visible, Thermo scientific, USA) โดยใช้โปรแกรมวัดสัดส่วน 260/280 จากนั้นนำ DNA มาตรวจวัดระดับ 5-mC ด้วย Methyflash DNA methylation quantification kit (Epigentek, USA) โดยจะใช้ capture และ detection antibody ที่จำเพาะกับ 5-mC จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และคำนวณร้อยละของ5-mC (5-mC%) ได้จากสูตรต่อไปนี้

$$5-\mathrm{mC}\% = \frac{(\text{sample OD} - \text{Negative Control OD}) \div S}{(\text{Positive Control OD} - \text{Negative Control OD}) \times 2 \div 5} \times 100\%$$

หมายเหตุ S คือ ปริมาณของ DNA ตัวอย่างในหน่วย ng

P คือ ปริมาณของ positive control (standard) ในหน่วย ng

2. การตรวจวัด IL-8 ในปัสสาวะด้วย ELISA kit (Human IL-8/CXCL8 ELISA Kit)

นำตัวอย่างปัสสาวะ100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน well plate ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีซึ่งจำเพาะกับ Human IL-8 จากนั้นใส่ biotinylated antibody ซึ่งเป็น detection antibody จากนั้นใส่ HRP-conjugated streptavidin และ 3,3´,5,5´-tetramethylbenzidine (TMB) ตามลำดับ วัด

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณ IL-8 ในสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับ IL-8 มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

3. การวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะด้วย enzymatic method โดยนำตัวอย่างใส่ creatininase บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส creatinine ถูกเปลี่ยนแปลงเป็น sarcosine จากนั้นเติม sarcosine oxidase เกิดเป็น hydrogen peroxide ใส่ peroxidase และวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550 นาโนเมตร

4. การตรวจระดับ protein carbonyl ในพลาสมา

เจือจางซีรัมด้วย phosphate buffer saline (PBS) 20 เท่า โดยดูดซีรั่ม 30 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี PBS อยู่ 570 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบน 250 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่แล้วเติม DNPH ลงไป 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอด blank ของแต่ละตัวอย่างซีรัม เติม 2N HCl ลงไปแทน แล้วนำทุกหลอดบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 45 นาที โดยเขย่าเป็นระยะๆ เติม 20% TCA ที่แช่เย็นไว้ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรลงไปทุกหลอด วางหลอดไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย ethanol : ethyl acetate 3 ครั้ง ครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร แล้วเติม GdmCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและนำไป sonicated เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายไม่หมด ให้นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อตกตะกอน แล้วนำส่วนใสด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ GdmCl ปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร (OD_{test}) โดยใช้ blank ของแต่ละตัวอย่าง ปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ คำนวณหาปริมาณ protein carbonylได้ดังสมการ ต่อไปนี้

Protein carbonyl (nmol/ml) = $OD_{test} \times 45.45$

Protein carbonyl (nmol/mg) = protein carbonyl (nmol/ml)/protein (mg/ml)

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในปัสสาวะโดยวิธี DPPH

นำปัสสาวะ 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 400 ไมโครลิตรของ sodium phosphate buffer และ DPPH solution บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

6. การตรวจวัดระดับซิเตรทในปัสสาวะด้วยชุด citrate lyase kit (r-biopharm, Germany)

นำปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ Glycyl-Glycine buffer (Nicotinamide reduced form (NADH) + Lactate dehydrogenase (LDH) + Malate dehydrogenase (MDH)) และน้ำกลั่น 0.45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A_1) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Citrate lyase enzyme 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A_2) ปริมาณซิเตรตคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ($\Delta A = A1 - A2$) ดังสมการ Citrate (mg/L) = (OD_1-OD_2) x 487

7. การตรวจวัดระดับออกซาเลตในปัสสาวะด้วย Enzymatic Oxalate kit (Trinity Biotech, Ireland)

นำ Charcoal 0.03 กรัม ใส่ใน microcentrifuge tube ผสม sample diluents (10 mmol/L EDTA + Buffer pH 7.6 ± 0.1) 500 ไมโครลิตร และตัวอย่างปัสสาวะ 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 3000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใส 25 ไมโครลิตร ผสม Reagent A (3.2 mmol/L DMAB + 0.22 mmol/L MBTH + Buffer pH 3.1 ± 0.1) 500 ไมโครลิตร และ Reagent B (3000 u/L Oxalate Oxidase + 100.000 u/L Peroxidase) 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้ Oxalic acid เป็นสารมาตรฐาน คำนวณปริมาณออกซาเลตได้ตามสมการนี้

$$\text{Oxalate (mM)} = (\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน} \times OD_{sample})/ OD_{std}$$

8. การวิเคราะห์กรดยูริก

ผสม phosphotungstic 2 มิลลิลิตรกับตัวอย่างปัสสาวะ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 10% sodium carbonate 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะโดยเปรียบเทียบกับกรดยูริกมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

9. การวิเคราะห์โปรตีนในปัสสาวะ โดยวิธี dye binding method

โดยใช้สารละลาย Comassie Brilliant Blue G-250 dye ในacidic solution (CCB reagent) ซึ่งเป็นสารสีแดงและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 465 นาโนเมตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เมื่อ CCB reagent จับกับโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีฟ้า ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 595 นาโนเมตร

จากนั้นคำนวณปริมาณโปรตีนในปัสสาวะโดยเปรียบเทียบกับ Bovine serum albumin (BSA) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) สำหรับการนำเสนอข้อมูล ซึ่งจะแสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD หรือ mean±SE) โดยนำเสนอในรูปของกราฟหรือตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

1. Independent-samples t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน ได้แก่ การวิเคราะห์ผลการทดลองระหว่างกลุ่ม RS และ Control
2. Paired- samples t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ของ 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน ได้แก่ การวิเคราะห์ผลการทดลองระหว่างกลุ่ม LPR0 และ LPR6
3. Pearson’s correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีค่าตั้งแต่ -1 ถึง 1 ค่าลบแสดงความสัมพันธ์ทางลบหรือทางตรงกันข้ามค่าบวกแสดงความสัมพันธ์ทางบวกหรือทางเดียวกัน

   r = 0.50 ถึง 1.00 หรือ r = -0.50 ถึง -1.00 ถือว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์ในระดับสูง

   r = 0.30 ถึง 0.49 หรือ r = -0.30 ถึง -0.49 ถือว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง

   r = 0.10 ถึง 0.29 หรือ r = -0.10 ถึง -0.29 ถือว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ

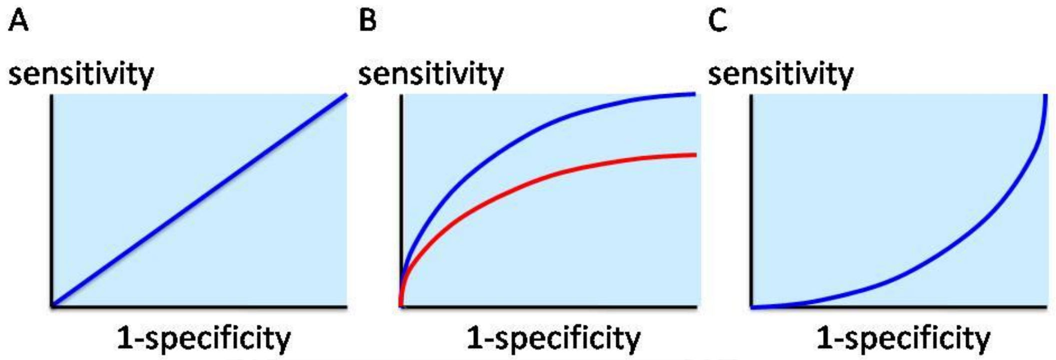
   r = 0.00 ถือว่าข้อมูลไม่มีความสัมพันธ์กัน

โปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SPSS เวอร์ชั่น 16.0 (Chicago, IL) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

การนำเสนอคุณสมบัติด้านการวินิจฉัยโรคโดยใช้ Receiver-operating characteristic (ROC) curve ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลบวกจริงในแกน (true positive rate หรือ

sensitivity) ในแกน y และอัตราผลบวกเท็จ (false positive rate หรือ 1-specificity หรือ 100%-specificity%) ในแกน x ดังแสดงในรูปที่ 4 ROC curve ใช้ในการประเมินว่าการทดสอบนั้นสามารถจำแนกระหว่างผู้ป่วยกับคนปกติได้ดีเพียงใด ทั้งยังสามารถประเมินได้ว่าค่า cutoff ที่แตกต่างกันมีผลอย่างไรต่อความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และแม่นยำ (accuracy)

ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องพิจารณาว่าจะใช้ค่า cutoff ใดในการทดสอบที่ต้องการศึกษา ในกรณีที่มีการเปรียบเทียบการทดสอบหลายการทดสอบจะสามารถพิจารณาได้ว่าการทดสอบใดที่มีความเหมาะสมมากที่สุดที่จะนำไปใช้ในทางคลินิกการเข้าใจคุณลักษณะของผลการทดสอบ นอกจากจะทำให้แปลความหมายค่าสถิติได้ ยังใช้ช่วยเลือกวิธีทดสอบหรือการตรวจให้เหมาะกับวัตถุประสงค์การใช้งาน เช่น ในการสืบเสาะหาโรค (screening) มักใช้วิธีทดสอบที่มี sensitivity สูง แต่ถ้าต้องการวินิจฉัยยืนยันว่า ผู้ป่วยเป็นโรคจริง (confirm diagnosis) จะต้องเลือกวิธีทดสอบที่มี specificity สูง โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ STATA version 12.0 (College station, TX, USA) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$



ภาพที่ 3 กราฟ ROC เกิดจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราผลบวกจริง (sensitivity) ในแกน Y และอัตราผลบวกเท็จ (specificity) ในแกน X วิธีการตรวจที่ดีมีประโยชน์ ผลบวกจริงย่อมมากกว่าผลบวกเท็จ A: การตรวจวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกจริงเท่ากับผลเท็จ ย่อมไม่ให้ประโยชน์กับผู้ป่วย B: การตรวจวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกจริงมากกว่าผลบวกเท็จวิธีการใดที่ให้โค้ง ROC สูงกว่า ย่อมเป็นการวินิจฉัยที่ดีกว่า C: การวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกเท็จมากกว่าผลบวกจริง วิธีการตรวจนี้จึงให้ผลเสียและเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย **ผู้ป่วยโรคนิ่วไต** (renal stone patients, RSP) 3 ระยะ

ระยะที่ 1 เป็นผู้ป่วยระยะก่อนผ่าตัดนำนิ่วออก (RS group) จำนวน 50 ราย เป็นเพศชาย 27 ราย (54%) เพศหญิง 23 ราย (46%) อายุเฉลี่ย 46.18±8.79 ปี ค่าดัชนีมวลกาย (BMI) เฉลี่ย 23.40±4.04 kg/m^2

ระยะที่ 2 เป็นผู้ป่วยระยะหลังผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกเป็นระยะเวลา 1 เดือนและได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีก้อนนิ่วเหลืออยู่ และก่อนที่จะถูกสุ่มเลือกเพื่อรับยาสูตรมะนาวผง (LPR0 group) จำนวน 36 ราย เป็นเพศชาย 20 ราย (55.56%) เพศหญิง 16 ราย (44.44%) อายุเฉลี่ย 44.92±9.01 ปี ค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ย 23.51±4.32 kg/m^2

ระยะที่ 3 เป็นผู้ป่วยภายหลังได้รับยาสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน (LPR6 group) จำนวน 36 ราย

Control 50 ราย เป็นเพศชาย 29ราย (58%) เพศหญิง 21 ราย (42%) อายุเฉลี่ย 46.42±11.25 ปี ค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ย 24.44±3.67 kg/m^2 โดยได้เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานของกลุ่ม RS และcontrol ไว้ในตารางที่ 4 จากผลการทดสอบทางสถิติ พบว่า เพศ (p=0.845) อายุ (p=0.078) และดัชนีมวลกาย (p=0.893) ระหว่าง RS และ control ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มประชากรศึกษา

Characteristics	RS	Control	p value
n	50	50	-
Male/Female [a]	27 /23	29/21	0.845
Age (years±SD) [b]	46.18 ± 8.79	46.42 ± 11.25	0.078
	(27-64)	(24-72)	
BMI (kg/m^2 ±SD) [b]	23.40 ± 4.04	24.44± 3.67	0.893

a : Chi-square test, b : Independent sample t-test, BMI: Body mass index

<u>ผลการวิเคราะห์ชนิดของนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไต</u>

ผลการตรวจชนิดของก้อนนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้าร่วมโครงการ พบนิ่วซึ่งมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบร้อยละ94 และนิ่วไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบพบร้อยละ 6 โดยนิ่วซึ่งมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบเป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลตมากที่สุดรวมร้อยละ 80 โดยเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลตบริสุทธิ์ร้อยละ 52 นิ่วแคลเซียมออกซาเลตผสมแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 12 นิ่วแคลเซียมออกซาเลตผสมกรดยูริกร้อยละ 12 และนิ่วแคลเซียมออกซาเลตผสมแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 4 รองลงมาเป็นนิ่วชนิดแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 14 โดยเป็นนิ่วแคลเซียมฟอสเฟตบริสุทธิ์ร้อยละ 4 นิ่วแคลเซียมฟอสเฟตผสมกรดยูริกร้อยละ 4 นิ่วแคลเซียมฟอสเฟตผสมแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 6 และนิ่วซึ่งไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบพบเป็นนิ่วชนิดกรดยูริกร้อยละ 4 และนิ่วชนิดแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 2 (ตารางที่ 5)

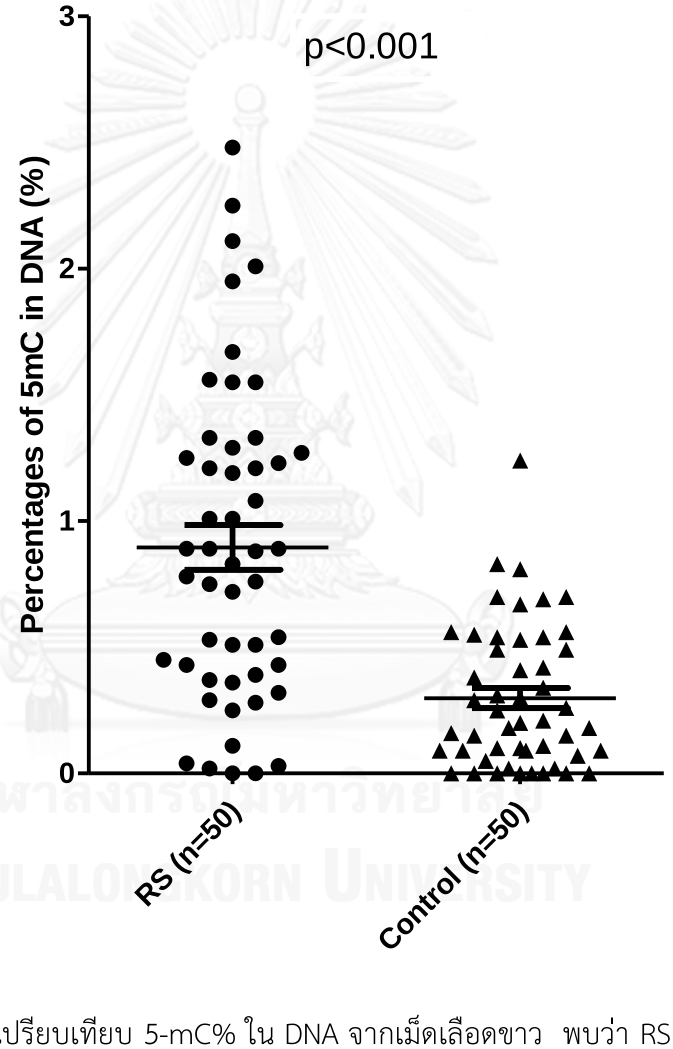
ตารางที่ 5 ชนิดของนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

