

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคนิ่วระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary stones, urolithiasis) เป็นปัญหาสาธารณสุขของไทยมายาวนาน โดยเฉพาะในชุมชนชนบทของไทย การศึกษาของ Yanagawa และคณะ ในปี 1997 พบความชุกของโรคนิ่วในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณร้อยละ 16.9 นั่นคือประชากรในชนบทวัยผู้ใหญ่ 100 คน จะมีคนที่ป่วยเป็นโรคนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะประมาณ 17 คน ซึ่งสูงมากและเป็นปัญหาสาธารณสุขชุมชนที่ต้องการการแก้ไขหรือบรรเทาอย่างเร่งด่วน

โดยทั่วไปโรคนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะประกอบด้วย นิ่วไต (Kidney stone, nephrolithiasis) นิ่วท่อไต (Ureteral stone) และนิ่วกระเพาะปัสสาวะ (Urinary bladder stone) ในอดีตนิ่วกระเพาะปัสสาวะมีอุบัติการณ์สูงเนื่องจากสัมพันธ์กับการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ แต่ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะมากขึ้น และประชาชนมีสุขอนามัยดีขึ้น ทำให้อุบัติการณ์ของนิ่วกระเพาะปัสสาวะลดลงมาก นิ่วส่วนใหญ่ที่พบในปัจจุบันคือนิ่วไต ซึ่งพบได้มากกว่าร้อยละ 80 ของนิ่วทั้งหมด และปัญหาที่สำคัญที่สุดของโรคนิ่วคือการเกิดนิ่วซ้ำ ข้อมูลของคณะผู้วิจัยจากการศึกษาในโรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 38 ภายใน 2 ปีหลังการผ่าตัดเอานิ่วออก และการศึกษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 25 ภายใน 3 ปีหลังการสลายนิ่ว ที่สำคัญผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นนิ่วซ้ำหลายครั้ง ซึ่งการเป็นนิ่วซ้ำหลายครั้งส่งผลกระทบต่อการทำลายเซลล์ไต ทำให้ไตเสื่อมและนำไปสู่การเป็นโรคไตวายเรื้อรังในที่สุด ข้อมูลจากสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย รายงานว่าโรคนิ่วไตจัดเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงของโรคไตระยะสุดท้าย (End-stage renal disease, ESRD) ดังนั้นการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำจะสามารถลดอุบัติการณ์ของโรคไตวายเรื้อรังที่ต้องล้างไตได้ และเป็นการช่วยลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคไตระยะสุดท้าย

จำนวนผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากโรคนิ่วมีสูงมาก โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย เนื่องจากปัญหาความยากจนของผู้ป่วยโรคนิ่วและปริมาณโรงพยาบาลที่มีศักยภาพในการผ่าตัดและสลายนิ่วมีน้อย ทำให้มีผู้ป่วยปริมาณที่ต้องรอคิวรับการรักษา และระยะเวลาในการรอประมาณ 3 เดือนสำหรับการผ่าตัดเอานิ่วออก และประมาณ 6 เดือนสำหรับการสลายนิ่ว ทำให้ผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสการเป็นโรคไตวายเรื้อรังสูงขึ้น สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช) ให้ความสำคัญกับการกำจัดและลดอุบัติการณ์การเกิดนิ่วของประชากรในชนบท เพื่อป้องกันการเกิดโรคไตวาย

เรื้อรังและลดค่าใช้จ่ายในการล้างไต โดยมีมาตรการเพิ่มงบประมาณพิเศษแก่โรงพยาบาลที่เข้าร่วมโครงการเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณการผ่าตัดและสลายนีวทั้งในและนอกเวลา เพื่อลดระยะเวลาการรอรับการรักษาของผู้ป่วยโรคนี้และผู้ป่วยได้รับการรักษาฟรี อย่างไรก็ตามมาตรการดังกล่าวเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุและไม่ยั่งยืน การผ่าตัดและสลายนีวเป็นเพียงการรักษาอาการของโรคนี้ (Symptomatic treatment) ไม่ใช่การรักษาที่สาเหตุของการเกิดนีว (Causative treatment) ผู้ป่วยมีผู้ป่วยโอกาสกลับเป็นนีวซ้ำได้เหมือนเดิม และยังคงเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตวายเรื้อรังตามมาเหมือนเดิม คณะผู้วิจัยเสนอว่าการรักษาด้วยยาที่สามารถแก้ไขสาเหตุของการเกิดนีวในผู้ป่วยได้ จะเป็นการแก้ปัญหาที่ต้นเหตุและยั่งยืนมากกว่า โดยยานั้นต้องมีราคาถูก ลดอัตราการเกิดเป็นนีวซ้ำได้สูง ผลข้างเคียงต่ำ และที่สำคัญสามารถผลิตได้ในประเทศไทย เพื่อให้เข้ากับบริบทของสังคมไทยโดยเฉพาะในชนบท

โรคนี้วไตเกิดจากหลายปัจจัย (Multifactorial condition) เกี่ยวข้องกับทั้งปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม พฤติกรรมการรับประทานอาหาร และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยเหล่านี้จะทำให้เกิดความไม่สมดุลของปริมาณสารก่อนีวและสารยับยั้งนีวในปัสสาวะเรียกว่าเกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมของการเกิดนีว ส่งผลให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นตัววยดสูง แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกนีวขึ้นในปัสสาวะที่ไหลผ่านไต เมื่อเกิดภาวะนีวอย่างเรื้อรัง ผลึกนีวจะรวมตัวกันใหญ่ขึ้น กระตุ้นการบาดเจ็บของเซลล์ท่อไต ทำให้มีการเกาะติดของผลึกในท่อไตมากขึ้น เกิดเป็นพลาไกในเนื้อไต เรียกว่า Randall's plaques ผลึกใหม่ที่เกิดขึ้นจะสามารถเจริญบนพลาไกทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นก้อนนีวในที่สุด ความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมของการเกิดนีว ได้แก่ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (Hyperoxaluria) ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (Hypercalciuria) ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (Hyperuricosuria) ภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง (Hyperphosphaturia) ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (Hypokaliuria) และภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia) คณะผู้วิจัยนำโดย ศ.ปิยะรัตน์ โตสุขโจวงศ์ และคณะ ได้ศึกษาสาเหตุและกลไกการเกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมของการเกิดนีวในผู้ป่วยโรคนี้วไทย โดยเฉพาะผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนืออย่างต่อเนื่องเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน พบว่าปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมที่สำคัญและพบมากที่สุดในการเกิดนีวในผู้ป่วยโรคนี้วไทย คือ ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ

ซิเตรตหรือกรดซิตริกเป็นสารนี้วที่ยอมรับกันทั่วโลกว่ามีบทบาทในการยับยั้งการเกิดและเจริญของผลึกนีวในปัสสาวะได้สูงที่สุดในผู้ป่วยโรคนี้วไตไทยพบภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ มากกว่าร้อยละ 90 ของ และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ มากกว่าร้อยละ 70 โดยทฤษฎีแล้วภาวะพร่องหรือขาดโพแทสเซียมทำให้เกิดกรดสูงขึ้นในเซลล์ท่อไต ส่งผลให้มีการดูดกลับซิเตรตมากขึ้น แล้วทำให้ระดับการขับออกของซิเตรตในปัสสาวะต่ำลง คณะผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือบริโภคอาหารที่มีโพแทสเซียมต่ำ ประกอบกับมีการสูญเสียโพแทสเซียมไปทางเหงื่อมาก ทำให้มีระดับโพแทสเซียมในร่างกายต่ำและมีการดูดกลับซิเตรตในปัสสาวะมากขึ้น นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตบริโภคผลไม้ที่มีกรดซิตริก (Citrus fruits) ไม่เพียงพอ ทำให้มีการขับออกของซิเตรตในปัสสาวะ

ต่ำลงด้วย ดังนั้นการรักษาด้วยยา (Medical therapy) ที่เหมาะสมในผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตไทยควรเป็นการให้ ซิเตรตทดแทนส่วนที่ขาดหรือสูญเสียไป ซึ่งจัดเป็น Replacement therapy

การรักษาโรคนี้ทางสัลยกรรม ได้แก่ การสลายนิ่ว และการผ่าตัด มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดก้อนนิ่ว ออก ซึ่งไม่สามารถป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำได้ ดังนั้นผู้ป่วยควรได้รับการรักษาด้วยยาร่วมด้วยเพื่อป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ ยาโพแทสเซียมซิเตรต (Potassium citrate) หรือเกลือซิเตรตในรูปอื่นเป็นยาที่นิยมใช้ในปัจจุบัน สำหรับป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ กลไกการออกฤทธิ์ของยาจะทำให้ปัสสาวะมีความเป็นด่างมากขึ้น (Alkalinizing effect) และเพิ่มปริมาณการขับออกของซิเตรตในปัสสาวะ (Citraturic effect) สามารถลดการเกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะและลดอัตราการเกิดนิ่วซ้ำได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามยาโพแทสเซียมซิเตรตมีผลข้างเคียง (Side effects) ต่อผู้ป่วยมาก เช่น ระบายท้องระบบทางเดินอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ปวดหัว เป็นต้น ประเทศไทยยังไม่มีผู้นำเข้ายาโพแทสเซียมซิเตรตมาใช้ แต่มีการเตรียมใช้เองในโรงพยาบาลในรูปของสารละลาย Shohl's solution แต่มีปัญหาคือสารละลายดังกล่าวตกตะกอนได้ง่าย และมีอายุการใช้งานสั้น อีกทั้งยังไม่มีผลงานวิจัย (Clinical trial phases 1, 2, 3) ยืนยันผลการลดอัตราการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนี้ ดังนั้น การวิจัยและพัฒนายาใหม่ที่มีผลข้างเคียงต่ำและสามารถป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำได้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อผู้ป่วยและน่าจะช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคไตวายเรื้อรังได้ ทำให้ภาครัฐสูญเสียงบประมาณในการดูแลผู้ป่วยโรคไตวายน้อยลง