Type of kidney stone	RS (percent)
Calcium oxalate stones	40 (80.00)
Pure calcium oxalate stones	26 (52.00)
Calcium oxalate and calcium phosphate stones	6 (12.00)
Calcium oxalate and uric acid stones	6 (12.00)
Calcium oxalate and magnesium ammonium phosphate stones	2 (4.00)
Calcium Phosphate Stones	7 (14.00)
Pure calcium phosphate stones	2 (4.00)
Calcium phosphate and uric acid stones	2 (4.00)
Calcium phosphate and magnesium ammonium phosphate stones	3 (6.00)
Uric acid stones	2 (4.00)
Magnesium ammonium phosphate stones	1 (2.00)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

<u>ผลการศึกษาระดับ 5-methylcytosine (5-mC%)</u>

ผลการวิเคราะห์ระดับ 5-mC% ซึ่งจะบ่งบอกระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม โดยศึกษาใน DNA จากเม็ดเลือดขาวของผู้เข้าร่วมการวิจัย พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.90±0.089 % และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.30±0.040 % ซึ่งระดับ 5-mC% ของ RS มีค่าเฉลี่ยระดับ 5-mC% สูงกว่า controlอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) (ภาพที่ 4)

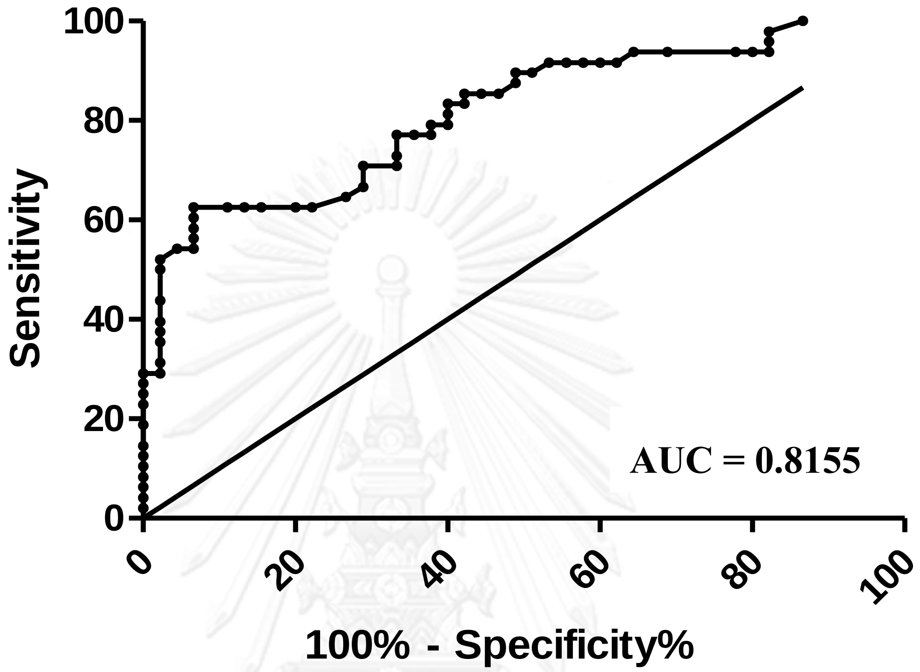


ภาพที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยระดับ 5-mC% สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานค่า cutoff ของ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคนิ่วไต การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ Receiver operating characteristic (ROC) analysis

เพื่อหาค่า cutoff ของ 5-mC% ที่เหมาะสม และประเมินคุณค่าของการตรวจวัด 5-mC% สำหรับใช้ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจากคนปกติ พบว่า ROC curve ที่ได้มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) เท่ากับ 0.8155 (95% CI;0.7110-0.8870) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ROC curve analysis เพื่อหาค่า cutoff ของ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว มีค่าพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.8155 (95% CI; 0.7110-0.8870)

จากผลการวิเคราะห์ ROC curve analysis การศึกษานี้เลือกค่า cutoff ของ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาวที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (%) สำหรับคำนวณค่าวินิจฉัย (diagnostic values) ตารางที่ 6 แสดง 2x2 table ของ 5-mC% โดยกำหนด cutoff สำหรับผลบวกที่ > 0.5%

ตารางที่ 6 ผลการจำแนกกลุ่มประชากรตามค่า cutoff ของ 5-mC% ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว

5-methylcytosine of peripheral	**RS (%)**	**Control (%)**	**Total**
Positive (>0.5 %)	34 (68)	13 (26)	47
Negative (≤ 0.5 %)	16 (32)	37 (74)	53
Total	50	50	100

จากตารางที่ 6 สามารถคำนวณค่าวินิจฉัย (diagnostic values) ได้ดังต่อไปนี้

Sensitivity	Pr(+| D)	68.00%
Specificity	Pr(-|~D)	74.00%
Positive predictive value	Pr(D| +)	72.34%
Negative predictive value	Pr(~D| -)	68.81%
Correctly classified (Accuracy of test)		71.00%

กำหนด D = disease (RS) ~D = non-disease (control)

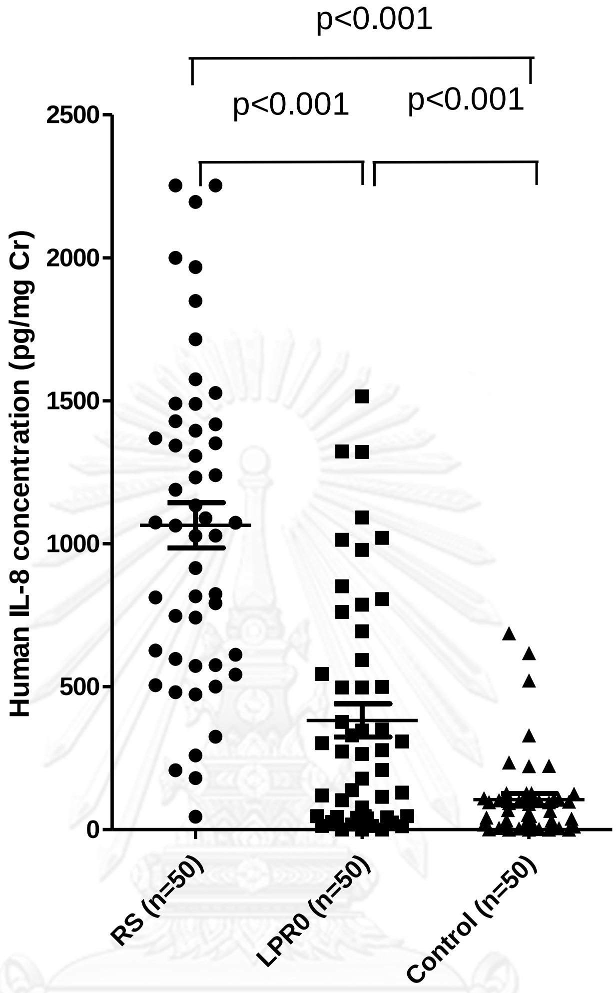
จากผลการวิเคราะห์ข้างต้นกำหนดค่า cutoff สำหรับระดับเมทิลเลชัน คือ >0.5% พบว่า RS ส่วนใหญ่มีระดับเมทิลเลชันหรือเปอร์เซ็นต์ 5-methylcytosine สูงกว่า 0.5% ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 68 ส่วน control พบระดับเมทิลเลชันสูงร้อยละ 26

<u>ผลการศึกษาระดับ IL-8</u>

ผลการวิเคราะห์ระดับ IL-8 ซึ่งจะบ่งบอกถึงภาวะอักเสบ โดยศึกษาในสารตัวอย่างปัสสาวะของผู้เข้าร่วมการวิจัย พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1064.64±79.16 pg/mg Cr LPR0 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 382.32±57.94 pg/mg Cr และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 105.34±20.85 pg/mg Cr ซึ่งระดับ IL-8 ของ RS สูงกว่า LPR0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) รวมทั้ง RS และ LPR0 มีระดับ IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$ และ $p<0.001$) (ภาพที่ 6)

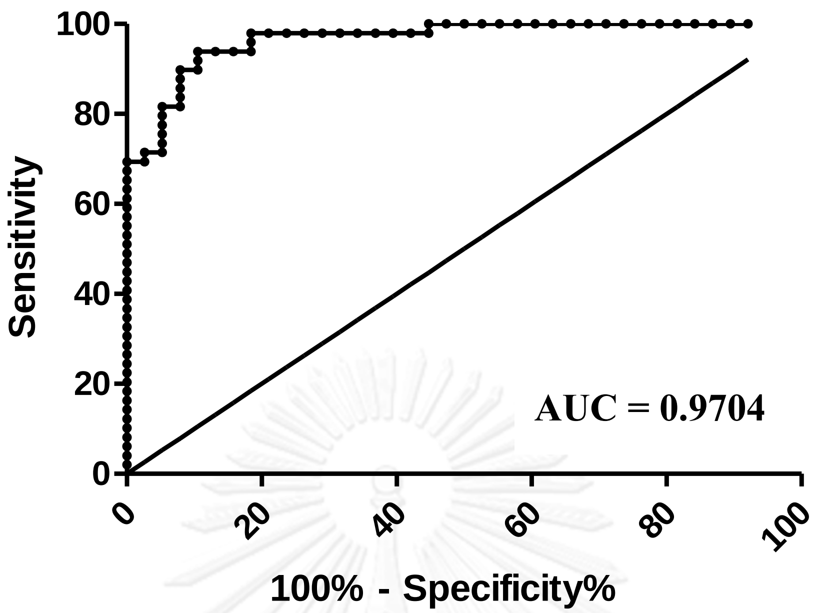
เมื่อวิเคราะห์ ROC curve มีค่าพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.9704 (95% CI;0.9408-1.000) (ภาพที่ 7) เลือกค่า cutoff ของ IL-8 ในปัสสาวะที่ 247.1 pg/mg Cr สำหรับคำนวณค่าวินิจฉัย (diagnostic values) ตารางที่ 7 แสดง 2x2 table ของ IL-8 โดยกำหนดค่า cutoff สำหรับผลบวกที่ >247.1 pg/mg Cr

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับ IL-8 ในปัสสาวะ พบว่า RS มีระดับ IL-8 สูงกว่า LPR0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) RS และ LPR0 มีระดับ IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001 และ p<0.001)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 7 ROC curve analysis เพื่อหาค่า cutoff ของระดับ IL-8 ในปัสสาวะ มีค่าพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.9704 (95% CI; 0.9408-1.000)

ตารางที่ 7 ผลการจำแนกกลุ่มประชากรตามค่า cutoff ของระดับ IL-8 ในปัสสาวะ

Urinary interleukin-8 test	RS (%)	Control (%)	Total
Positive (>247.1 pg/mg Cr)	47 (94)	4 (8)	51
Negative (≤247.1 pg/mg Cr)	3 (6)	46 (92)	49
Total	50	50	100

จากตารางที่ 7 สามารถคำนวณค่าวินิจฉัย (diagnostic values) ได้ดังต่อไปนี้

Sensitivity	Pr(+| D)	94.00%
Specificity	Pr(-|~D)	92.00%
Positive predictive value	Pr(D| +)	92.16%
Negative predictive value	Pr(~D| -)	93.88%

Correctly classified (Accuracy of test)

93.00%

กำหนดD = disease (RS) ~D = non-disease (control)

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้นกำหนดค่า cutoff สำหรับระดับ IL-8 คือ >247.1 pg/mg Cr พบว่า RS ส่วนใหญ่มีระดับ IL-8 สูงกว่า 247.1 pg/mg Cr ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 94 ส่วน control พบระดับ IL-8 สูงร้อยละ 8

<u>ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของระดับ 5-mC% และ IL-8 ต่อการเกิดโรคนิ่วไต</u>

ผลการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่าระดับ 5-mC% และระดับ IL-8 สัมพันธ์กับโรคนิ่วไต เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าว จึงคำนวณ odds ratio (OR) ของระดับ 5-mC% ของ DNA ในเม็ดเลือดขาวและระดับ IL-8 ในปัสสาวะต่อการเกิดโรคนิ่วไต ด้วย Binary logistic regression

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์แต่ละตัวแปรในการพยากรณ์การเป็นโรคนิ่ว พบว่าค่า OR ของระดับ 5-mC (%) เท่ากับ 19.31 (CI: 5.27–70.75, p<0.001) กล่าวคือผู้ที่มีระดับ 5-mC (%) สูงขึ้น 1% จะมีโอกาสเป็นโรคนิ่วเพิ่มขึ้น 19.31 เท่า และค่า OR ของระดับ IL-8 (100 pg/mg Cr) เท่ากับ 2.34 (CI: 1.66–3.29, p<0.001) กล่าวคือผู้ที่มีระดับ IL-8 เพิ่มขึ้น 100 pg/mg Cr จะมีโอกาสเป็นโรคนิ่วเพิ่มขึ้น 2.34 เท่า

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์หลายตัวแปรในการพยากรณ์การเป็นโรคนิ่ว พบว่าค่า adjusted OR ของระดับ 5-mC (%) เท่ากับ 28.19 (CI: 2.78–365.08, p=0.011) แสดงว่าผู้ที่มีระดับ IL-8 (100 pg/mg Cr) เท่ากัน เมื่อระดับ 5-mC (%) เพิ่มขึ้น 1% จะมีโอกาสเป็นโรคนิ่วเพิ่มขึ้น 28.19 เท่า และค่า adjusted OR ของระดับ IL-8 (100 pg/mg Cr) เท่ากับ 2.31 (CI: 1.56–3.42, p< 0.001) แสดงว่าผู้ที่มีระดับ 5-mC (%) เท่ากัน เมื่อมีระดับ IL-8 เพิ่มขึ้น 100 pg/mg Cr จะมีโอกาสเป็นโรคนิ่วเพิ่มขึ้น 2.31 เท่า (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ความเสี่ยงของระดับ 5-mC% และระดับ IL-8 ต่อการเกิดโรคนิ่วไต

Independent variables	Odds ratio (95%CI)	P-value	Odds ratio (95%CI) adjusted	P-value
5-mC (%)	19.31 (5.27,70.75)	<0.001	28.19 (2.78,365.08)	0.011
IL-8 (x100 pg/mg Cr)	2.34 (1.66,3.29)	<0.001	2.31 (1.56,3.42)	<0.001

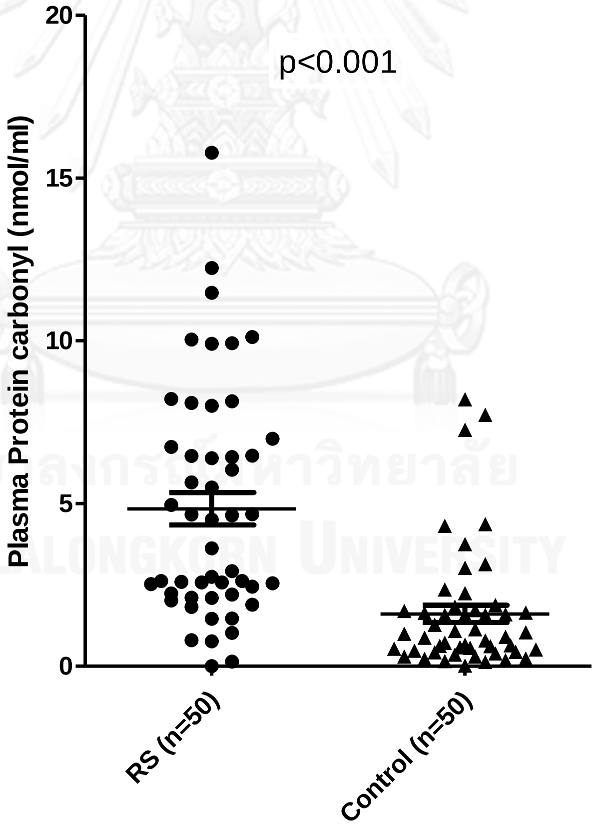
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>ผลของการศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชัน</u>

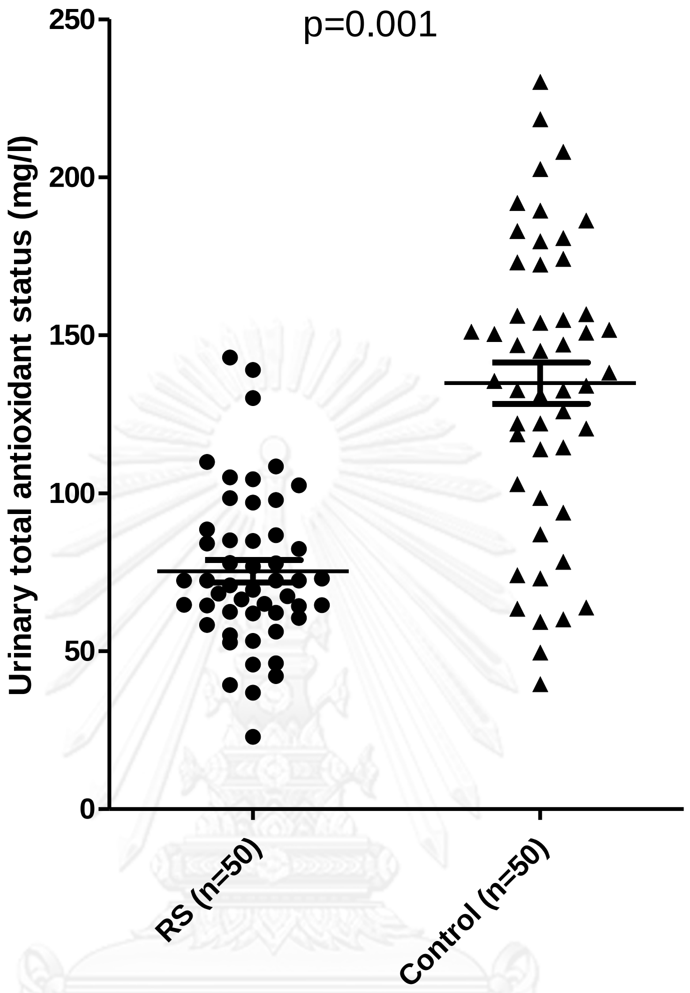
ศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันจากการวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ระดับสารอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน และวัดระดับ TAS ในปัสสาวะ ซึ่งบ่งบอกระดับของสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

ผลการวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl ในพลาสมา พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.84±0.49 nmol/ml และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.61±0.27 nmol/ml ซึ่งระดับ protein carbonyl ของ RS สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) (ภาพที่ 8) แสดงให้เห็นกลุ่ม RS มีระดับความเครียดทางออกซิเดชันสูงกว่ากลุ่ม control ชัดเจน

ผลการวิเคราะห์ระดับ TAS ในปัสสาวะ พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.27±3.53 mg/l และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 134.82±6.56 mg/l ซึ่งระดับ TAS ของ RS ต่ำกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.001$) (ภาพที่ 9) แสดงให้เห็นกลุ่ม RS มีระดับสารต้านอนุมูลอิสระในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่ม control ชัดเจน



ภาพที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ในพลาสมา พบว่า RS มี ระดับ protein carbonyl สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$)

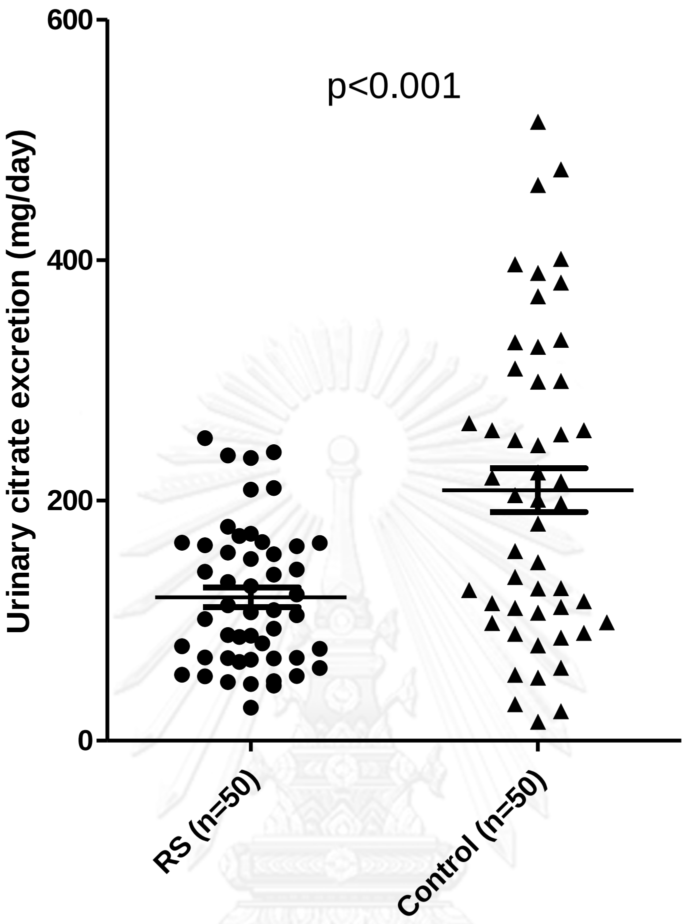


ภาพที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับ TAS ในปัสสาวะ พบว่า RS มีระดับ TAS ต่ำกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.001)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

<u>ผลการศึกษาดัชนีที่เป็นปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกที่สำคัญต่อการเกิดนิ่วไต</u>

ผลการศึกษาปริมาณของสารยับยั้งนิ่วและสารก่อนิ่วซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กที่ขับออกในปัสสาวะ สารยับยั้งนิ่วที่สำคัญในปัสสาวะ ได้แก่ ซิเตรท จากการวิเคราะห์ปริมาณซิเตรทในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมการวิจัย พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 119.30±8.34 mg/day และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 207.65±18.19 mg/day ซึ่งปริมาณซิเตรทของ RS ต่ำกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) (ภาพที่ 10)

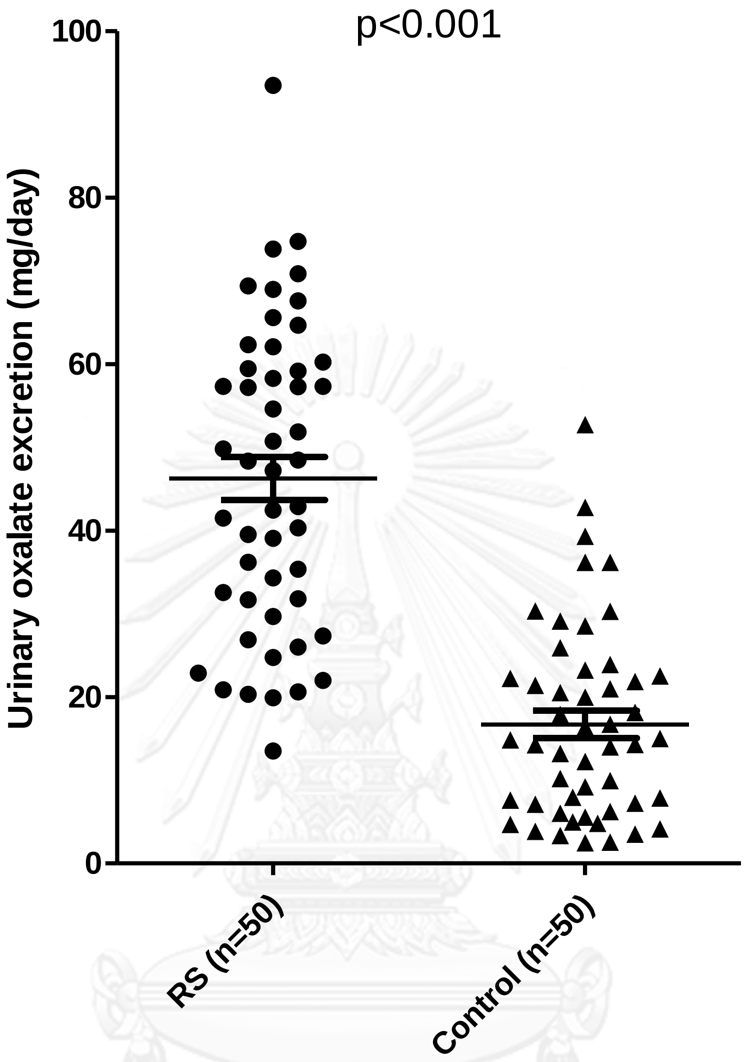


ภาพที่ 10 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณซิเตรทในปัสสาวะ พบว่า RS มีปริมาณซิเตรทต่ำกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$)

ส่วนสารก่อนิ่วที่ขับออกมาในปัสสาวะที่สำคัญ ได้แก่ ออกซาเลต พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46.27±2.58 mg/day และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.63±1.65 mg/day ซึ่ง RS มีค่าเฉลี่ยปริมาณออกซาเลตสูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) (ภาพที่ 11)

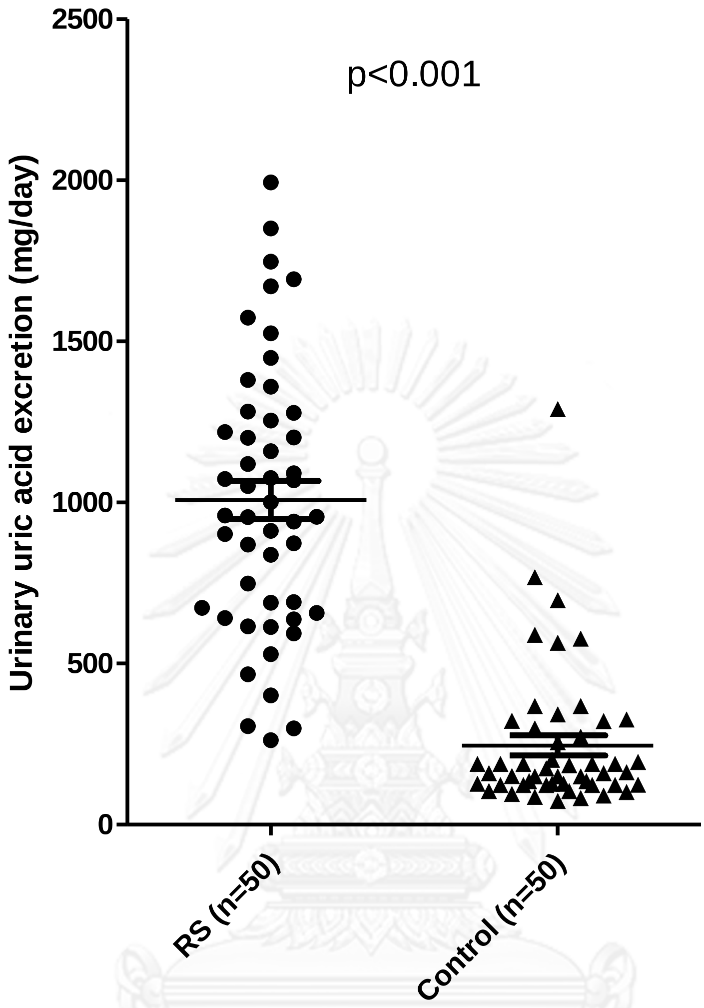
จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมการวิจัย พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1007.22±58.44 mg/day และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 343.86±100.69 mg/day ซึ่งปริมาณกรดยูริกของ RS สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) (ภาพที่ 12)

และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมการวิจัย พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 214.45±23.75 mg/day และ control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.83±6.31 mg/day ซึ่งปริมาณโปรตีนของ RS สูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) (ภาพที่ 13)



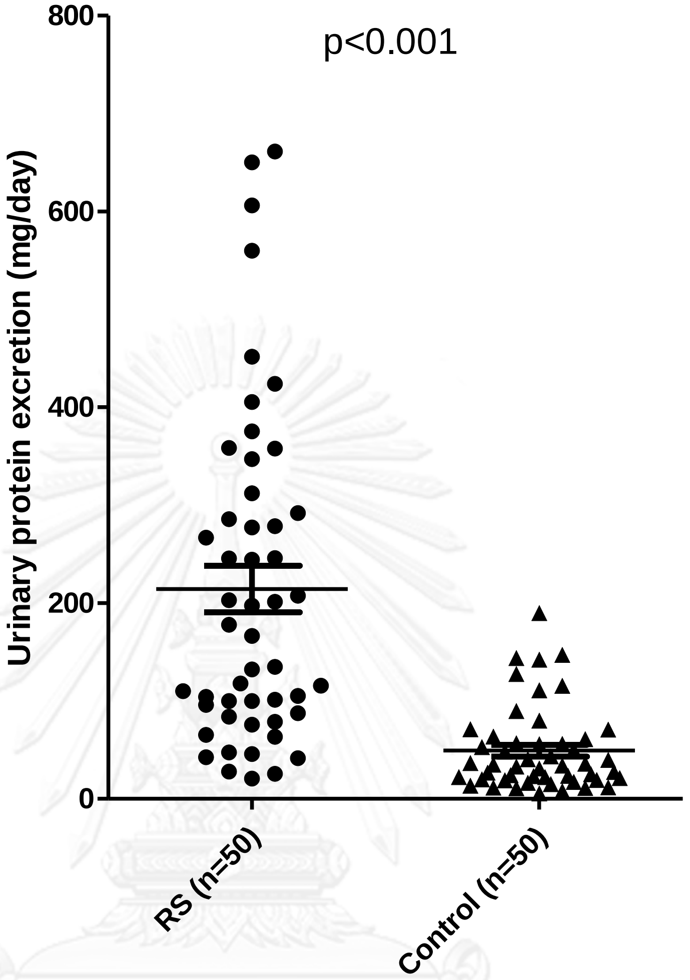
ภาพที่ 11 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ พบว่า RS มีค่าเฉลี่ยปริมาณออกซาเลตสูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$)

CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 12 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะ พบว่า RS มีปริมาณกรดยูริกสูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001)

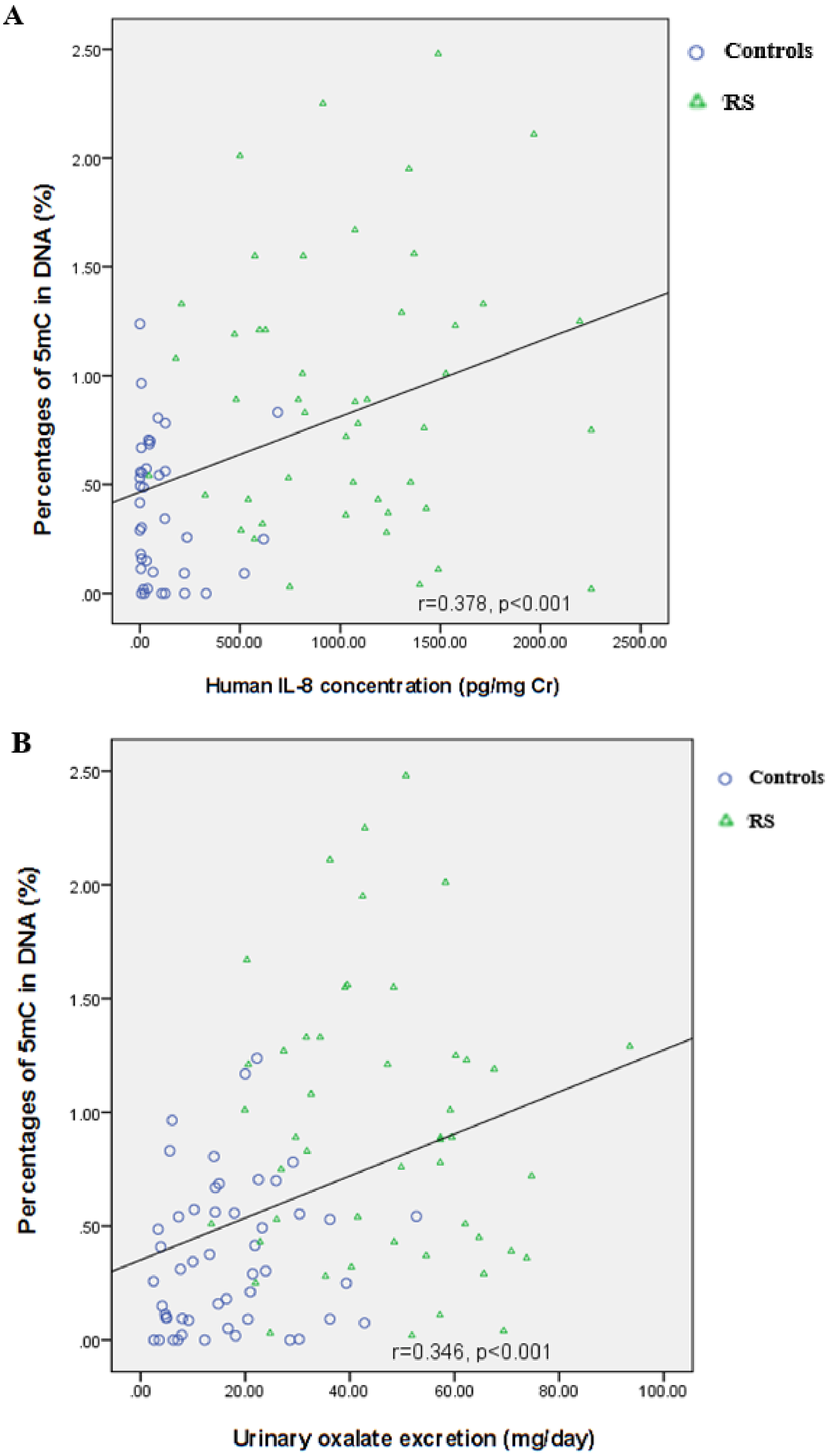
CHULALONGKORN UNIVERSITY



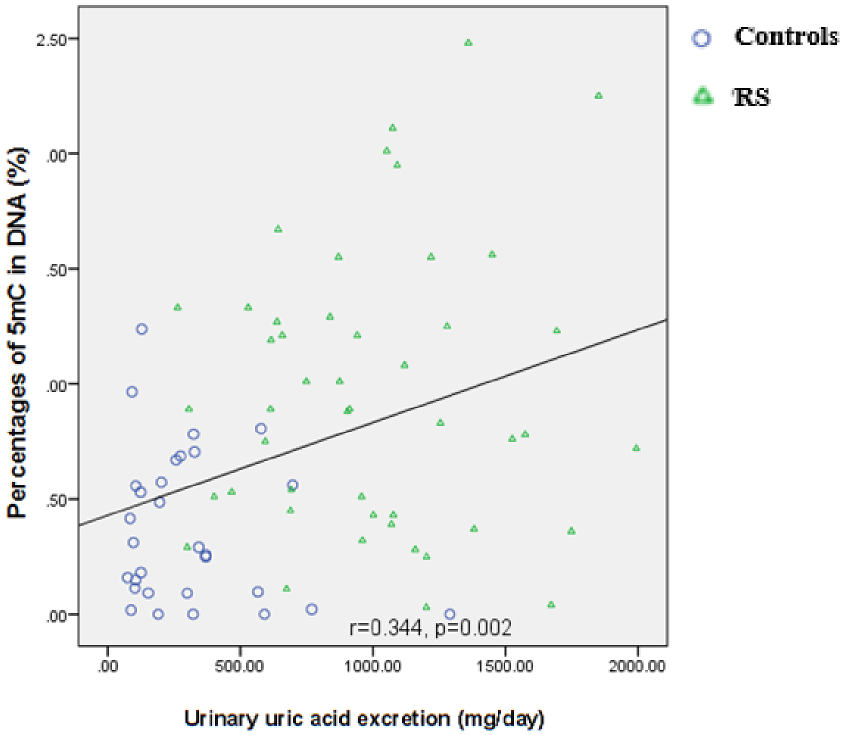
ภาพที่ 13 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ พบว่า RS มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001)

<u>ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง 5-mC% กับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่างๆ</u>

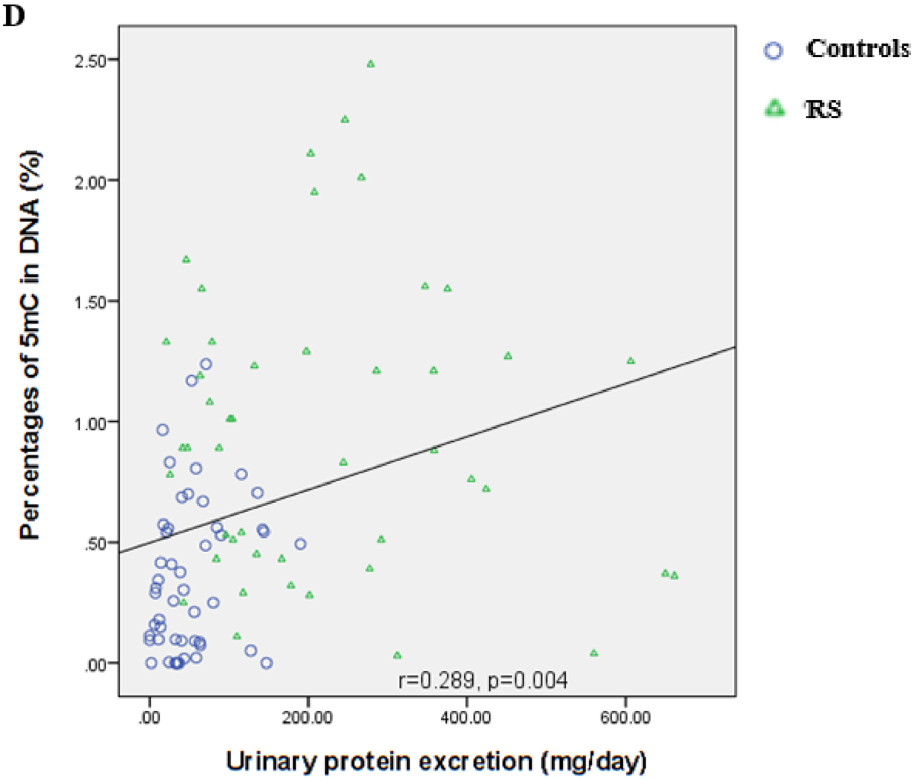
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 5-mC% ของ DNA ในเม็ดเลือดขาวกับระดับ IL-8 ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์ต่างๆในปัสสาวะของ RS และ control โดยใช้ Pearson’s correlation test พบว่า ระดับ 5-mC% มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ IL-8 (r=0.378, p<0.001) (ภาพที่ 14A) ปริมาณออกซาเลต (r=0.346, p<0.001) (ภาพที่ 14B) กรดยูริก (r=0.344, p=0.002) (ภาพที่ 14C) และโปรตีน (r=0.289, p=0.004) (ภาพที่ 14D) ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (r=-0.330, p=0.001) (ภาพที่ 14E) ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) แสดงให้เห็นระดับ 5-mC% มีความสัมพันธ์กับระดับ IL-8 มากที่สุด


A
Controls
RS
Percentages of 5mC in DNA (%)
Human IL-8 concentration (pg/mg Cr)
r=0.378, p<0.001
B
Controls
RS
Percentages of 5mC in DNA (%)
Urinary oxalate excretion (mg/day)
r=0.346, p<0.001

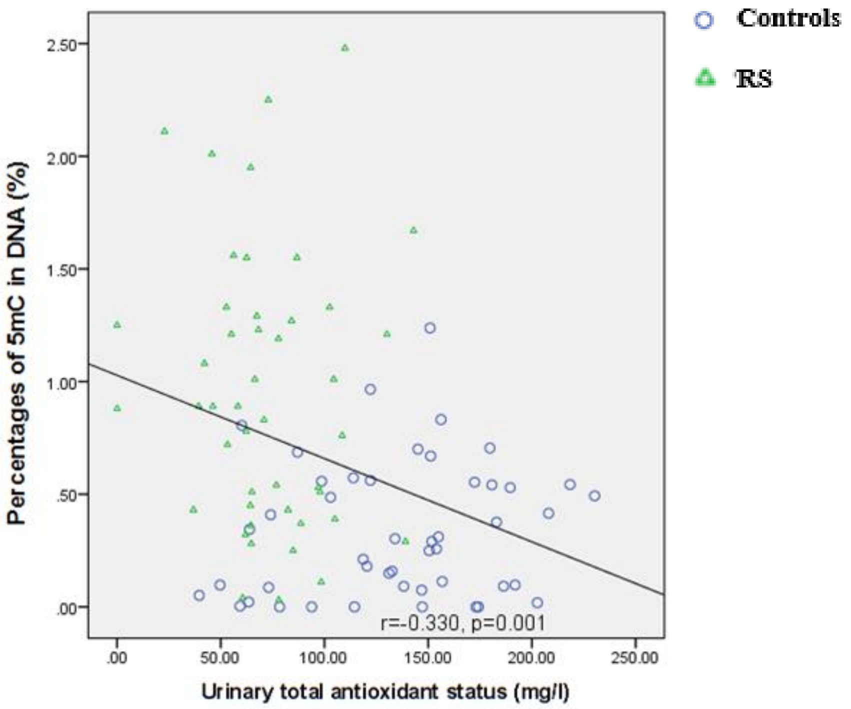
C


Controls
RS
2.50
.00
.50
.00
.50
.00
r=0.344, p=0.002
.00
500.00
1000.00
1500.00
2000.00
Percentages of 5mC in DNA (%)
Urinary uric acid excretion (mg/day)

D


Controls
RS
2.50
2.00
1.50
1.00
.50
.00
r=0.289, p=0.004
.00
200.00
400.00
600.00
Percentages of 5mC in DNA (%)
Urinary protein excretion (mg/day)

E

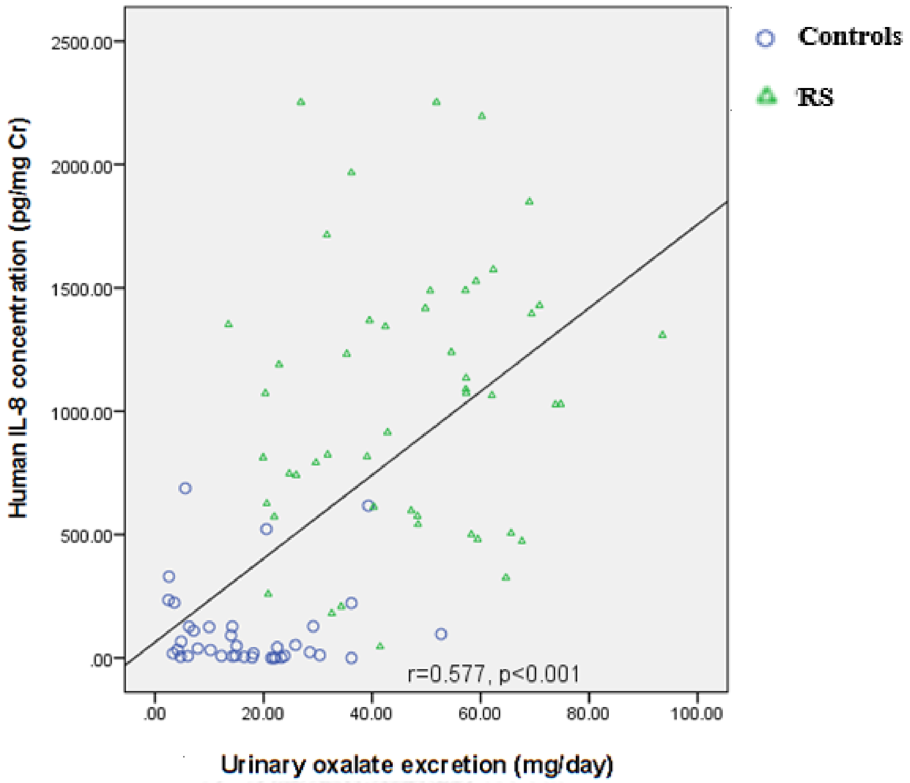


ภาพที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 5-mC% กับตัวบ่งชี้ชีวภาพต่างๆ ในปัสสาวะของ RS และ control พบระดับ 5-mC% มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ A: ระดับ IL-8 (r=0.378, p<0.001) B: ปริมาณออกซาเลต (r=0.346, p<0.001) C: กรดยูริก (r=0.344, p=0.002) และ D: โปรตีน (r=0.289, p=0.004) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ E: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (r=-0.330, p=0.001) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