น้ำมะนาวเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีกรดซิตริกสูงมากและสูงกว่าน้ำส้ม จึงเป็น candidate ที่ควรนำมาวิจัยและพัฒนาเพื่อเป็นยาสำหรับรักษาโรคนี้ ผลงานวิจัยทั้งจากต่างประเทศและของคณะผู้วิจัยเองพบว่าการรักษาด้วยน้ำมะนาวมีฤทธิ์ alkalinizing และ citraturic actions และสามารถยืดระยะเวลาการเกิดนิ่วซ้ำ (Recurrence-free rate) ได้ มะนาวที่ปลูกและเจริญได้ดีในประเทศไทย คือ “Lime (*Citrus aurantifolia*)” มีปริมาณซิเตรตสูงมาก แต่มีข้อด้อยคือ มีโพแทสเซียมต่ำ คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาขึ้นมาใหม่เพื่อใช้เป็นรักษาโรคนี้ว่าไต เรียกว่า สูตรมะนาวผง หรือ Lime powder regimen (LPR) ซึ่งผลิตจากน้ำมะนาวเข้มข้นทำให้เป็นผงโดยวิธีระเหิดแห้งและเติมโพแทสเซียมเพิ่มลงไปให้ได้ขนาดรักษา (Therapeutic dose) ปริมาณโพแทสเซียมและซิเตรตใน LPR 1 ซองเท่ากับ 21 และ 63 mEq ตามลำดับ ผลการศึกษาเบื้องต้นของคณะวิจัยในผู้ป่วยโรคนี้ว่าไต พบว่า LPR มีฤทธิ์ alkalinizing และ citraturic actions เทียบเท่ากับยาโพแทสเซียมซิเตรต แต่มีข้อดีที่เหนือกว่าคือ LPR สามารถลดระดับความเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) และลดระดับการทำลายของเซลล์บุท่อ และยังช่วยเสริมให้ไตทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระใน LPR ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ และอื่นๆ ดังนั้นคณะวิจัยเชื่อมั่นว่า LPR มีศักยภาพที่จะนำมาวิจัยและพัฒนาให้เป็นยารักษาโรคนี้ว่าไตได้

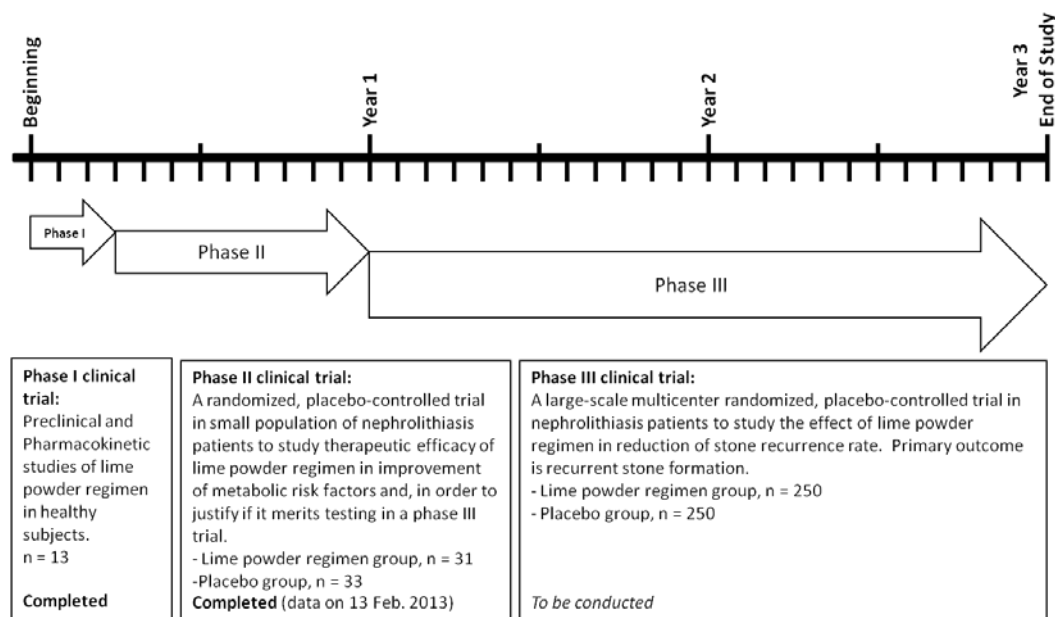
แผนงานวิจัยนี้ มีเป้าหมายในการศึกษาทางคลินิก (Clinical trial) ทั้ง 3 ระยะ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ LPR ในการใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยโรคนี้ว่าไต (ภาพที่ 1) โดยในระยะที่ 1 เป็นการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ ผลข้างเคียง และความปลอดภัยของ LPR ในอาสาสมัครคนปกติ ระยะที่ 2 เพื่อศึกษาผลข้างเคียงและความปลอดภัยของยาเพิ่มเติมและประเมินประสิทธิภาพทางยา LPR เบื้องต้น ในการลด

ความเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมของการเกิดนิ่ว โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ซ้ำก่อนการทำการศึกษาดังกล่าวในระยะที่ 3 ในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น และในระยะที่ 3 จะออกแบบการทดลองเป็น multicenter randomized, placebo-controlled trial รวบรวมกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 ภาค คือ ภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ กลาง และได้ให้เป็นตัวแทนของประชากรโรคนิ่วไตในประเทศไทย เพื่อศึกษาผลของ LPR ต่อการลดลงของการเกิดนิ่วซ้ำภายหลังการรักษาด้วยวิธีทางศัลยกรรม

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 พิสูจน์ได้ว่า LPR มีความปลอดภัยสูง ทั้งต่อหนูทดลอง อาสาสมัครคนปกติสุขภาพดี และผู้ป่วยโรคนิ่วไต ข้อมูลเภสัชจลนศาสตร์ในอาสาสมัครคนปกติสุขภาพดี พบว่า LPR ให้ค่า T_{max} ของ urinary citrate ที่ 7.31 ± 2.27 ชั่วโมง ภายหลังรับประทาน LPR 1 ซอง และมี bioavailability ของ urinary citrate เมื่อได้รับ LPR สูงกว่าการได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการรับประทาน LPR ในขนาด 1 ซองต่อวัน น่าจะเพียงพอในการแก้ไขความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมในปัสสาวะ และเกิดประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่ได้รับการรักษาด้วย LPR เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า LPR สามารถลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีกลไกออกฤทธิ์ที่สำคัญสามประการ คือ เพิ่มระดับซีเทรตในปัสสาวะ (citraturotic effect) ทำให้ปัสสาวะเป็นด่าง (urine alkalinization) และแก้ไขความผิดปกติของความเครียดทางออกซิเดชัน (antioxidation) เนื่องจากในระยะเวลา 6 เดือนที่ติดตามผู้ป่วยยังไม่มีผู้ป่วยที่เกิดนิ่วซ้ำเลย ทั้งในกลุ่มที่ได้รับยาหลอกและ LPR จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า LPR มีผลในการลดอัตราการเกิดนิ่วซ้ำได้หรือไม่ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาต่อในระยะที่ 3 เพื่อติดตามผู้ป่วยเป็นเวลา 2 ปี เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาหลอกและกลุ่มที่ได้รับ LPR



ภาพที่ 1 ภาพรวมศึกษาทางคลินิก (Clinical trial) ระยะที่ 1, 2 และ 3 เกี่ยวกับประสิทธิภาพของ Lime powder regimen ในรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต

3. รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการย่อย

การวิจัยในช่วงแรกนี้แบ่งออกเป็น 2 โครงการวิจัยย่อย ได้แก่

โครงการวิจัยที่ 1: การวิจัยระยะที่หนึ่ง: การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองและเภสัชจลนศาสตร์สูตรมะนาวผงในอาสาสมัครไทยสุขภาพปกติ (Phase I – Lime powder regimen: acute animal toxicity test and pharmacokinetic profiles of lime powder regimen in Thai healthy volunteers)

โครงการวิจัยที่ 2: การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของ lime powder regimen ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Phase II trial of lime powder regimen in patients with kidney stone disease)

โดยมีวัตถุประสงค์ของการวิจัย ดังนี้

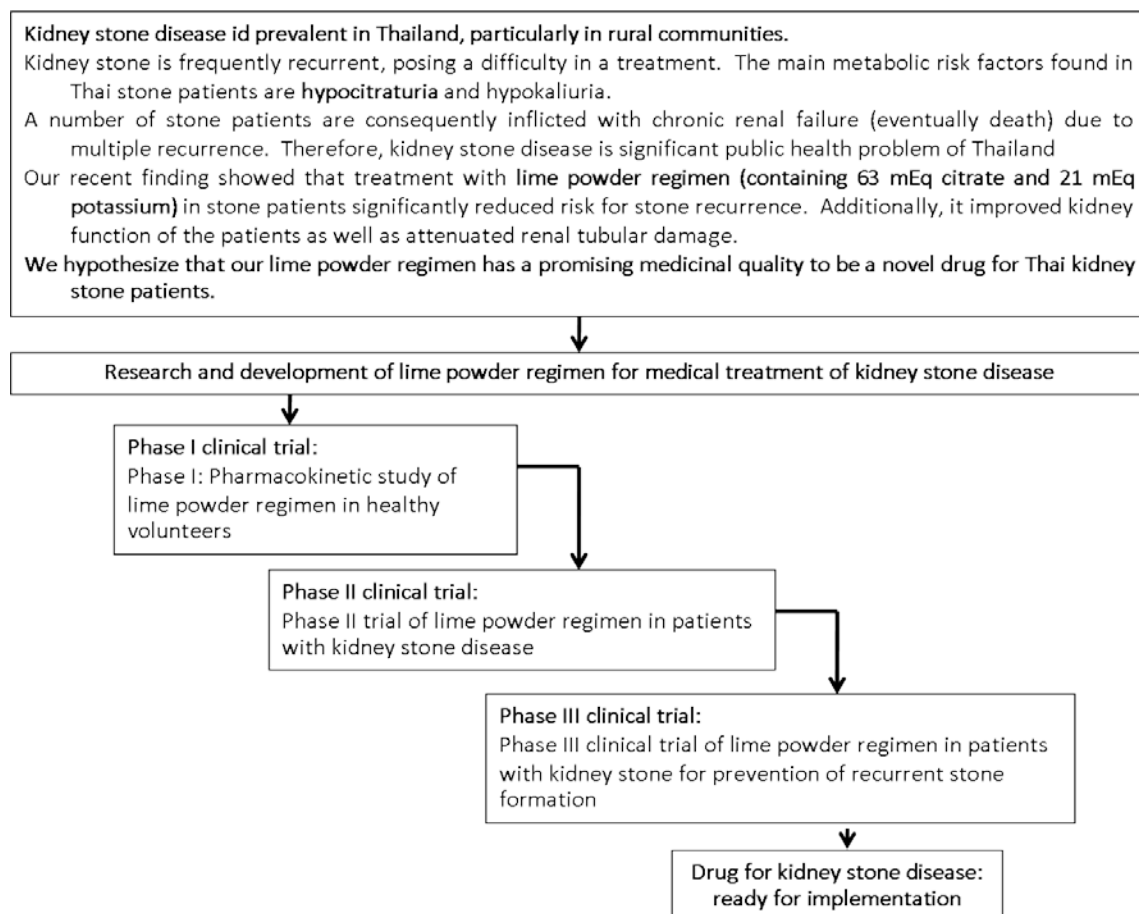
1. วิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบของ LPR
2. ศึกษา acute animal toxicity ของ LPR ในหนูทดลองก่อนที่จะนำไปใช้ทดสอบในอาสาสมัคร
3. ศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 เกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ของ LPR ในอาสาสมัครคนปกติสุขภาพดี
 - ผลของ LPR ต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH และระดับของสารต่างๆในปัสสาวะและเลือดที่เป็นตัวบ่งชี้ของ oxidative stress, renal tubular damage และประสิทธิภาพการทำงานของไต
 - ประเมินผลข้างเคียงของ LPR ในอาสาสมัครคนปกติสุขภาพดี
4. เพื่อศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และยาหลอก เป็นเวลา 6 เดือน โดยออกแบบการทดลองเป็น randomized, placebo-controlled trial
 - ประเมินผลข้างเคียงและความปลอดภัยของ LPR เพิ่มเติมจากการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1
 - ประเมินประสิทธิภาพของ LPR เปรียบเทียบกับกลุ่มยาหลอก ในการลดความเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมของการเกิดนิ่ว และแนวโน้มการเกิดนิ่วซ้ำ

โครงการวิจัยที่ 1 เป็นการรวม preclinical study และ phase I clinical trial เข้าด้วยกัน ข้อมูลเกี่ยวกับ acute animal toxicity และ pharmacokinetics ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นเครื่องช่วยยืนยันถึงความปลอดภัยของ lime powder regimen โดยรูปแบบ pharmacokinetics study ที่ใช้ในการศึกษานี้ อ้างอิงตามการศึกษาปริมาณ citrate ในปัสสาวะของอาสาสมัครปกติหลังจากที่ได้รับ oral citric acid load จากผลการศึกษาของ Sakhaee และคณะ ในปี 1992 หากผลการวิจัยในระยะที่ 1 นี้พบว่า LPR มีผลข้างเคียงสูง คณะผู้วิจัยจะพิจารณาการดำเนินการวิจัยในระยะที่ 2 และ 3 เนื่องจากต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมวิจัยเป็นสำคัญ แต่จากผลการวิจัยที่เสร็จสิ้นแล้ว พบว่า LPR มีความปลอดภัยสูงมาก คณะผู้วิจัยจึงดำเนินการวิจัยต่อเนื่องในระยะที่ 2

โครงการวิจัยที่ 2 ทำการศึกษาในประชากรผู้ป่วยโรคนิ่วไตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เนื่องจากโรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีความชุกสูงมากในประเทศไทย โดยเฉพาะในชนบท และยังเป็นโรคที่มีโอกาสกลับเป็นซ้ำสูงภายหลังการเอานิ่วออกด้วยวิธีทางศัลยกรรม เมื่อเกิดนิ่วซ้ำหลายครั้งทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง และบั่นทอนคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ดังนั้นการรักษานิ่วที่มีประสิทธิภาพจึงควรใช้ยาที่สามารถป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำได้ ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมที่พบมากในผู้ป่วยโรคนิ่วไตของไทยคือ ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ ดังนั้นการให้ซีเทรตและโพแทสเซียมทดแทนจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาการรักษาโรคนิ่วไตของไทย ผลงานวิจัยเบื้องต้นของคณะวิจัยพบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับ LPR เป็นระยะเวลา 3 เดือน สามารถเพิ่มปริมาณซีเทรตหรือสารต้านการก่อนิ่วในปัสสาวะ ได้เทียบเท่ากับยาโพแทสเซียมซีเทรต อีกทั้งยังมีประโยชน์เหนือกว่าในด้านการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระและลดความเครียดจากออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ท่อไตได้ คุณสมบัติทางยาของ LPR เหล่านี้ ทำให้คณะวิจัยเชื่อมั่นว่า LPR สามารถเป็นยามาตรฐานในการรักษาโรคนิ่วไตได้ โดยได้รับการค้นคว้าและวิจัยอย่างถูกต้องตามวิทยาศาสตร์และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล โดยผ่านกระบวนการศึกษาที่เป็น เริ่มจากการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 ไปจนถึงระยะที่ 3 นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยอีกด้วย มีกรอบแนวคิดการวิจัยดังแสดงในภาพที่ 2 สำหรับงานวิจัยในช่วงแรกนี้มุ่งเน้นที่การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 และ 2



ภาพที่ 2 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคนิ่วไต

โรคนิ่วไต (kidney stone disease, nephrolithiasis) เป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญของระบบทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยได้ทั่วโลก โดยประมาณร้อยละ 5-10 ในประเทศตะวันตก ร้อยละ 20 ในแถบประเทศเขตร้อน (Tropical and subtropical regions) โดยเฉพาะประเทศซาอุดีอาระเบีย (Goldfarb, 2009; Sakhaee, 2012) และยังพบว่าภาวะโลกร้อนส่งผลให้ความชุกของโรคนิ่วสูงขึ้นด้วย (Brikowski et.al, 2008) สำหรับประเทศไทยมีอุบัติการณ์การเป็นโรคนิ่วไตสูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ร้อยละ 16.9 (Yanagawa et.al, 1997) โรคนิ่วไตจึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ทั้งในกลุ่มประชากรวัยแรงงานและผู้สูงอายุ ทั้งยังเป็นโรคที่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงภายหลังการรักษาทั้งด้วยวิธีสลายนิ่ว (lithotripsy) หรือการผ่าตัด (surgery) มีการศึกษาอัตราการกลับเป็นซ้ำหลังสลายนิ่วที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีผู้ป่วยส่วนใหญ่มาจากภาคกลาง และมาจากภาคอื่นๆ ของประเทศไทยพบสูงถึงร้อยละ 25 ภายหลังการสลายนิ่วแล้ว 3 ปี และพบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 39 ภายหลังการผ่าตัดเอานิ่วออกไปแล้ว 2 ปี ในโรงพยาบาลขอนแก่น (สมบัติ และคณะ, 2553)

สาเหตุสำคัญของอัตราการกลับเป็นซ้ำ เนื่องจากผู้ป่วยมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อไต เช่น การทำลายของเซลล์ไตจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และการเกิดพังผืดในไต (Boonla et.al, 2011) ขาดการประเมินความผิดปกติทางเมแทบอลิก และการวิเคราะห์สารเคมีที่เป็นสารประกอบของก้อนนิ่วที่เป็นครั้งแรก (first episode) ทำให้ไม่ได้รับการรักษาตามปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่ว รวมทั้งขาดการสร้างเสริมสุขภาพที่เหมาะสมหลังการสลายนิ่วหรือผ่าตัดเอานิ่วออก การเป็นนิ่วซ้ำหลายครั้งส่งผลต่อการทำลายไต ทำให้ไตเสื่อมและนำไปสู่การเป็นโรคไตวายเรื้อรังในที่สุด ซึ่งโรคนิ่วไตจัดเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงของโรคไตระยะสุดท้าย (End-stage renal disease) (Alexander et.al, 2012; El-Zoghby et.al, 2012) ดังนั้นการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำจะสามารถลดอุบัติการณ์ของโรคไตวายเรื้อรังที่ต้องล้างไตได้ และเป็นการช่วยลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคไตระยะสุดท้าย