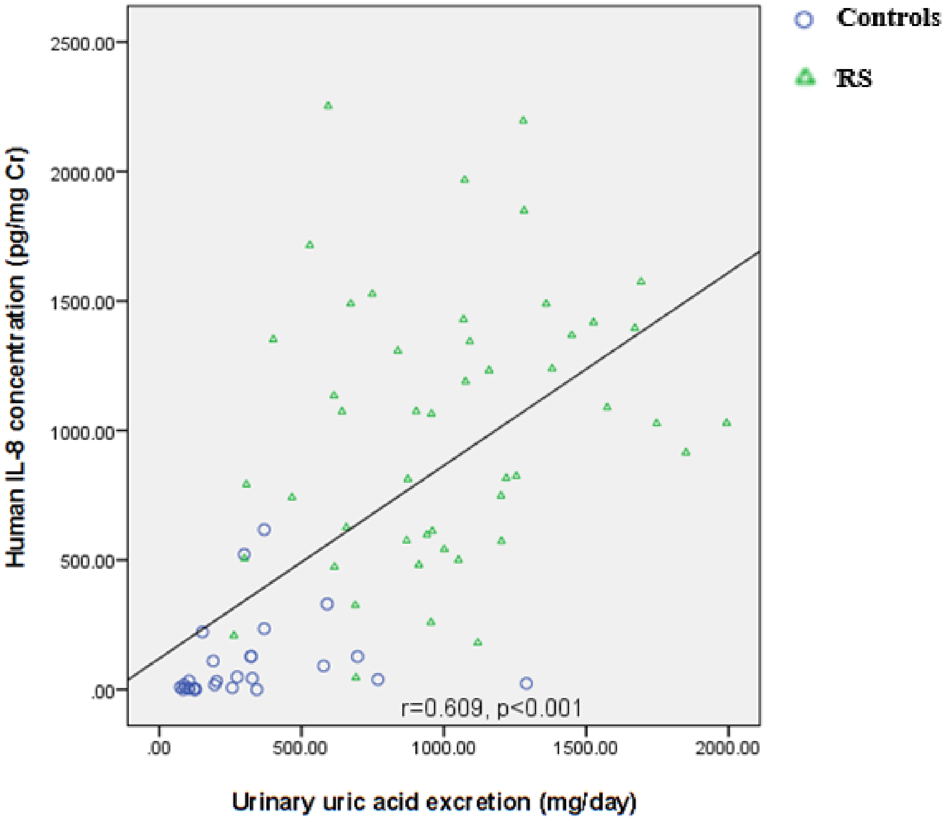
<u>ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง IL-8 กับตัวบ่งชี้ชีวภาพต่างๆ</u>

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ IL-8 กับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์ต่างๆในปัสสาวะของ RS และ control พบว่า ระดับ IL-8 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณออกซาเลต (r=0.577, p<0.001) (ภาพที่ 15A) กรดยูริก (r=0.609, p<0.001) (ภาพที่ 15B) และโปรตีนในปัสสาวะ (r=0.587, p<0.001) (ภาพที่ 15C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (r=-0.549, p<0.001) (ภาพที่ 15D) และปริมาณซิเตรท(r=-0.344, p=0.001) (ภาพที่ 15E) ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) แสดงให้เห็นระดับ IL-8 มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดยูริกมากที่สุด

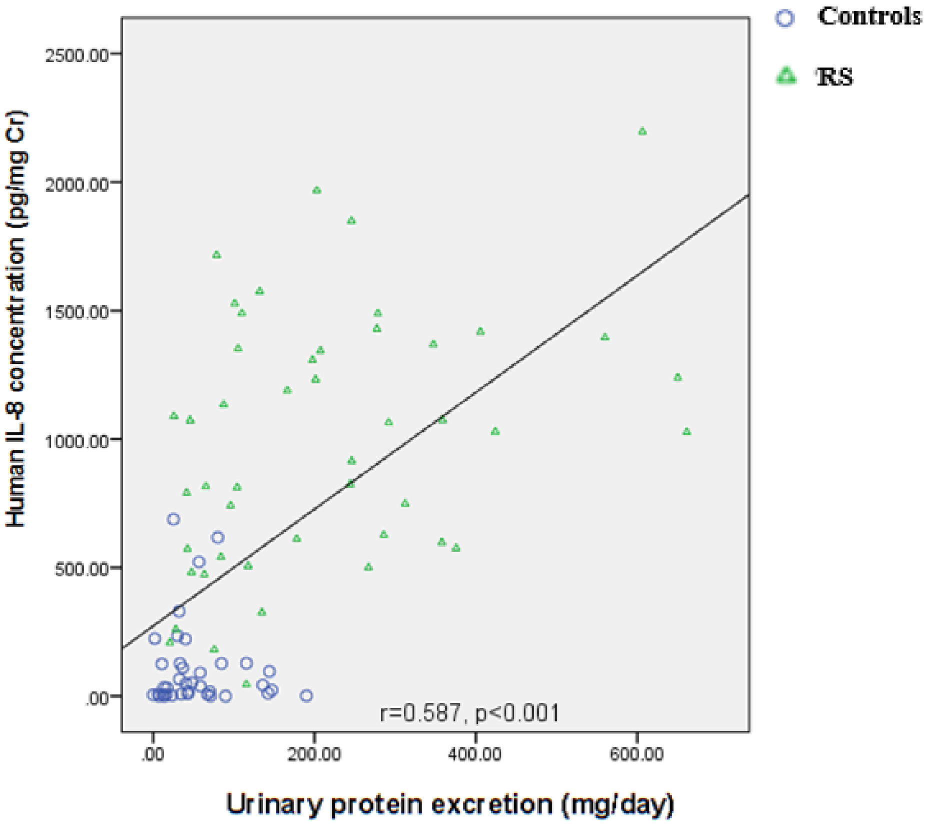
A


Controls
RS
Human IL-8 concentration (pg/mg Cr)
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
.00
r=0.577, p<0.001
.00
20.00
40.00
60.00
80.00
100.00
Urinary oxalate excretion (mg/day)

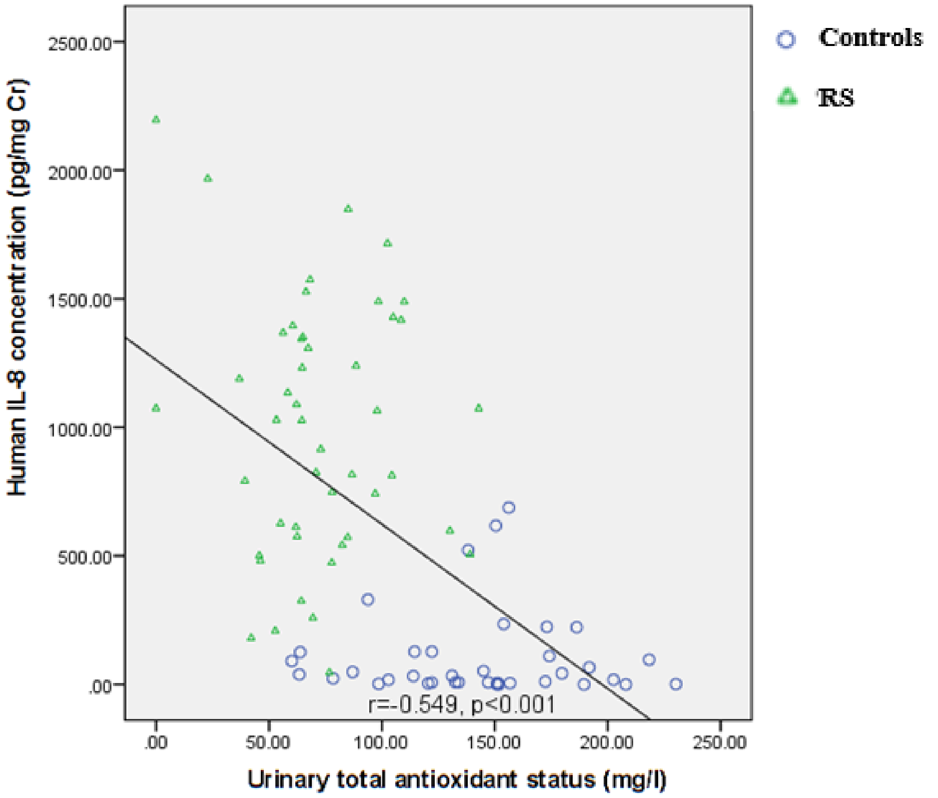
B

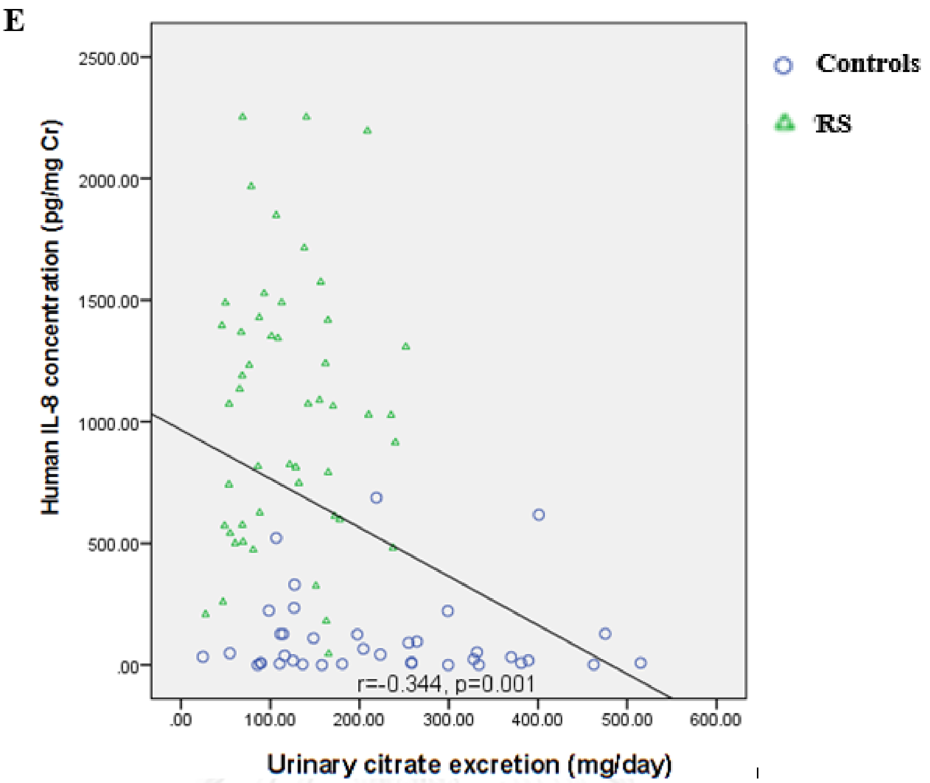

Controls
RS
Human IL-8 concentration (pg/mg Cr)
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
.00
r=0.609, p<0.001
.00
500.00
1000.00
1500.00
2000.00
Urinary uric acid excretion (mg/day)

C


Controls
RS
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
.00
Human IL-8 concentration (pg/mg Cr)
r=0.587, p<0.001
.00
200.00
400.00
600.00
Urinary protein excretion (mg/day)

D


Controls
RS
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
.00
Human IL-8 concentration (pg/mg Cr)
r=-0.549, p<0.001
.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
Urinary total antioxidant status (mg/l)



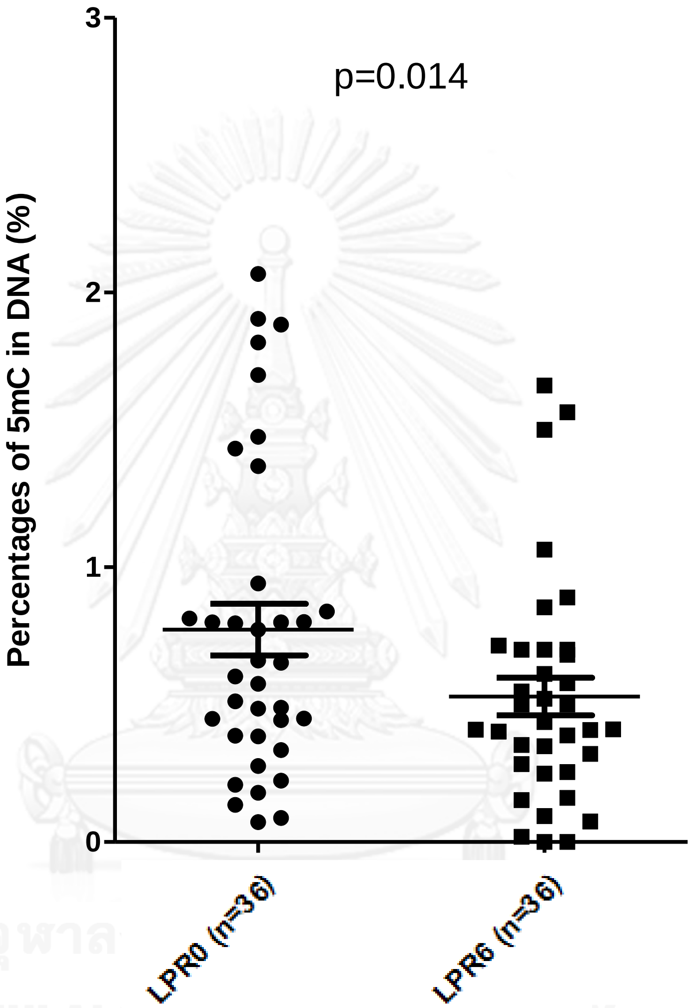
ภาพที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ IL-8 กับตัวบ่งชี้ชีวภาพต่างๆ ในปัสสาวะของ RS และcontrol พบว่า ระดับ IL-8 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ A: ปริมาณออกซาเลต (r=0.577, p<0.001) B: กรดยูริก (r=0.609, p<0.001) และ C: โปรตีนในปัสสาวะ (r=0.587, p<0.001) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ D: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (r=-0.549, p<0.001) และ E: ปริมาณซิเตรท(r=-0.344, p=0.001) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