ชนิดของนิ่ว

นิ่วไตมีหลายชนิด จำแนกตามสารเคมีหรือแร่ธาตุที่ประกอบเป็นผลึกในก้อนนิ่วสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (calcium stones) ซึ่งเป็นนิ่วที่พบบ่อยที่สุด (Rivers et.al, 2000; Robinson et.al, 2008) ประมาณร้อยละ 80 ซึ่งอาจเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium

oxalate, CaOx) หรือ น้ำแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate, CaP) รวมทั้งน้ำเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟต หรือแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก และอีกประเภทหนึ่งคือน้ำที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (non-calcium stones) พบได้ประมาณร้อยละ 15-20 ได้แก่ น้ำกรดยูริก (uric acid stone) น้ำจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือน้ำสตรูไวท์ (infection stone หรือ struvite) และน้ำซิสทีน (cystine stone) เป็นต้น โดยน้ำกรดยูริกและแคลเซียมฟอสเฟตมีโอกาสกลับเป็นซ้ำสูงกว่าชนิดอื่น

องค์ประกอบทางเคมีของก้อนน้ำ ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำเนื้อผสม (mixed stone) คือมีองค์ประกอบของเกลือมากกว่าสองชนิดขึ้นไป ส่วนน้ำที่มีองค์ประกอบทางเคมีเพียงชนิดเดียวจัดเป็นน้ำเนื้อบริสุทธิ์ (pure stone) พบว่าชนิดและองค์ประกอบของก้อนน้ำในประเทศต่างๆ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไปมาก มีรายงานองค์ประกอบของก้อนน้ำจากตอนเหนือของอินเดีย พบน้ำเนื้อบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 93.4 ซึ่งเป็นน้ำแคลเซียมออกซาเลต ที่เหลือจัดเป็นน้ำผสมและมีน้ำกรดยูริกเพียงร้อยละ 0.95 ขณะที่รายงานจากตอนใต้ของญี่ปุ่นพบน้ำเนื้อบริสุทธิ์เพียงร้อยละ 58.4 ซึ่งเป็นน้ำแคลเซียมออกซาเลตร้อยละ 40 และมีน้ำกรดยูริกร้อยละ 9.65 ที่เหลือจัดเป็นน้ำเนื้อผสมร้อยละ 41.6

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของก้อนน้ำจากผู้ป่วยนิ่วทุกภาคของประเทศไทยจำนวน 258 ราย

Stone composition	All regions		Geographic regions							
			NE		N		C		S	
	Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%
n	256		103		81		47		25	
Pure stones	103	40.23	37	35.92	29	35.80	24	51.06	13	52.00
CaOx	54	21.09	19	18.45	18	22.22	13	27.66	4	16.00
UA	36	14.06	12	11.65	11	13.58	8	17.02	5	20.00
CaP	5	1.95	2	1.94	0	0	1	2.13	2	8.00
MAP	8	3.13	4	3.88	0	0	2	4.26	2	8.00
Mixed stones	153	59.77	66	64.08	52	64.20	23	48.94	12	48.00
CaOx+CaP	122	47.66	52	50.49	46	56.79	15	31.91	9	36.00
CaOx+UA	12	4.69	6	5.83	3	3.70	2	4.26	1	4.00
CaOx+others	8	3.13	4	3.88	2	2.47	1	2.13	1	4.00
Others	11	4.30	4	3.88	1	1.23	5	10.64	1	4.00
Stone types regarding to the major crystalline component										
CaOx	189	73.83	77	74.76	68	83.95	29	61.70	15	60.00
CaP	14	5.47	7	6.80	1	1.23	3	6.38	3	12.00
UA	41	16.02	13	12.62	12	14.81	11	23.40	5	20.00
MAP	12	4.69	6	5.83	0	0	4	8.51	2	8.00

CaOx: calcium oxalate, UA: uric acid, CaP: calcium phosphate, MAP: magnesium ammonium phosphate (infection stone), other mix stone type (xanthine, ammonium urate and calcium carbonate), NE: northeastern, N: northern, C: central, S: southern.

สำหรับการศึกษาองค์ประกอบของก้อนนิ่วของผู้ป่วยนิ่วจากทุกภาคของประเทศไทย (Tosukhowong et.al, 2007) โดยคณะผู้วิจัยพบนิ่วเนื้อบริสุทธิ์เพียงร้อยละ 40 ซึ่งเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลตร้อยละ 21 และมีนิ่วกรดยูริกร้อยละ 14.1 เหลือจัดเป็นนิ่วเนื้อผสมร้อยละ 60 และองค์ประกอบหลักในนิ่วเนื้อผสมเป็นแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 48 รวมพบนิ่วชนิดแคลเซียมเป็นร้อยละ 79 และนิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบร้อยละ 21 ซึ่งพบมีนิ่วกรดยูริกสูงถึงร้อยละ 16 (ตารางที่ 1)

ปัจจัยสาเหตุของการเกิดนิ่ว

โดยเหตุที่พยาธิกำเนิดของก้อนนิ่วในประชากรกลุ่มต่างๆ ทั่วโลกหรือในผู้ป่วยแต่ละคนแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเสี่ยง (Straub et.al,2005; Sakhaee et.al,2009) ทั้งปัจจัยภายใน (intrinsic risk factors) เช่น พันธุกรรม อายุ และเพศ และปัจจัยภายนอก (extrinsic risk factors) เช่น อาหาร ภูมิอากาศ และจากปัจจัยทางเมแทบอลิก (metabolic risk factors) โดยปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้จะมีผลต่ออุบัติการณ์การเกิดโรคนิ่วซ้ำ และความชุกของโรคนิ่วในทางเดินปัสสาวะ

ในปัสสาวะมีสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่ว (Urinary stone modulators) 2 กลุ่ม (Klugman et.al,1995; Khan et.al,2004) คือ สารก่อนิ่ว (Stone promoters) ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต กรดยูริก โปรตอน ฟอสเฟต และ สารยับยั้งการเกิดนิ่ว (Stone inhibitors) ได้แก่ กลุ่มสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่มีขนาดเล็ก ได้แก่ ซิเตรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม ไพรอเฟสเฟต และกลุ่มสารยับยั้งการรวมกลุ่มของผลึกที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ส่วนใหญ่เป็นไกลโคโปรตีน หรือโพลิโอไกลแคน สารชีวโมเลกุลเหล่านี้อาจไปเกาะที่ผิวผลึกมีผลทำให้ผลึกผลึกกันเอง ไม่สามารถรวมกันเป็นผลึกขนาดใหญ่ ได้แก่ crystal adhesion inhibitor (CAD), nephrocalcin (NC), Tamm-Horsfall protein (THP), urinary prothrombin fragment-1, uropontin (UP) และ glycosaminoglycans (GAG) เป็นต้น

ความผิดปกติทางเมแทบอลิก (Metabolic abnormality) (Youngjermchan et.al,2006; Saepoo et.al,2009) คือ ความไม่สมดุลของปริมาณสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่ว ได้แก่ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (Hyperoxaluria) ภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะสูง (Hypercalciuria) ภาวะกรดยูริกสูงในปัสสาวะสูง (Hyperuricosuria) ภาวะฟอสเฟตสูงในปัสสาวะสูง (Hyperphosphaturia) ภาวะซิเตรตต่ำในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia) ภาวะแมกนีเซียมต่ำในปัสสาวะต่ำ (Hypomagnesiuria) ภาวะโพแทสเซียมต่ำในปัสสาวะต่ำ (Hypokaliuria) ภาวะสมดุลของกรดต่าง และภาวะผิดปกติของสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่เป็นมหโมเลกุล (Abnormalities of inhibitory macromolecule structure) ปัจจัยทางเมแทบอลิก เหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากในการก่อนิ่ว ซึ่งอาจพบได้ทั้งแบบผิดปกติภาวะเดียวและผิดปกติหลายภาวะ (Yagisawa et.al, 1998)

จากรายงานวิจัย ความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วระหว่างประเทศที่พัฒนาแล้วกับประเทศที่กำลังพัฒนามีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาจำนวนมากพบว่าภาวะที่มีสารยับยั้งนิ่วต่ำ โดยเฉพาะภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเป็นความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบอยู่เสมอในผู้ป่วยโรคนี้ทั่วโลกในโรคนี้ (มากกว่าร้อยละ 50) และพบสูงถึงร้อยละ 90 ในผู้ป่วยโรคนี้ทั่วโลกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือไทย (Tosukhowong et.al,2005) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีหลักฐานยืนยันว่าภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดเป็นนิ่วซ้ำ เนื่องจากเป็นสารยับยั้งการก่อตัวของนิ่วที่สำคัญที่สุดในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้จึงมีการแนะนำให้ผู้ป่วยได้รับซีเทรตเสริม (Citrate supplementation) ภายหลังการรักษา เช่น การให้ยาโพแทสเซียมซีเทรต หรือน้ำผลไม้ที่มีปริมาณซีเทรตสูง เพื่อช่วยลดโอกาสเกิดเป็นนิ่วซ้ำได้ กรณีที่มีการเกิดผลึกและมีการเติบโตขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่ว (calculi /stone) อุดตันบริเวณต่างๆ ของทางเดินปัสสาวะ เช่น ที่เนื้อไต ท่อไต หรือกระเพาะปัสสาวะ เมื่อมีการเสียดสีของก้อนนิ่วทำให้เกิดอาการปวดบริเวณเอว ด้านหลัง หรือปวดร้าวลงขาหนีบ ปัสสาวะอาจมีสีแดงของเลือดปน ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง คือมีการอุดตันทางเดินปัสสาวะโดยสิ้นเชิง จะทำให้ไม่มีน้ำปัสสาวะออกเลย หรือทำให้ไตเสื่อมสภาพ ทำให้ต้องผ่าตัดไตออก