<u>ผลของการให้ยาสูตรมะนาวผง</u>

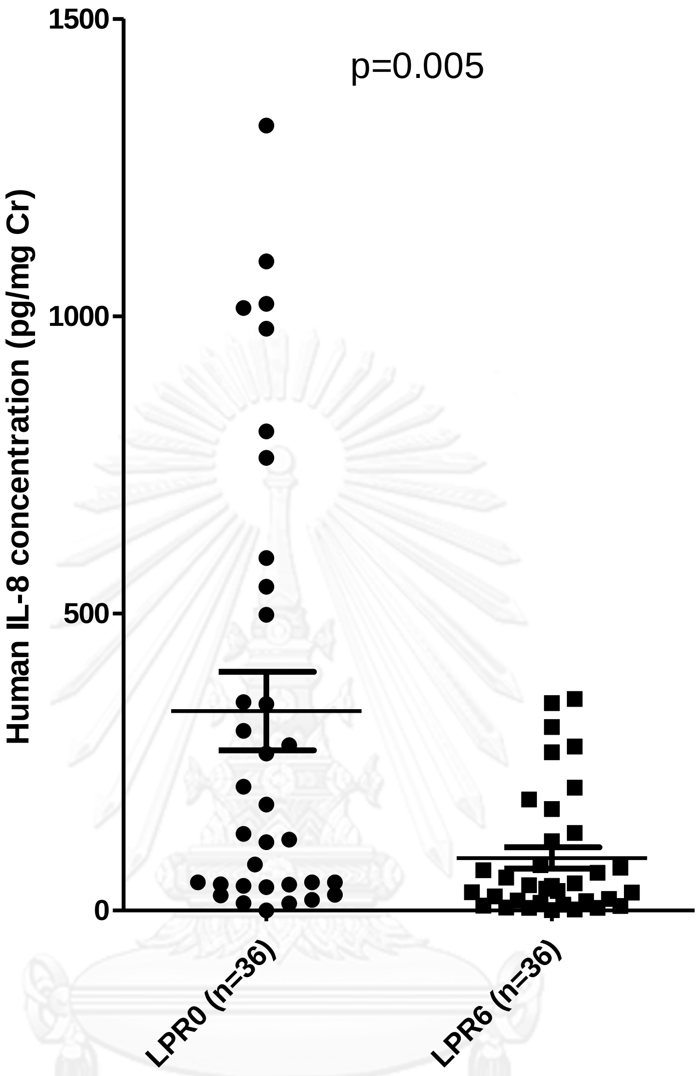
ผลของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ซึ่งได้รับยาสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับ 5-mC% ของ LPR0 เท่ากับ 0.773±0.094 % และ LPR6 เท่ากับ 0.529±0.068 % ซึ่งค่าเฉลี่ยระดับ 5-mC% ของ LPR0 สูงกว่า LPR6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.014) (ภาพที่ 16)

เมื่อพิจารณาผลของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ IL-8 พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับ IL-8 ของ LPR0 เท่ากับ 335.47±64.14 pg/mg Cr LPR6 เท่ากับ 90.85±17.84 pg/mg Cr และนอกจากนี้ได้วิเคราะห์ระดับ IL-8 ของกลุ่มผู้ป่วยซึ่งได้รับยาหลอก (PLA6) จำนวน 36 ราย พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 258.61±61.69 pg/mg Cr ซึ่งค่าเฉลี่ยระดับ IL-8 ของ LPR0 สูงกว่า PLA6 อย่างไม่มี

นัยสำคัญทางสถิติ (p=0.544) รวมทั้ง LPR0 และ PLA6 มีระดับ IL-8 สูงกว่า LPR6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.005 และ p=0.018) กล่าวคือผู้ป่วยที่ได้รับยาสูตรมะนาวผงมีระดับ IL-8 ลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 16 ผลของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ 5-mC% พบว่า LPR0 มีระดับ 5-mC% สูงกว่า LPR6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 17 ผลของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ IL-8 ผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่า LPR0 มีระดับ IL-8 สูงกว่า PLA6 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.544) LPR0 และ PLA6 มีระดับ IL-8 สูงกว่า LPR6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.005 และ p=0.018)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์ รวมทั้งศึกษาผลของการให้ยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบ

ผลการวิเคราะห์ระดับ 5-mC% และระดับ IL-8 พบว่า RS มีระดับ 5-mC% ใน DNA เม็ดเลือดขาวและระดับ IL-8 ในปัสสาวะสูงกว่า control จากการวิเคราะห์คุณค่าทางการวินิจฉัยของตัวบ่งชี้ระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบ พบว่า ระดับ 5-mC% มีค่า AUC เท่ากับ 0.8155 ที่ค่า cutoff 0.5% มีค่า sensitivity เท่ากับ 68.00% และค่า specificity เท่ากับ 74.00% สำหรับ IL-8 มีค่า AUC เท่ากับ 0.9514 ที่ค่า cutoff 247.1 pg/mg Cr มีค่า sensitivity เท่ากับ 94.00% และค่า specificity เท่ากับ 92.00% รวมทั้ง RS ยังมีปริมาณ protein carbonyl ออกซาเลต กรดยูริก และโปรตีนสูงกว่า control และมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และซิเตรทในปัสสาวะต่ำกว่า control

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่าระดับ 5-mC% มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ IL-8 ปริมาณออกซาเลต กรดยูริกและโปรตีน และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และพบระดับ IL-8 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณออกซาเลต กรดยูริกและโปรตีน และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมและปริมาณซิเตรท ทั้งนี้หากพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ พบว่า ระดับ 5-mC% มีความสัมพันธ์กับระดับ IL-8 มากที่สุด ($r=0.378$, $p<0.001$) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระดับปานกลาง และระดับ IL-8 มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดยูริกมากที่สุด ($r=0.609$, $p<0.001$) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระดับสูง

เมื่อพิจารณาผลของยาสูตรมะนาวผง พบว่า LPR6 มีระดับ 5-mC% และระดับ IL-8 ต่ำกว่า LPR0 รวมทั้ง LPR6 มีระดับ IL-8 ต่ำกว่า PLA6 ด้วย สรุปจากผลการศึกษานี้ พบว่า ยาสูตรมะนาวผงสามารถลดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบได้

อภิปรายผลการวิจัย

ผู้ป่วยโรคนิ่วไตซึ่งเข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสัมภาษณ์พฤติกรรมการดำเนินชีวิตก่อนได้รับการกำจัดนำก้อนนิ่วออก และได้รับคำแนะนำการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดำเนินชีวิตและการบริโภคอาหารโดยพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี พบว่า ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วไตซ้ำลดลงและเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยให้ดีขึ้น (57) และงานวิจัยนี้ทำการวัดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติ พบภาวะ global DNA hypermethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าสิ่งแวดล้อม อาหารและการออกกำลังกาย รวมทั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชันและภาวะอักเสบเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเหนือระดับพันธุกรรมโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (58) แต่ผลที่ได้นี้ไม่สามารถบ่งชี้การเป็นโรคนิ่วไตได้แม่นยำนักเนื่องจากระดับ 5-mC% ที่วัดได้มีการกระจายเป็นช่วงกว้างและมีความแตกต่างกันมาก (wide ranges and varied levels) ซึ่งส่งผลต่อ specificity ของระดับ 5-mC% ทำให้มีระดับ specificity ต่ำในการตรวจสอบ

จากผลการศึกษาภาวะอักเสบ พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะอักเสบสูงกว่าคนปกติซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vianna และคณะ (59) บ่งชี้ว่าผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีระดับ IL-8 ในพลาสมาและปัสสาวะสูงกว่าในคนปกติที่มีสุขภาพดี รวมทั้งระดับ IL-8 ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับการทำงานไตที่ลดลง การพบภาวะอักเสบสูงในผู้ป่วยโรคนิ่วไตอาจเนื่องมาจากผลึกนิ่วในท่อไตเคลื่อนเข้าสู่ renal interstitium จากนั้นดึงดูดเซลล์อักเสบต่างๆเข้ามาใน interstitium ส่งผลกระตุ้นการอักเสบ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะหลั่ง chemokines และ cytokines ทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้นและเซลล์บุท่อไตถูกทำลายมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง (44) ทั้งนี้มีงานวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ที่กระตุ้นเซลล์ด้วยผลึก COM พบว่ามีการแสดงออกของ chemokines ชนิด IL-1β มากขึ้น และเมื่อมีปริมาณของ COM มากขึ้นเซลล์บุท่อไตจะถูกทำลายมากขึ้น (43, 60) ดังนั้นการเกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเกิดการบาดเจ็บและเกิดภาวะอักเสบ รวมทั้งกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซม โดยเฉพาะส่วนที่มีผลึกเกาะและเนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการเสียหายมากส่งผลให้เกิดพังผืด (fibrosis) ในที่สุด (45) และจากการศึกษาในครั้งนี้ได้วิเคราะห์หาค่าอ้างอิงและและประเมินคุณค่าของการตรวจวัดภาวะอักเสบ จากการวิเคราะห์ ROC curve พบว่าภาวะอักเสบจากการตรวจวัดระดับ IL-8 ในปัสสาวะให้ค่า AUC ที่สูงกว่าระดับ 5-mC% (sensitivity

= 94% และ specificity = 92%) แสดงว่าระดับ IL-8 ในปัสสาวะอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงของโรคนิ่วไตได้ดีกว่าระดับ 5-mC%

จากผลการวิเคราะห์ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาโปรตีนที่เสื่อมสภาพจากผลของ ROS สารที่นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเสื่อมสภาพของโปรตีนจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ protein carbonyl (61, 62) พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ protein carbonyl สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีรายงานการวิจัยซึ่งพบว่า ผู้ป่วยในหลากหลายโรคมีระดับ protein carbonyl เพิ่มสูงขึ้นในเลือดของผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease) (63, 64) โรคเบาหวาน (diabetes) (65, 66) โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) (67) โรคข้ออักเสบ (arthritis) (68, 69) และโรคไวรัสตับเสบชนิด C (hepatitis C) (70) เป็นต้น นอกจากนี้ผลการศึกษาระดับของสารต้านออกซิเดชัน โดยการวัดระดับ TAS พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ TAS ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ จากการที่ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับโปรตีนที่เสื่อมสภาพจากผลของอนุมูลอิสระสูงและระดับสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ จึงบ่งชี้ว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ ดังนั้น ในการรักษาโรคนิ่วไตจึงควรหายาที่สามารถลดระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยควบคู่ไปด้วย

นอกจากนี้ยังพบภาวะความไม่สมดุลของปริมาณสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ เรียกว่า เกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิกของการเกิดนิ่ว ความผิดปกติทางเมแทบอลิกของการเกิดนิ่วซึ่งพบในการศึกษานี้ ได้แก่ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (hyperuricosuria) ภาวะโปรตีนในปัสสาวะสูง (proteinuria) และภาวะซิเตรทในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) ซึ่งจะส่งผลให้ปัสสาวะมีความอิ่มตัวยวดยิ่งสูง แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกนิ่วขึ้นในปัสสาวะที่ไหลผ่านไต (5, 71) โดยภาวะซิเตรทในปัสสาวะต่ำเป็นความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่พบสูงถึงร้อยละ 90 ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย (72, 73) ด้วยเหตุนี้จึงมีการแนะนำให้ผู้ป่วยได้รับซิเตรทเสริม (Citrate supplementation) ภายหลังการผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกเพื่อช่วยลดโอกาสเกิดเป็นนิ่วซ้ำได้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม ภาวะอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมแทบอไลท์ พบระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับภาวะอักเสบมากที่สุด ซึ่งแสดงว่าการเติมหมู่เมทิลของทั้งจีโนมที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับภาวะอักเสบที่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก cytokine และ chemokine บางชนิดสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดเมทิลเลชัน ตามรายงานการวิจัยซึ่งพบว่า methyltransferase activity ใน K562 cells เพิ่มขึ้น 3.2 เท่า เมื่อถูก treat ด้วย IL-6 ทั้งนี้เนื่องจาก methyltransferase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้กับ DNA (74) รวมทั้งมี

รายงานภาวะอักเสบสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ DNA methylation ทั้งในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบและมะเร็งกระเพาะอาหาร เนื่องจาก IL-6 ส่งผลต่อการเปลี่ยนการควบคุมเหนือลำดับเบสในเซลล์ผ่านการควบคุมของ DNA methyltransferase gene (55, 75, 76) นอกจากนี้ยังพบว่า ภาวะอักเสบมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณกรดยูริกมากที่สุด ผู้วิจัยคาดว่า อาจเนื่องมาจากภาวะอักเสบส่งผลให้ไตสูญเสียหน้าที่การทำงานหรือมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง ทำให้กรดยูริกถูกขับออกมาในปัสสาวะมาก (77, 78) หรืออาจเนื่องมาจากปริมาณกรดยูริกสูงในปัสสาวะกระตุ้น proinflammatory บางชนิด ส่งผลให้เกิดภาวะการอักเสบ (79) ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการวิจัยใดอธิบายได้ถึงกลไกการเกิดความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้

เมื่อพิจารณาผลของยาสูตรมะนาวผง พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตหลังได้รับยาสูตรมะนาวผงมีระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบลดลง มีรายงานในผู้ป่วยโรคนิ่วชนิดแคลเซียมซึ่งมีปริมาณซิเตรทในปัสสาวะต่ำ เมื่อดื่มน้ำมะนาวส่งผลให้ผู้ป่วยมีปริมาณซิเตรทในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้น (80) การรับประทานผลไม้หรือดื่มน้ำส้มคั้น 1 ลิตรต่อวัน จะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยในการปกป้องการทำลายของเซลล์บุท่อไตจากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันเป็น MDA รวมทั้งมีสมบัติในการต้านการอักเสบ (81, 82) รวมทั้งมะนาวยังมีองค์ประกอบของ polyphenol ชนิด flavonoid สูง (83) ซึ่ง polyphenol สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs) methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) และ methionine synthase reductase (MTRR) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่เมทิล (84-87) ดังนั้น การที่ผู้ป่วยได้รับยาสูตรมะนาวผงจึงส่งผลให้ระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมลดลง

กล่าวโดยสรุป รายงานนี้เป็นรายงานการศึกษาแรกเกี่ยวกับระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่พบว่ามีระดับที่สูงเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ ระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมที่เปลี่ยนแปลงนี้น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคนิ่วไต นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมมีความสัมพันธ์กับภาวะอักเสบ ข้อมูลวิจัยนี้ชี้แนะว่าการตรวจวัดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและการวัดปริมาณ IL-8 น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้เพิ่มเติมสำหรับการวินิจฉัยโรคนิ่วไตได้ อีกทั้งหลายการศึกษาที่พบว่าการควบคุมและการลดความรุนแรงของโรคเรื้อรังหลายชนิด การบริโภคพฤกษเคมีบางชนิดสามารถลดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบได้ ดังนั้นคณะวิจัยตั้งสมมติฐานว่า นอกจากการเอานิ่วออกโดยวิธีทางศัลยกรรมแล้ว ควรต้องให้การรักษาด้วยยาร่วมกับการเปลี่ยนพฤติกรรมการดำเนินชีวิต (lifestyle modification) การบริโภคอาหาร การออกกำลังกายให้เหมาะสม น่าจะลดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและภาวะอักเสบ และอาจเป็นแนวทางใหมในการรักษาโรคนิ่วไตได้

ข้อเสนอแนะ

1. จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวัดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในงานวิจัยนี้ยังน้อยอยู่ จึงควรเก็บจำนวนตัวอย่างของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นและควรตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจากหลายพื้นที่ เพื่อสามารถเพิ่มความหลากหลายและการกระจายตัวของจีโนไทป์มากขึ้นและอาจพบปัจจัยเสี่ยงที่สามารถทำให้เกิดโรคได้
2. การศึกษานี้ตรวจวัดระดับเมทิลเลชันทั้งจีโนม อาจจะต้องมีการศึกษาระดับเมทิลเลชันของยีนที่จำเพาะเจาะจงต่อโรคนิ่วไตต่อไปในอนาคต ทั้งนี้มีการศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลของยีน KLOTHO ซึ่งเป็นยีนที่ข้องกับการรักษาสมดุลการทำงานของไต พบภาวะ hypermethylation ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (88)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. ไพฑูรย์ คชเสนี,วีระ วิเศษสินธุ์, สมบุญ เหลืองวัฒนากิจ. ศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะและอวัยวะสืบพันธุ์ชาย. สยามสเตชั่นเนอรี่ซัพพลายส์. 2537:288.

2. Krisadapok K, Jatesurakarn S. Kidney stones in Thailand [homepage on the Internet]. Bangkok: The Dollar Group (Thailand); 2011 [cited 2011 Jul 21]. Available from: http://www.cctv-thailand.com/detail.php?pro_id=132&cat_id=47&group_id=1.

3. สมบัติ บวรผดุงกิตติ, เกรียง ตั้งสง่า. อัตราการเกิดนิ่วใหม่ภายหลังการผ่าตัดนิ่วไตในโรงพยาบาลขอนแก่น. วารสารยูโร. 2553:13.

4. Borwormpadungkitti S, Sriboonlue P, Tungsanga K,. Recurrence rates after renal stone surgery in Khon khaen hospital. J Urol. 1992;13.

5. Amaro C, Goldberg J, Amaro J, Padovani C. Metabolic assessment in patients with urinary lithiasis. J Urol. 2005;31(1):29-33.

6. Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, Ratchanon S, Chaisawasdi S, Boonla C. Citraturic, alkalinizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. Urol Res. 2008;36:149-155.

7. Thamilselvan S, Khan SR, Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidant. Urol Res. 2003;31:3-9.

8. Marisa T, Cristina P, Chiara S, Umberto L, Maria N. Acute and chronic acidosis influence on antioxidant equipment and transport proteins of rat jejunal enterocyte. Cell Bio Int. 2011;35:345-353.

9. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Human Carcinogenesis. Int J Cancer. 2007;121(11):2381-2386.

10. Suen J, Liu C, Lin Y, Tsai Y, Juo S, Chou Y. Urinary chemokines/cytokines are elevated in patients with urolithiasis. Urol Res. 2010 Apr;38(2):81-87. PubMed PMID: 20204339.

11. Choi S. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. Int J Cancer. 2009;125(3):723-729.

12. Chalitchagorn K. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. Oncogene. 2004;23(54):8841-8846.

13. Myungjin K, Tiffany I, Kazuko A, Renwei W, Mimi C, Peter W. DNA Methylation as a Biomarker for Cardiovascular Disease Risk. Plusone. 2010;5(3):1-8.

14. Kulkarni A, Chavan P, Mehendale S, Yadav H, Joshi S. Global DNA methylation patterns in placenta and its association with maternal hypertension in pre-eclampsia. Mary Ann Liebert. 2011;30(2):79-84.

15. Pirola L, Balcerczyk A, Tothill R, Haviv I. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. Genome Res. 2011 Oct;21(10):1601-1615. PubMed PMID: 21890681. Pubmed Central PMCID: 3202278.

16. Wang X, Zhu H, Snieder H, Su S, Munn D, Harshfield G. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. BMC Med. 2010;8:87. PubMed PMID: 21176133. Pubmed Central PMCID: 3016263.

17. Taylor E, Stampfer M, Curhan G. Obesity, Weight Gain and the Risk of Kidney Stones. JAMA. 2005;293(4):455-462.

18. Zhao J, Goldberg J, Bremner J, Vaccarino V. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. J Diabetes Res. 2012 Feb;61(2):542-546. PubMed PMID: 22210312. Pubmed Central PMCID: 3266395.

19. Chew B, Zavaglia B, Sutton C, Masson R, Chan S, Hamidizadeh R, Lee J, Arsovska O, Rowley V, Zwirewich C, Afshar K, Paterson R. Twenty-year prevalence of diabetes mellitus and hypertension in patients receiving shock-wave lithotripsy for urolithiasis. BJU Int. 2012;109(3):444-449.

20. Cupisti A, Meola M, Alessandro C, Bernabini G, Pasquali E, Carpi A, Barsotti G. Insulin resistance and low urinary citrate excretion in calcium stone formers. Biomed Pharmacother. 2007;61.

21. Maalouf N, Cameron M, Moe O, Adam B, Sakhaee K. Low Urine pH: A Novel Feature of the Metabolic Syndrome. Clin J Am Soc Nephrol. 2007;2(5):883-888.

22. Dagmara M, Liane M, Paul C, Alan M. Socio-economic status is associated with epigenetic differences in the pSoBid cohort. Int J Epidemiol. 2012:1-10.

23. Elena D, Giuseppe V, Antonio N, Tiziana M, Annalisa T. Nutrition in calcium nephrolithiasis. J Transl Med. 2013;11(109):1-4.

24. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, Prasongwattana V, Borwornpadungkitti S. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. Int J Urol. 1997:537-540.

25. Trinchieri A, Ostini F, Nespoli R, Rovera F, Montanari E, Zanetti G. A prospective study of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. J Urol. 1999;162(1):27-30.

26. Prasongwatana V, Woottisin S, Sriboonlue P. Uricosuric effect of Roselle (Hibiscus sabdariffa) in normal and renal-stone former subjects. J Ethnopharmacol. 2008;117:491-495.

27. Domrongkitchaiporn S, Stitchantrakul W, Kochakarn W. Causes of hypocitraturia in recurrent calcium stone formers: focusing on urinary potassium excretion. Am J Kidney Dis. 2006;48:546-554.

28. Tosukhowong P, Boonla C. The kidney stones [homepage on the Internet]. Bangkok: Biochemistry and Molecular Biology of Metabolic Disease Research Unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University [cited 2011 Apr 12]. Available from: http://www.bmbmd.research.chula.ac.th/knrenal.htm.

29. Zerwekh J, Odvina C, Wuermser L. Reduction of renal stone risk by potassium-magnesium citrate during 5 weeks of bed rest. J Urol. 2007;177:2179-2184.

30. Sriboonlue P, Prasongwatana V, Suwantrai S. Nutritional potassium status of healthy adult males residing in the rural northeast Thailand. J Med Assoc Thai. 1998;81:223-232.

31. Qazi R, Bastani B. Pathophysiology and treatment of kidney stones. Intern Med. 2008:721-726.

32. โอภา วัชระคุปต์ “สารต้านอนุมูลอิสระ” ฉบับปรับปรุงที่ 2, 2550.

33. Salahuddin S, Kok D, Buchholz N. Influence of body temperature on indinavir crystallization under loop of Henle conditions. J Antimicrob Chemother. 2007;59:114-117.

34. Matlaga B, Shah O, Assimos D. Drug-induced urinary calculi. Rev Urol. 2003;5:227-231.

35. Coe F, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. J Clin Invest. 2005;115(10):2598-2608.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

36. Jirakulsomchok D, Tong-un T, Reungjui S. The stones in the urinary tract [homepage on the Internet]. Khonkaen: Faculty of Medicine Khonkaen University; c2003 [cited 2011 Aug 21]. Available from: http://www.md.kku.ac.th/old/modules.php?name=News&file=article&sid=155.

37. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007;39(1):44–84.

38. Habibzadegah-Tari P, Byer K, Khan S. Reactive oxygen species mediated calcium oxalate crystal-induced expression of MCP-1 in HK-2 cells. Urol Res. 2006;34(1):26-36.

39. Boonla C, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. Urol Res. 2007;35(4):185-191.

40. Khan S. Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. Nephron Exp Nephrol. 2004;98(2):55-60.

41. Umekawa T, Chegini N, Khan S. 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. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(4):664-669.

42. Habibzadegah-Tari P, Byer K, Khan S. Oxalate induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in HK-2 cells involves reactive oxygen species. Urol Res. 2005;33(6):440-447.

43. Chen S, Gao X, Sun Y, Xu C, Wang L, 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. Urol Res. 2010;38(1):7-15.

44. De Water R, Noordermeer C, Kwast T, Nizze H, Boeve E, Kok D. Calcium oxalate nephrolithiasis: effect of renal crystal deposition on the cellular composition of the renal interstitium. Am J Kidney Dis. 1999;33(4):761-771.

45. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. Clin Exp Nephrol. 2004;8(2):75-88.

46. Larry C, John W. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:460-475.

47. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson E.A, Appella E, Oppenheim J, Leonard E. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. Proc NatI Acad Sci. 1987;84:9233-9237.

48. Larsen C, Anderson A, Appella E, Oppenheim J, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-I) is also chemotactic for T lymphocytes. science. 1989;243:1464-1466.

49. White M, Yoshimura T, Hook W, Kaliner M, Leonard E. Neutrophil attractant/activation protein-i (NAP-I) causes human basophil histamine release. mmunoL Lett. 1989;22:151-154.

50. Choi S, W Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. Adv Nutr. 2010 Nov;1(1):8-16. PubMed PMID: 22043447. Pubmed Central PMCID: 3042783.

51. Bird A. Perception of epigenetics. Nature. 2007;447:396–398.

52. Robertson K. DNA methylation and human disease. Nature Reviews Genetics. 2005;6:597-610

53. Musolino C, Sant E, Penna G, Alonci A,RussoS, Granata A. Epigenetictherapyin myelodysplasticsyndrome. Eur J Haemat. 2010;84:463-473.

54. Fraga M, Ballestar E, Ropero S. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 26;102(30):10604-10609. PubMed PMID: 16009939. Pubmed Central PMCID: 1174919.

55. Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? J Intern Med. 2007 May;261(5):488-499. PubMed PMID: 17444888.

56. Zhu Z, Z Hou L, Bollati V,Baccarelli A. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. Int J Epidemiol. 2012 Feb;41(1):126-139. PubMed PMID: 20846947. Pubmed Central PMCID: 3304518.

57. Boongthong D, Klinhom T, Teskamjon N, Tosukhowong P. Lifestyle modification improve quality of life and alleviate risk of renal stone formation in patients with kidney stone. Thai J Uro. 2014;35(2):1-11.

58. Victoria K, Duncan C, Thomas A, Joan L Carrie V, Thomas M, Kimberly D, Robert W, Peter W. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure–response relationships. Hum Genet. 2012;131:1565–1589.

59. Vianna H, Soares C, Silveira K, Elmiro G, Mendes P, de Sousa M, Teixeira M, Miranda D, Simoes E, Silva A. Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases. Pediatric Nephrology. 2013;28(3):463-469.

60. Shrikant R, Onkar P, Khader V, Migliorini A. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1β secretion. Clinical Inv. 2013;23(1):236-246.

61. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman E. Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. Free radical research. 2000;33:S99.

62. Shacter E. QUANTIFICATION AND SIGNIFICANCE OF PROTEIN OXIDATION IN BIOLOGICAL SAMPLES 1. Drug metabolism reviews. 2000;32(3-4):307-326.

63. Smith C. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(23):10540.

64. Aksenov M, Aksenova M, Butterfield D, Geddes J, Markesbery W. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. Neuroscience. 2001;103(2):373-383.

65. Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F, Micelli-Ferrari T, Cardia L, Altomare E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. FRBM. 1998;25(3):369-372.

66. Telci A, akatay U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. DRCP. 2000;50(3):213-223.

67. Lih-Brody L. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. Digestive diseases and sciences. 1996;41(10):2078-2086.

68. Mantle D, Falkous G, Walker D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. CCA. 1999;284(1):45-58.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

69. Renke J, Popadiuk S, Korzon M, Bugajczyk B, Wozniak M. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. FRBM. 2000;29(2):101-104.

70. De Maria N. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. FRBM. 1996;21(3):291-295.

71. JR Asplin. Evaluation of the kidney stone patient. Semin Nephrol. 2008;28:99-110.

72. Tosukhowong P, Borvonpadungkitti S, Prasongwatana V. Urinary citrate excretion in patients with renal stone: roles of leucocyte ATP citrate lyase activity and potassium salts therapy. Clin Chim Acta. 2002;325:71-78.

73. Tosukhowong P, Tungsanga K, Phongudom S, Sriboonlue P. Effects of potassium-magnesium citrate supplementation on cytosolic ATP citrate lyase and mitochondrial aconitase activity in leukocytes: a window on renal citrate metabolism. Int J Urol. 2005;12:140-144.

74. Hodge D, Xiao W, Clausen P, Heidecker G, Moshe S, William L. Interleukin-6 Regulation of the Human DNA Methyltransferase (HDNMT) Gene in Human Erythroleukemia Cells. J Biol Chem. 2001;276:39508-39511.

75. Jang T, Kim D, Shin Y, Chang H, Yang C. p16(INK4a) promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation. Int J Cancer. 2001;93:629.

76. Kang G, Lee H, Hwang K, Lee S, Kim J, Kim J. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. Am J Pathol. 2003;163(4):1551-1556.

77. Knauf F, Asplin J, Granja I, Schmidt I, Moeckel G, David R, Flavell R, Aronson P. NALP3-mediated inflammation is the principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. Kidney Int. 2013;84:895-901.

78. Donadelli R, Zanchi C, MorigiMet A. Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor kappaB- and p38 mitogen-activated protein kinasedependent pathways. J Am Soc Nephrol 2003:2436–2446.

79. Zhou Z, Fang L, Jiang L, Wen P, Cao H, He W, Dai C,Yang J. Uric Acid Induces Renal Inflammation via Activating Tubular NF-kB Signaling Pathway. PLoS One. 2012;7(6):e39738.

80. Seltzer M, Low R, McDonald M, Shami G, Stoller M. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. J Urol. 1996;156:907-909.

81. Odvina C. Comparative value of orange juice versus lemonade in reducing stone-forming risk. CJASN. 2006;1:1269-1274.

82. Wabner C, Pak C. Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors. J Urol. 1993;149:1405-1408.

83. Fukuchi Y, Hiramitsu M, Okada M, Hayashi S, Nabeno Y,Osawa T, Naito M. Lemon Polyphenols Suppress Diet-induced Obesity by Up-Regulation of mRNA Levels of the Enzymes Involved in β-Oxidation in Mouse White Adipose Tissue. J Clin Biochem Nut. 2008;43:201-209.