การรักษาโรคนี้

การรักษาโรคนี้มีหลากหลายวิธี (Massey et.al,2005; Butterweck et.al,2009) ทั้งทางด้านการผ่าตัดและทางด้านการรักษาทางยา รวมถึงการควบคุมการรับประทานอาหารและปรับปรุงพฤติกรรมกรบริโภค ซึ่งการรักษาโรคนี้ต้องอาศัยระยะเวลาและความต่อเนื่อง ในการติดตามรักษา ป้องกัน การเกิดนิ่วซ้ำ และสร้างเสริมให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและสมบูรณ์ในที่สุด ซึ่งการกระทำดังกล่าวต้องมีการติดตามผู้ป่วยประเมินปริมาณสารชีวเคมีต่างๆ ในปัสสาวะให้เข้าสู่ระดับปกติ ซึ่งอาจจะเป็นการประเมินทุก 3 เดือน จนกระทั่งความผิดปกติทาง เมแทบอลิซึมนั้นถูกแก้ไขและต้องการเวลากว่า 5 ปี ในการติดตามผู้ป่วยต่อไป ในการศึกษาผลสำเร็จของการรักษาและการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ สามารถประเมินได้โดยใช้ดัชนี 2 ชนิด คือ การนับจำนวนเม็दनิ่วที่เกิดใหม่หรือการตรวจสอบการเกิดนิ่วซ้ำ (stone recurrence) หรือนิ่วขนาดใหญ่ขึ้น (stone growth) อีกดัชนีหนึ่ง คือการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชีวเคมีของปัสสาวะ และปริมาณสารก่อนิ่ว รวมถึงสารยับยั้งการเกิดนิ่วชนิดต่างๆ ภายหลังการรักษา ซึ่งมีเป้าหมายดังแสดงในตารางที่ 2

การรักษาโรคนี้ด้วยวิธีทางสัลยกรรม

การรักษาโรคนี้ด้วยการผ่าตัด ที่นิยมใช้รักษาในปัจจุบันมีดังนี้ (Wignall et.al,2008; Zanetti et.al,2008)

1. Extracorporeal shockwave lithotripsy (SWL) คือการใช้คลื่นกระแทกพลังงานสูงจากเครื่องกำเนิดภายนอกผ่านชั้นผิวหนัง ไขมัน กล้ามเนื้อ เมื่อคลื่นนี้กระทบกับนิ่วจะทำให้แตกได้

ตารางที่ 2 เป้าหมายของการเปลี่ยนแปลงของชีวเคมีของปัสสาวะในการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่ว

ชีวเคมีของปัสสาวะ เป้าหมาย

ปริมาตร	มากกว่า 2 ลิตรต่อวัน
แคลเซียม	น้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน
กรดยูริก	น้อยกว่า 700 มิลลิกรัมต่อวัน
ฟอสฟอรัส	น้อยกว่า 900 มิลลิกรัมต่อวัน
แมกนีเซียม	มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อวัน
ซีเทรต	มากกว่า 320 มิลลิกรัมต่อวัน
โซเดียม	น้อยกว่า 150 มิลลิอิกวาเลนซ์ต่อวัน
pH	ปกติอยู่ในช่วง 5.5 – 7.0

2. Percutaneous nephrolithotripsy (PCNL) คือการใช้กล้อง nephroscope ส่องเข้าสู่ไตผ่านทาง nephrostomy tract ที่แทงผ่านผิวหนังบริเวณเอวเข้าสู่ไตโดยตรง แล้วนำนิ่วออกโดยใช้ forceps คีบนิ่วหรือใช้เครื่องกรอนิ่ว (ultrasonic lithotripsy) หรือเครื่องเจาะนิ่ว (ballistic lithotripsy)
3. Ureterorenoscopic stone removal (URS) คือการใช้กล้อง ureteroscope ขนาดเล็กส่องผ่านทางกระเพาะปัสสาวะเข้าสู่ท่อไต และใช้เครื่องมือค้อนิ่ว (basket, forceps) หรือกรอให้นิ่วแตกโดยใช้ laser หรือ ballistic lithotripsy
4. Open stone surgery (OSS) เป็นการเปิดผ่าตัดซึ่งมีหลายวิธีโดยขึ้นกับตำแหน่งและขนาดของนิ่วเช่น anatomic nephrolithotomy (ANL), pyelolithotomy, ureterolithotomy,
5. Laparoscopic ureterolithotomy เป็นการส่องกล้องส่องเข้าไปผ่าเอานิ่วในท่อไตออก โดยการเจาะแผลทางท้องเล็ก ๆ ประมาณ 3 แผล

การรักษาโรคนิ่วด้วยยา

การรักษาทางยาเป็นอีกหนึ่งวิธีที่อาจช่วยป้องกันการเติบโตของก้อนนิ่วและการเกิดโรคนิ่วซ้ำได้ (Wasserstein et.al,1998; Tosukhowong et.al,2008) จากการสำรวจของ นพ.ทศพล ศศิวงศ์ภักดีและคณะได้พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาทางสัลยกรรม (SWL) แต่ไม่ได้มีการรักษาทางยาเสริมไปด้วยนั้น จะพบอุบัติการณ์การเกิดนิ่วซ้ำได้มากถึง ร้อยละ 13 และ 25 ภายหลังได้รับการรักษาทางสัลยกรรมเป็นเวลา 2 และ 3 ปีตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอุบัติการณ์การเกิดนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไตหลังการผ่าตัดของ นพ. สมบัติ บวรผดุงกิตติ ณ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่พบว่าเกิดนิ่วซ้ำได้มากถึงร้อยละ 39 (สมบัติ และคณะ, 2535) เนื่องจากการรักษาทางสัลยกรรมนั้นไม่ได้ครอบคลุมไปถึงการรักษาภาวะผิดปกติทางเมแทบอลิซึม

เป็นเพียง Symptomatic treatment ดังนั้นการรักษาทางยาจึงเป็นสิ่งที่ควรแนะนำแก่ผู้ป่วยภายหลังการรักษาทางศัลยกรรม ซึ่งการรักษาทางยามีวัตถุประสงค์ที่สำคัญ คือ เพื่อแก้ไขภาวะผิดปกติทางเมแทบอลิซึมในผู้ป่วย เพื่อเพิ่มสารยับยั้งการก่อเนื้องอก เพื่อลดสารก่อเนื้องอก เพื่อลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการบาดเจ็บของเซลล์และความผิดปกติของการทำงานของไต ยาที่ใช้รักษาโรคนีวมักจะพบทั้งที่อยู่ในรูปสารสังเคราะห์ เช่น allopurinol, thiazide, orthophosphate, triptonin, acetohydroxamic acid, เกลือโพแทสเซียมฟอสเฟต และ เกลือของซิเตรต รวมถึงสารในธรรมชาติ เช่น กรดไฟติก สารต้านอนุมูลอิสระ น้ำมันปลา หนุ้าหนวดแมวหรือหนุ้าเทวดา ผลไม้ และมะนาวผง เป็นต้น ดังนั้นแพทย์ควรพิจารณาการรักษาผู้ป่วยโรคนีว ด้วยยาในกรณีอย่างใดอย่างหนึ่ง ได้แก่ ผู้ป่วยมีความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่ทราบแน่นอน ผู้ป่วยมีความผิดปกติของการทำงานของไต หรือมีโรคที่กำลังเป็นอยู่หรือและผู้ป่วยมีเนื้องอก

การรักษานีวด้วยเกลือของซิเตรต

เกลือซิเตรตมักใช้ในรูปของสารโพแทสเซียมซิเตรต โพแทสเซียมแมกนีเซียมซิเตรต โซเดียมแมกนีเซียมซิเตรต (Pearle et.al,2002; Sarica et.al,2006) เนื่องจากสารซิเตรตเป็นสารยับยั้งการเกิดเนื้องอกที่มีประสิทธิภาพ ทำให้โอกาสเกิดผลึกนิ่วลดลง นอกจากนี้ในกรณีของผู้ป่วยที่มีภาวะกรดยูริกสูงในปัสสาวะ ซิเตรตจะช่วยลดการเกิดผลึกกรดยูริกด้วยการเพิ่ม pH ให้เป็นด่าง ทำให้กรดยูริกไม่จับตัวเป็นผลึกในปัสสาวะ ด้วยสาเหตุนี้จึงมักพบว่าโพแทสเซียมซิเตรตจะถูกใช้ในการรักษาโดยไม่จำกัดว่าผู้ป่วยมีความผิดปกติทางเมแทบอลิกชนิดใด มีการศึกษาผลของโพแทสเซียมซิเตรตต่อการแก้ไขภาวะผิดปกติทางเมแทบอลิซึม โดย Pak และคณะ พบว่าเมื่อมีการเสริมโพแทสเซียมซิเตรตในผู้ป่วยโรคนีวไต ด้วยอัตราส่วนของโพแทสเซียมที่ 42 มิลลิอิควิวาเลนต์ และซิเตรตที่ 63 มิลลิอิควิวาเลนต์ตามลำดับ (Pak, 1999) สามารถทำให้ปัสสาวะมีความเป็นด่างมากขึ้นพร้อมกับแก้ไขภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้รายงานการศึกษาในเซลล์หนูท่อไตของ Khan และคณะยังพบว่านอกจากความสามารถในการยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลตของโพแทสเซียมซิเตรตแล้ว ยังสามารถปกป้องเซลล์หนูท่อไตจากการบาดเจ็บผ่านการลดอนุมูลอิสระ และยับยั้งกระบวนการเปอร็อกซิเดชันของไขมันที่ผิวเซลล์ได้ด้วย ซึ่งรายงานการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยในผู้ป่วยโรคนีวไตของคณะผู้วิจัย ที่พบว่าเมื่อเสริมโพแทสเซียมซิเตรตในผู้ป่วยโรคนีวไตให้ระดับซิเตรตและระดับของสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงมีการลดลงของ Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเปอร็อกซิเดชันของไขมันและ โปรตีนไฮดรอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการออกซิเดชันของโปรตีน

ยังมีเกลือซิเตรตอีกหลายชนิด ได้แก่ โพแทสเซียมแมกนีเซียมซิเตรต ซึ่งได้มีการศึกษาล่าสุด โดย Zerwekh และคณะ พบว่าโพแทสเซียมแมกนีเซียมซิเตรตมีฤทธิ์ในการเพิ่มค่า pH อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ลดระดับแอมโมเนียม Titratable acid อัตราส่วนสัมพัทธ์ของความอึดแอ็กเซียลแคลเซียมออกซาเลต และระดับกรดยูริกอิสระอย่างมีนัยสำคัญ (Zerwekh et.al, 2007) นอกจากนี้จากการศึกษาของ ปิยะรัตน์ โดสุโขวงศ์ และคณะยังพบว่า การเสริมสารโพแทสเซียมแมกนีเซียมซิเตรตในผู้ป่วยโรคนีวไตที่มีภาวะซิเตรตต่ำในปัสสาวะ เป็นเวลา 1 เดือน สามารถลดระดับเอนไซม์ ATP citrate lyase (ACL) ในไซโทซอล และเอนไซม์

aconitase ในไมโทคอนเดรีย (m-aconitase) ในเม็ดเลือดขาวได้อย่างมีนัยสำคัญ การลดลงของเอนไซม์ดังกล่าวถ้าเกิดขึ้นที่เซลล์ท่อไต จะทำให้ซิเทรตในเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้ลดการดูดกลับซิเทรตเข้าเซลล์ ทำให้ปัสสาวะมีซิเทรตเพิ่มขึ้น และสามารถเพิ่มระดับ pH ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเสริมโพแทสเซียมแมกนีเซียม ซิเทรตยังเพิ่มระดับ โพแทสเซียม แมกนีเซียม และซิเทรตอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถกล่าวได้ว่าโพแทสเซียมแมกนีเซียมซิเทรตไม่เพียงแต่การแก้ไขปัญหาคิเทรตในปัสสาวะแต่ยังครอบคลุมไปถึงการเพิ่มสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่สำคัญทั้งโพแทสเซียม แมกนีเซียมและซิเทรต ยาอีกตัวหนึ่งซึ่งเป็นเกลือของโพแทสเซียมที่นิยมใช้เช่นกัน คือ เกลือโพแทสเซียมฟอสเฟต ที่มีค่า pH 7.4 หรือเป็นกลาง ซึ่งใช้แก้ไขปัญหามาจากการใช้ยา Thiazide ที่มีผลข้างเคียงในการรักษาโรคนี้ไตที่เกิดจากภาวะ renal hypercalciuria เนื่องจากยา ซึ่งมีค่า pH เป็นกลางเมื่อรับประทานทำให้เพิ่มความเป็นด่าง หรือเพิ่ม pH ของปัสสาวะและเพิ่มซิเทรตในปัสสาวะ นอกจากนี้ยังเพิ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารต้านการเกิดนิ่วในปัสสาวะเช่นกัน และยังพบว่ามีความสัมพันธ์ควบคุมการเติบโตของก้อนนิ่ว ลดการดึงแคลเซียมจากกระดูก (bone resorption) และลดภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะ

การรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (Lime powder regimen, LPR)

มีรายงานเป็นจำนวนมากที่พบว่า การบริโภคผลไม้และสารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทต่อการรักษาโรคต่างๆ ทั้งโรคเมเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคนี้ไต (Kang et.al,2007; Koff et.al,2007) ซึ่งมีรายงานว่า การให้ผู้ป่วยดื่มน้ำมะนาว 8 แก้ว (Seltzer et.al, 1996) หรือการดื่มน้ำส้มคั้น 1 ลิตร (Odvina et.al,2006; Wabner et.al,1993) ต่อวัน สามารถเพิ่มสารยับยั้งการก่อนิ่วในปัสสาวะได้อย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากในผลไม้ นั้นมีทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ อันได้แก่ เบตาแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ กรดไฟติก เป็นต้น ช่วยในการปกป้องการทำลายของเซลล์ท่อไตจากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชัน ของไขมันเป็น MDA ผลไม้ยังมีปริมาณซิเทรต ซึ่งเป็นสารยับยั้งการก่อนิ่วที่สูงมาก และยังมีโพแทสเซียม แมกนีเซียมอีกด้วย จากการศึกษาของคณะวิจัยพบว่า ผู้ป่วยที่นี้ไตที่ผ่านการรักษาทางศัลยกรรมเมื่อรับประทาน LPR ที่มีองค์ประกอบโพแทสเซียม 21 มิลลิอิกวาเลนท์ ต่อซิเทรต 63 มิลลิอิกวาเลนท์ เป็นระยะเวลา 3 เดือน(Tosukhowong et.al, 2008) สามารถเพิ่มปริมาณซิเทรตหรือสารต้านการก่อนิ่วในปัสสาวะและเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ ลดความเสี่ยงการเกิดนิ่ว รวมถึงลดความเครียดจากออกซิเดชัน ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังสามารถปกป้องการทำลายเซลล์ท่อไตได้ เมื่อเปรียบเทียบการรับประทานโพแทสเซียมซิเทรตกับมะนาวผงพบว่า การรับประทานมะนาวผงสามารถใช้แทนโพแทสเซียมซิเทรตในการเพิ่มซิเทรตได้จริง และยังพบว่าการเสริมมะนาวผงทำให้ประสิทธิภาพของปัสสาวะในการต้านทานออกซาเลตในหลอดทดลองเพิ่มขึ้น ในขณะที่ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในผู้ป่วยโรคนี้ไตที่รับประทานผลไม้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงในการเกิดนิ่วไต และความเสี่ยงสัมพันธ์กับการลดลงของซิเทรตอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า ผลไม้เป็นแหล่งซิเทรตธรรมชาติที่มีความสำคัญต่อการ

ป้องกันการเกิดนี้ได้อย่างแท้จริง สำหรับกระบวนการผลิต LPR ของคณะผู้วิจัยอยู่ระหว่างการดำเนินการจดสิทธิบัตร คณะผู้วิจัยเชื่อว่า LPR มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคนี้ให้ได้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

โครงการระยะที่ 1

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญในสูตรมะนาวผง

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

การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ และสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง และสารตัวอย่างปัสสาวะ

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

RF Power	: 1400 W
Plasma / Aux. / Neb. Flow	: 15 / 0.5 / 0.40 L/min
Plasma Viewing	: Axial view
Sample flow rate	: 1.5 ml/min.
Read Time	: Min 5 sec, Max 5 sec
Read Delay	: 10 sec.

Flush Time	: 0 sec.
Analyze	: - Antimony at wavelength 193.696 nm - Arsenic (As) at wavelength 206.836 nm - Calcium (Ca) at wavelength 317.933 nm - Cadmium (Cd) at wavelength 228.802 nm - Chromium (Cr) at wavelength 267.716 nm - Cobalt (Co) at wavelength 228.616 nm - Copper (Cu) at wavelength 327.393 nm - Iron (Fe) at wavelength 238.204 nm - Lead (Pb) at wavelength 220.353 nm - Magnesium (Mg) at wavelength 285.213 nm - Manganese (Mn) at wavelength 257.610 nm - Nickel (Ni) at wavelength 231.604 nm - Selenium (Se) at wavelength 196.026 nm - Vanadium (V) at wavelength 292.464 nm - Zinc (Zn) at wavelength 206.200 nm

การวิเคราะห์ Oxalate depletion ในหลอดทดลอง

หลักการของ Oxalate depletion ซึ่งอ้างอิงวิธีการทดลองจากงานวิจัยของ Chutipongtanate และคณะ [63] เพื่อดูประสิทธิภาพของ LPR ในการลดอัตราการโตของผลึก (crystal growth) โดยดูจากปริมาณของ ออกซาเลตอิสระ (free oxalate) ที่เหลืออยู่ในหลอดทดลอง จากคุณสมบัติของซิเทรตใน LPR ที่สามารถจับกับแคลเซียมได้ ทำให้ออกซาเลตไม่สามารถจับกับแคลเซียมได้ ดังนั้นถ้าหากปริมาณของ free oxalate ที่เหลืออยู่มาก บ่งชี้ถึงการจับกันระหว่างซิเทรตกับแคลเซียมได้มาก ทำให้มีการโตของผลึกนี้ว (calcium oxalate monohydrate, COM) ช้าลง โดยการวัด free oxalate จะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 214 nm ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อ คือ ใส่สารละลาย 2 mM calcium chloride (CaCl_2) + 2 mM sodium oxalate (NaOx) อย่างละ 0.5 ml ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใส่สารละลาย 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ COM 10 μl ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงใส่น้ำกลั่น (หลอดควบคุม) หรือ ใส่ LPR 0.02, 0.1, 0.2, 1 และ 2 mg/ml (หลอดทดลอง) 100 μl ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 214 nm ทุก 5 นาที ตลอดจนครบ 60 นาที โดยค่าที่ได้นำมาคำนวณเป็น %oxalate reduction เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม

การศึกษา Cytotoxicity

หลักการของการวิเคราะห์ cytotoxicity หรือ cell viability โดยใช้วิธี MTT assay เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยน MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองให้เป็น formazan salt ที่มีสีม่วง โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อ คือ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แต่ละหลุมมีเซลล์เริ่มต้นที่ 10,000 เซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) จากนั้นใส่สารละลายสูตรมะนาวตามความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mg% (dose dependent) และสารละลาย COM ที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงไป 100 μl . และเขย่า 5-10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) สำหรับ time dependent เลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม แล้วเติมสารละลายสูตรมะนาวที่ความเข้มข้นเหมือน dose dependent แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารละลาย DMSO ลงไป 100 μl . จากนั้นเขย่า 5-10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

การคำนวณหา % cell viability คำนวณดังนี้

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

OD_{test} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้ตัวอย่างสูตรมะนาว

OD_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ไม่ได้สูตรมะนาว

การวิเคราะห์การสร้าง ROS ในเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,7-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)

หลักการวัดปริมาณการสร้าง (reactive oxygen species, ROS) โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DCFH-DA คือ ROS ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์จะทำปฏิกิริยากับ DCFH-DA และเปลี่ยนไปเป็น DCF (dichloro-dihydrofluorescein) ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณของ ROS ในเซลล์ ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อ เป็นดังนี้ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์สีดำขนาด 96 หลุม (96-wells black plate) ให้เจริญเติบโตได้ประมาณ 80% confluence แล้วเติมสารละลาย 0.1 mM DCFH-DA ที่ละลายด้วย DMEM serum-free หลุมละ 100 μl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่สารละลายสูตรมะนาวที่ความเข้มข้น เข้มข้น 0, 10, 50, และ 100 mg% และสารละลายผลึก COM ที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ จากนั้นนำไป

วัด fluorescent intensity ที่เวลา 0 นาที และ 60 นาที โดยกำหนด excitation ที่ 485 nm และ emission ที่ 535 nm

การคำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) คำนวณได้ดังนี้

$$AFU = \frac{\text{fluorescent intensity ที่เวลาใดๆ (t}_x\text{)}}{\text{fluorescent intensity ที่เวลาเริ่มต้น (t}_0\text{)}}$$

การศึกษา Acute animal toxicity

ทำการศึกษาในหนูเพื่อหาค่า LD₅₀ ของ LPR โดยว่าจ้างให้ศูนย์วิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นผู้วิเคราะห์ และนำอวัยวะของหนูที่ทดลอง ได้แก่ ตับ ไต และสมอง มาตรวจสอบทางพยาธิวิทยา (histological examination) เพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุการตายว่าเกิดจากความล้มเหลวของอวัยวะใด หรืออวัยวะใดเสี่ยงต่อการเป็นพิษของ lime powder regimen มากที่สุด

การศึกษา Pharmacokinetics (PK)

ดำเนินการศึกษาในอาสาสมัครไทยที่มีสุขภาพปกติ จำนวน 13 คน โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครดังนี้

Inclusion criteria

- อาสาสมัครเพศชายและหญิง อายุระหว่าง 18-45 ปี
- BMI 18-25 kg/m²
- มีสุขภาพดี โดยผ่านการตรวจสอบประวัติการใช้ยา การตรวจร่างกาย และ vital sign
- ผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการคลินิกเป็นปกติ
- ไม่มีประวัติแพ้ยา
- หากเป็นเพศหญิงมีการตรวจยืนยันแล้วว่าไม่ตั้งครรภ์ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย และมีการคุมกำเนิดที่ดีตลอดการเข้าร่วมโครงการวิจัย
- ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจ และลงนามในหนังสือแสดงความยินยอมแล้ว

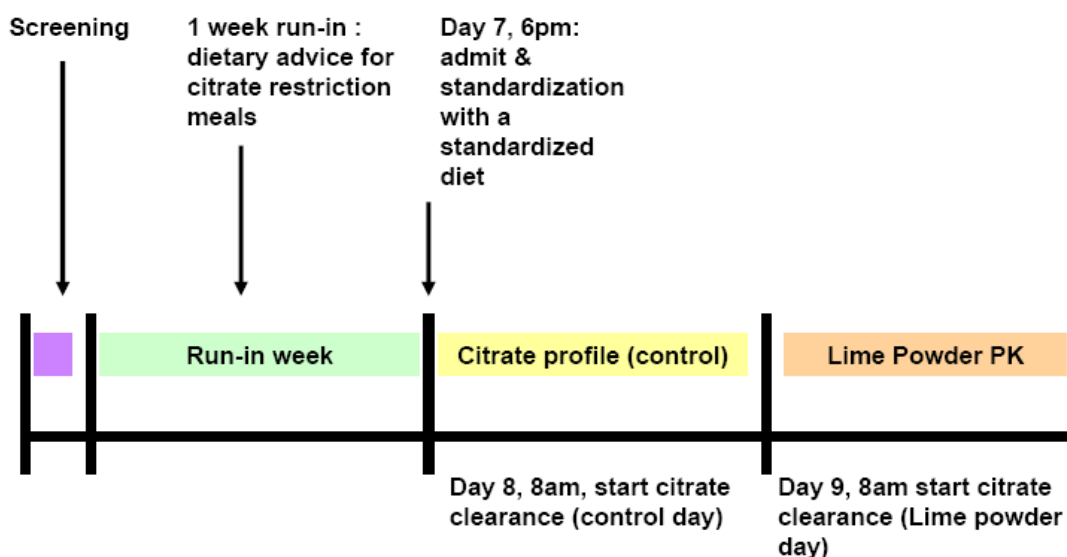
Exclusion criteria

- มีประวัติแพ้ยา
- มีประวัติป่วยเป็นโรคระบบทางเดินอาหาร โรคตับ โรคไต โรคภูมิแพ้ หรือโรคอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อ bioavailability ของ lime powder regimen
- มีประวัติดื่มสุราเป็นประจำ และมีการใช้สารเสพติด

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

ประชากรที่นำมาศึกษาในโครงการจะต้องเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ อาสาสมัครจะได้รับการตรวจร่างกายทั่วไปและการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันความพร้อมของร่างกาย (screening) ทั้งหมดนี้ผู้วิจัยหลักและคณะจะเป็นผู้ติดตามและประเมินผลก่อนอนุญาตให้อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย

การศึกษา Pharmacokinetics เป็นการศึกษาแบบ single dose โดยมีแผนภูมิการดำเนินการวิจัยและการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 สรุป protocol phase 1

Screening period

อาสาสมัครผ่านการตรวจ screening ว่ามีคุณสมบัติเข้าได้กับ inclusion criteria ทั้งหมด และมีผลการตรวจร่างกายและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (Blood - CBC, FBS, BUN, Cr, Electrolyte, Liver function, anti HIV, HBs Ag; Urine – UA, Urine pregnancy test in case of female) เป็นปกติ

Run-in week

อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับคำแนะนำการบริโภคอาหารที่มี citrate และ potassium ต่ำพร้อมบันทึกข้อมูลการบริโภคอาหารประจำวันตลอด 1 สัปดาห์

ในวันที่ 7 ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครเข้ามาพักที่ศูนย์ Chula Clinical Research Center คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เวลา 18.00 น. เพื่อบริโภคอาหารแบบเดียวกันและจำกัดอาหารที่มี citrate และ potassium สูง พร้อมกับงดอาหารหลัง 21.00 น. โดยไม่ต้องงดน้ำ

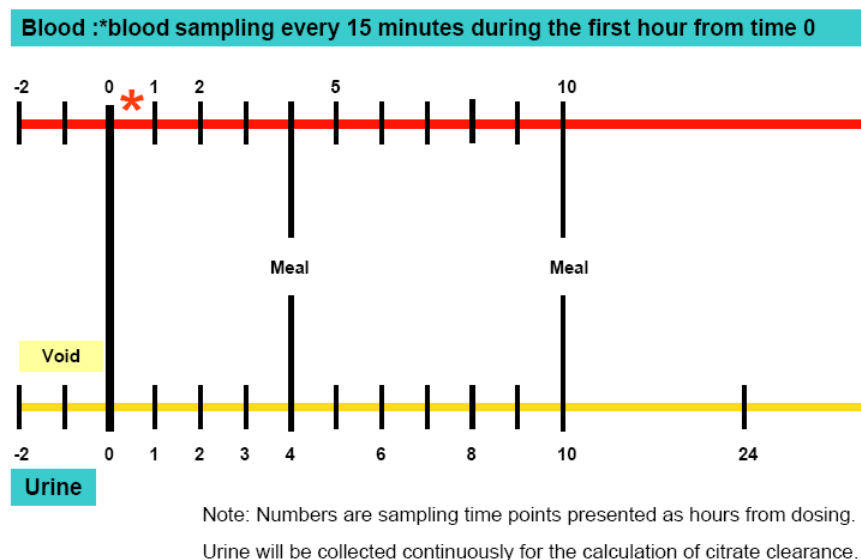
Citrate clearance control day

เช้าวันที่ 8 ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครได้รับการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะที่เวลาต่างๆ ดังภาพที่ 3 โดย baseline (time 0) ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะจะเริ่มที่เวลา 8.00 น. และสิ้นสุดที่ 24 ชั่วโมง (8.00 น. ของเช้าวันที่ 9 ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย)