84. Sola` R, Valls RM, Goda`s G, Perez-Busquets G, Ribalta J. Cocoa, hazelnuts sterols and soluble fiber cream reduces lipids and inflammation biomarkers in hypertensive patients: a randomized controlled trial. Plosone. 2012;7:e31103.

85. Fang M, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman J. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARb, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. Clin Cancer Res 2005;11:7033–7041.

86. Fang J, Xiao S. Folic acid, polymorphisms of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. J Gastroenterol. 2003;38:821-829.

87. Das P, Singal R. DNA methylation and cancer. J Clin Oncol. 2004;22:4632-4642.

88. Young G, Wu V. KLOTHO methylation is linked to uremic toxins and chronic kidney disease. Kidney Int. 2012;81:611-612.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีนในปัสสาวะ

1.1 เตรียม CBB solution

โดยชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 dye 0.10 กรัม

ละลายใน absolute ethanol 50 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 600 มิลลิลิตร

1.2 เตรียม Orthophosphoric acid solution

โดยตวง Orthophosphoric acid ปริมาตร	510.00	มิลลิลิตร
ตวง hydrogen phosphate ปริมาตร	70.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปริมาตร	420.00	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน

1.3 เตรียม CBB reagent เพื่อนำไปใช้

ผสม CBB solution และ acid reagent ในอัตราส่วน 3 : 2 ให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จำนวน 2 ครั้ง ก่อน จึงนำไปใช้ได้วัดโปรตีน

2.การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ระดับโปรตีนคาร์บอนิล (protein carbonyl) ในสารตัวอย่างพลาสมา

2.1เตรียม Trichloroacetic acid (20% w/v TCA)

ชั่ง TCA (MW = 163.40 g/mol)	20.00	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร	100.00	มิลลิลิตร

2.2 เตรียม DNPH (2,4-dinitrophynylhydrazine)

โดยตวง HCl (37%) ปริมาตร 98.50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 500.00 มิลลิลิตร

ชั่ง DNPH (MW = 198.14 g/mol) มา 0.991 กรัม ละลายใน HCl ที่เตรียมไว้

2.3 เตรียม Ethanol : Ethyl acetate ในอัตราส่วน 1 : 1

โดยตวง 95% ethanol ปริมาตร	500.00	มิลลิลิตร
ตวง Ethyl acetate ปริมาตร	500.00	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้ากัน

2.4 เตรียม Quanidine hydrochloride (GdmCl) solution

โดยชั่ง KH_2PO_4 (MW = 136.092 g/mol) 34.023 กรัม

ชั่ง GdmCl (MW = 95.53 g/mol) 286.60 กรัม

นำสารทั้งสองไปละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้ 2.5 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

3.1เตรียมสารละลาย DPPH

ชั่ง DPPH	0.001 กรัม
เอทานอล	25.00 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา

4. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดยูริกในสารตัวอย่างปัสสาวะ

4.1 เตรียม Phosphotungstic ปริมาตร 2 ลิตร

ชั่ง Sodium Tungstate	80.00 กรัม
น้ำกลั่น	1.50 ลิตร
Orthophosphoric acid	64.00 มิลลิลิตร

จากนั้นบ่มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

ชั่ง $LiSO_4H_2O$ 16.00 กรัม

จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 2 ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ

(Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวและผลของการรักษาด้วยมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่ว

ผู้สนับสนุนทุนวิจัย ไม่มี

<u>ผู้ทำวิจัย</u>

ชื่อ นางสาวธนิดา จิระมงคลศิริ

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 083-155-4222

E-mail: thanida_chi@hotmail.com

<u>ผู้ร่วมในโครงการวิจัย</u>

ชื่อ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-2564482 มือถือ 081-5187618

ชื่อ อาจารย์ ดร.นพ.ฐสิณัส ดิษยบุตร

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-2564482 มือถือ 081-8706400

ชื่อ ผศ. ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-2564482

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ซึ่งเคยเข้าร่วมในโครงการวิจัย เรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆเพิ่มเติม กรุณาซักถามจากผู้ทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

<u>เหตุผลความเป็นมา</u>

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาสำคัญของระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้บ่อยทั่วโลก ในประเทศไทยพบว่ามีอุบัติการณ์การเป็นโรคนิ่วไตสูงมากในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อีกทั้งโรคนิ่วไตยังเป็นโรคที่มีอัตรากลับเป็นซ้ำสูงภายหลังการรักษาทั้งด้วยวิธีสลายนิ่วหรือการผ่าตัด และมีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคไตวายเรื้อรังตามมา อาจารย์ปิยะรัตน์และคณะจึงได้พัฒนาสูตรมะนาวผงจากน้ำมะนาวสดสำหรับนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำภายหลังการผ่าตัดเอานิ่วออก ผลการศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบว่า การได้รับสูตรมะนาวผง สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วได้เทียบเท่ากับยาโพแทสเซียมซิเตรตที่ใช้ในปัจจุบัน โดยการเพิ่มระดับสารยับยั้งนิ่วซิเตรตในปัสสาวะ และเพิ่มความเป็นด่างของปัสสาวะ และที่สำคัญสูตรมะนาวผง ยังสามารถลดระดับภาวะเครียดในเซลล์และการบาดเจ็บของเซลล์ไตได้

ปัจจุบันสาเหตุของการเกิดโรคนิ่วไตยังไม่ทราบแน่ชัด และยังพบอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นในประชากรที่มีภาวะอ้วน ความดันเลือดสูง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบและโรคเบาหวาน การกระจายตัวของผู้ป่วยโรคนิ่วภายในครอบครัวเดียวกันยังไม่ได้รับการพิสูจน์ตามการถ่ายทอดตามหลักของเมนเดล เป็นที่ยอมรับว่ามียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีน แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมและปัจจัยทางโภชนาการของผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนผ่านการควบคุมเหนือลำดับเบส (epigenetic)

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงการควบคุมเหนือลำดับเบสในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และศึกษาผลกระทบของยาสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิก การควบคุมเหนือลำดับเบส ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและภาวะอักเสบในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับยาสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลา 6 เดือนเปรียบเทียบกับคนปกติ โดยเชื่อว่าผลการเปลี่ยนแปลงเหนือลำดับเบสทั้งจีโนม (global DNA methylation) ซึ่งเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดที่จำเป็นใช้ในการสร้างและจำเป็นต่อการดำรงชีวิตอย่างปกติของสิ่งมีชีวิต น่าจะมี

ความสัมพันธ์กับตัวบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) ที่ศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิกหลายชนิดได้ในอนาคต

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษา</u>

ยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีชื่อว่า " ยาสูตรมะนาวผง " ซึ่งเป็นยาที่อยู่ในกระบวนการศึกษาประสิทธิภาพในการรักษาสำหรับผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยมีวัตถุประสงค์จากการศึกษาในครั้งนี้คือ

- เพื่อศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงเหนือลำดับเบสทั้งจีโนม (global DNA methylation) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคนิ่วไตก่อนการผ่าตัด หลังการผ่าตัดและผู้ป่วยซึ่งไม่มีก้อนนิ่วที่ได้รับยาสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลา 6 เดือน เทียบกับคนปกติ
- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเปลี่ยนแปลงเหนือลำดับเบสทั้งจีโนม (global DNA methylation)กับเมแทบอไลท์ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และภาวะการอักเสบ

<u>วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย</u>

การศึกษาครั้งนี้จำนวนสารตัวอย่างที่คัดเลือกอ้างอิงจากจำนวนสารตัวอย่างของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติที่มีในโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต" จำนวน100 คน แบ่งเป็นคนปกติ 50 รายและผู้ป่วยโรคนิ่วไต 50 ราย ซึ่งผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะมีสารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงทั้งสิ้น 3 ระยะ อันได้แก่ ก่อนทำการผ่าตัดนำนิ่วออก หลังผ่าตัดนำก้อนนิ่วออกแล้วพร้อมทั้งได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีก้อนนิ่วเหลืออยู่ และระยะหลังจากตรวจยืนยันว่าไม่มีก้อนนิ่วผู้ป่วยได้รับยาสูตรมะนาวผง (Lime Powder Regimen ,LPR) เป็นระยะเวลานาน 6 เดือน ซึ่งที่ระยะสุดท้ายมีสารตัวอย่างจำนวน 35 ราย จากผู้ป่วยที่ได้รับยาสูตรมะนาวผง (สารตัวอย่างอีก 15 รายเป็นผู้ที่ได้รับยาหลอก) ตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงเหนือลำดับเบสทั้งจีโนม (global DNA methylation) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และตรวจวัดเมแทบอไลท์ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และภาวะอักเสบจากสารตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

<u>ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ไม่เกี่ยวข้อง เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติจากโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต"

ผู้วิจัยจะเชิญอาสาสมัครที่เคยเข้าร่วมในโครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต" อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยขอความร่วมมือจากท่านในการอนุเคราะห์ให้ใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของท่านสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ด้วย

<u>ความเสี่ยงที่อาจได้รับ</u>

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจะเชิญอาสาสมัครที่เคยเข้าร่วมในโครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต" ซึ่งอาจเกิดความเสี่ยงต่อตัวผู้เข้าร่วมการวิจัยเพียงเล็กน้อย คือข้อมูลความลับของผู้เข้าร่วมการวิจัยอาจถูกเปิดเผย แต่ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้เข้าร่วมการวิจัย โดยข้อมูลของผู้เข้าร่วมการวิจัยจะแสดงในรูปของรหัสของการวิจัย ซึ่งไม่สามารถระบุถึงตัวบุคคลได้

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ทั้งนี้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของท่านอาจเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยหาแนวทางในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิกหลายชนิดได้ในอนาคต

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ไม่เกี่ยวข้อง เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจะเชิญอาสาสมัครที่เคยเข้าร่วมในโครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต" และจะขอใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะเพื่อศึกษาในโครงการวิจัยใหม่นี้

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ไม่เกี่ยวข้อง เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจะเชิญอาสาสมัครที่เคยเข้าร่วมในโครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต" และจะขอใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะเพื่อศึกษาในโครงการวิจัยใหม่นี้ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยขอความร่วมมือจากท่านในการอนุเคราะห์ให้ใช้เลือดและปัสสาวะของท่านสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ด้วย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

ไม่เกี่ยวข้อง เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจะเชิญอาสาสมัครที่เคยเข้าร่วมในโครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต" และจะขอใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะเพื่อศึกษาในโครงการวิจัยใหม่นี้

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร</u>

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกความยินยอม ให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้งหรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ นางสาวธนิดา จิระมงคลศิริ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เบอร์โทรศัพท์ 083-1554222

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

<u>การจัดการเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือ</u>

ตัวอย่างชีวภาพที่ได้จากอาสาสมัคร คือ เลือดและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงที่เหลือจากการวิจัย ผู้วิจัยอาจจะจัดการโดยขอเก็บตัวอย่างสำหรับตรวจซ้ำ เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลอง เป็นระยะเวลาไม่เกิน 1 ปี คือ ภายในวันที่ 31 มีนาคม 2557

<u>สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
4. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
5. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

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

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวและผลของการรักษาด้วยมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่ว (Global DNA methylation in peripheral blood cell and the effect of Lime Powder Regimen in urolithiasis patient)

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.......................เดือน.......................พ.ศ..........................

ข้าพเจ้านาย/นาง/นางสาว...

ที่อยู่...

ได้อ่านเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.......................................และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่ ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยครั้งนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยโดยละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ้อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูล ประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือสารตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้าสามารถที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคต หรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอม

....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(...) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

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

ข้าพเจ้า ☐ ยินยอม ให้ผู้วิจัยเก็บสารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะที่เหลือจากการวิจัยไว้ 1 ปี เพื่อใช้ศึกษาวิจัยในอนาคต ทั้งนี้ข้าพเจ้ารับทราบว่าผู้วิจัยจะเสนอโครงการวิจัยให้คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยพิจารณาก่อนดำเนินการวิจัย

☐ ไม่ยินยอม ให้ผู้วิจัยเก็บสารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะที่เหลือจากการวิจัยไว้ใช้ศึกษาวิจัยในอนาคต

....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(...) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

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

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

....ลงนามผู้ทำวิจัย

(...) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

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

....ลงนามพยาน

(...) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

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

ภาคผนวก ง

ผลงานวิทยานิพนธ์ได้รับการพิจารณาตีพิมพ์ลงวารยูโร ปีที่ 35 เล่มที่ 2 ในหัวข้อเรื่อง “ความสัมพันธ์ระหว่างระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวกับอินเตอร์ลิวคิน-8 และโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต”

วารสารยูโร The Thai Journal of Urology

วารสารวิชาการของสมาคมศัลยแพทย์ระบบปัสสาวะแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

The Thai Urological Association under the Royal Patronage

สำนักงานวารสาร : หน่วยศัลยศาสตร์ระบบปัสสาวะ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

โทรศัพท์ : (662) 716-6672, 6681-988-8408 โทรสาร : (662) 716-6672 E-Mail : thaijournalurology@gmail.com

---

ที่ ศธ.0521.1.0610(7)/ 14

วันที่ 3 มีนาคม 2557

เรื่อง การรับลงตีพิมพ์ต้นฉบับในวารสารยูโร

เรียน นางสาวชนิดา จิระมงคลศิริ

ตามที่ท่านกรุณาให้เกียรติส่งบทความเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวกับอินเตอร์ลิวคิน-8 และโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต เพื่อตีพิมพ์ในวารสารยูโรนั้น กองบรรณาธิการวารสารยูโร ได้รับบทความดังกล่าว และได้ดำเนินการผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิเรียบร้อยแล้ว โดยจะนำลงตีพิมพ์ในวารสารยูโร ปีที่ 35 เล่มที่ 2 และหลังจากวารสารฉบับดังกล่าวได้ตีพิมพ์เผยแพร่แล้ว ท่านสามารถเข้าไปอ่านต้นฉบับได้ใน website ของสมาคมศัลยแพทย์ระบบปัสสาวะ แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ tuanet.org

กองบรรณาธิการ ฯ หวังว่า จะได้รับบทความที่น่าสนใจจากท่าน เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารยูโรในโอกาสต่อไป

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงมณฑิรา ตัณฑนุช)

บรรณาธิการวารสารยูโร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

1. ชื่อ-นามสกุล:

(ภาษาไทย) นางสาวธนิดา จิระมงคลศิริ

(ภาษาอังกฤษ) MISS THANIDA CHIRAMONGKOLSIRI

2. ประวัติ :

เพศ หญิง

อายุ 24 ปี

สถานภาพ โสด

3. ที่อยู่ :

1482/395 ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

เบอร์โทรศัพท์ 0831554222

E-mail: thanida_chi@hotmail.com

4. การทำงาน: -

5. ประวัติการศึกษา :

พ.ศ. 2551-2555 ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศิลปากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University