การเก็บตัวอย่างเลือด: เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะที่หลอดเลือดดำบริเวณแขนครั้งละ 7 ml ที่เวลา baseline สำหรับ citrate clearance day ที่เวลา 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 5, และ 10 ชั่วโมง หลัง time 0 (ภาพที่ 3) เก็บเลือดในหลอดสุญญากาศที่เคลือบด้วย EDTA เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ตัวอย่างเลือดจะนำมาปั่นแยกเอาพลาสมา และพลาสมาที่แยกได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 C จนกระทั่งถึงเวลาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ citrate ในเลือด

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ: ก่อนการเจาะเลือดที่ time 0 อาสาสมัครจะต้องปัสสาวะทิ้งทั้งหมดเพื่อให้กระเพาะปัสสาวะว่าง จากนั้นจึงให้ดื่มน้ำ 500 มิลลิลิตรทันที จากนั้นเก็บปัสสาวะทั้งหมดที่เกิดขึ้น ณ เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, และ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับ lime powder regimen (ภาพที่ 4) ปริมาณปัสสาวะทั้งหมดจะนำไปคำนวณ citrate clearance และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ urine citrate, oxidative stress และ total antioxidative status ตัวอย่างปัสสาวะจะได้รับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 C รอการวิเคราะห์

อาสาสมัครได้รับประทานอาหารที่จัดไว้ให้ภายหลัง dosing แล้วที่ 4 ชั่วโมงและ 10 ชั่วโมง อาหารที่จัดให้จะเป็นอาหารที่ผู้วิจัยกำหนด โดยอาสาสมัครทุกรายจะได้รับอาหารที่เหมือนกัน



ภาพที่ 4 สรุป time points ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะของ day 8 – citrate clearance control day

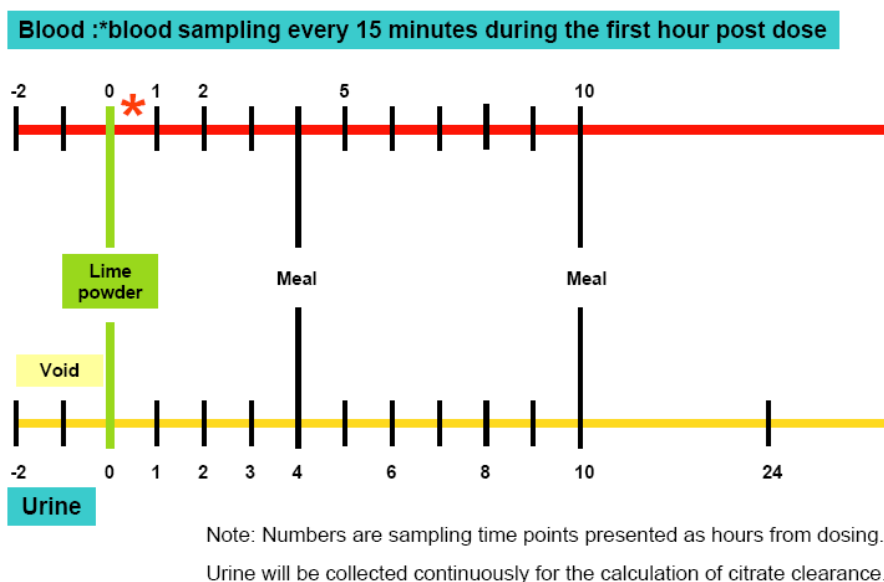
Lime powder regimen PK day

เช้าวันที่ 9 ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย (Lime powder regimen PK day) อาสาสมัครได้รับการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะที่เวลาต่างๆ ดังภาพที่ 5 โดย baseline (time 0) ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะเริ่มที่เวลา 8.00 น. และสิ้นสุดที่ 24 ชั่วโมง (8.00 น. ของเช้าวันที่ 10 ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย)

การเก็บตัวอย่างเลือด: เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะที่หลอดเลือดดำบริเวณแขนครั้งละ 7 ml โดยทำการเจาะเลือดที่เวลา 0 (baseline) ก่อนการให้ lime powder regimen 5 กรัม ในรูปสารละลาย 250 ml และที่เวลา 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 5, และ 10 ชั่วโมง หลัง time 0 เก็บเลือดในหลอดสุญญากาศที่เคลือบด้วย EDTA เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ตัวอย่างเลือดนำมาปั่นแยกเอาพลาสมา และพลาสมาที่แยกได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 C จนกระทั่งถึงเวลาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ citrate ในเลือด

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ: ก่อนหน้าที่อาสาสมัครได้รับ lime powder regimen ต้องปัสสาวะทิ้งทั้งหมดเพื่อทำให้กระเพาะปัสสาวะว่าง และให้รับประทาน lime powder regimen ตามที่แสดงไว้ข้างต้น จากนั้นเก็บปัสสาวะทั้งหมดที่เกิดขึ้น ณ เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, และ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับ lime powder regimen ปริมาณปัสสาวะทั้งหมดนำไปคำนวณ citrate clearance และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ urine citrate, oxidative stress และ total antioxidative status ตัวอย่างปัสสาวะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 C จนถึงเวลาวิเคราะห์

ใน lime powder regimen PK day หลังจาก dosing แล้วอาสาสมัครนั่งตัวตรงเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง และยังไม่รับประทานอาหารเช้า อาสาสมัครได้รับประทานอาหารที่จัดไว้ให้ภายหลัง dosing แล้วที่ 4 ชั่วโมง และ 10 ชั่วโมง อาหารที่จัดให้เป็นอาหารที่ผู้วิจัยกำหนด โดยอาสาสมัครทุกรายได้รับอาหารที่เหมือนกัน อาสาสมัครจะต้องงดเครื่องดื่ม alcohol และงดสูบบุหรี่ รวมถึงยาทุกชนิด ตลอดระยะเวลาที่เข้าร่วมการวิจัย



ภาพที่ 5 สรุป time points ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะของ day 9 – lime powder regimen PK day

ตลอดระยะของ citrate clearance control day และ lime powder regimen PK day การเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะกระทำโดยแพทย์และคณะวิจัย

การวิเคราะห์ปริมาณสารซีเทรตในปัสสาวะโดยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณของซีเทรตในปัสสาวะด้วยเครื่อง HPLC ใช้หลักการของ Khaskhali และคณะ [64] โดยการนำปัสสาวะมา 1 ml นำไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสมาเพื่อวิเคราะห์ซีเทรตด้วยเครื่อง HPLC (Jasco, Japan) นิดผ่านตัวกรองหรือ filter ขนาด 0.22 μm ปริมาตร 0.5 ml. โดยใช้ Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 , pH = 2.00) เป็น mobile phase และ flow rate = 1.00 ml/min ที่ความยาวคลื่น 210 nm ซึ่งกราฟของซีเทรตจะออกมาในเวลาที่ 4.20 โดยค่าที่ได้นี้จะนำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับค่าของสารละลายซีเทรตมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2.5 mM เพื่อคำนวณหาปริมาณของซีเทรต ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ %CV เท่ากับ 3

การวิเคราะห์ปริมาณสารโพแทสเซียมในปัสสาวะ

การวิเคราะห์ปริมาณของโพแทสเซียมในปัสสาวะ วิเคราะห์โดยหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะโดยวิธี DPPH

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

โครงการระยะที่ 2

ประชากรตัวอย่างการวิจัยทางคลินิกระยะที่ 2

กลุ่มตัวอย่างคือผู้ป่วยโรคนี้ในประเทศไทย โดยทำการคัดเลือกและรวบรวมกลุ่มตัวอย่าง ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี

เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างมีดังนี้ มีการคัดกรองผู้ป่วยนี้ก่อน โดยคัดเลือกเฉพาะผู้ที่มีลักษณะที่จะเข้าเกณฑ์ เพื่อลดโอกาสที่จะรวบรวมผู้ป่วยที่ไม่เข้าเกณฑ์การคัดเข้าและคัดออก

เกณฑ์การคัดเข้า

- ☐ อายุ ≥ 18 ปี ทั้งเพศหญิงและชาย
- ☐ มีก้อนเนื้อในไตหรือกรวยไตหรือท่อไต
- ☐ มีภาพถ่ายทางรังสียืนยันการพบก้อนเนื้อ
- ☐ เป็นนิ่วชนิดแคลเซียมหรือกรดยูริก

- ติดตามผลหลังการรักษาด้วยการผ่าตัดแล้ว 1 เดือน ผู้ป่วยไม่มีนิ่วเหลือหรือมีนิ่วเหลือขนาดเล็กกว่า 4 มิลลิเมตร
- ผู้ที่มีการทำงานของไตอยู่ในเกณฑ์ปกติ โดยยึดเกณฑ์ค่า serum creatinine ไม่เกิน 2.0 mg/dL

เกณฑ์การคัดออก

- อายุ < 18 ปี
- หญิงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- นี่วิตติเชื้อ
- นิ่วที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นผลมาจากโรคทางพันธุกรรม อาทิเช่น hereditary hypercalciuria เป็นต้น
- ผู้ป่วยเปลี่ยนถ่ายไต
- กายวิภาคของไตผิดปกติ
- ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูงจากความผิดปกติของฮอร์โมนหรือโรคกระดูก เช่น hyperparathyroidism, sarcoidosis, Paget's disease
- โรคแพ้ภูมิคุ้มกันตัวเอง (Autoimmune disease) ที่ส่งผลต่อการทำงานของไต เช่น SLE
- ติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะเรื้อรังและเกิดซ้ำๆ
- โรคระบบทางเดินอาหารที่มีผลต่อการดูดซึมออกซาเลต เช่น การอักเสบของลำไส้
- ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ที่ได้รับยา indinavir*
- มะเร็งทุกชนิด
- ไม่สามารถลงนามในใบยินยอมได้
- ผู้ที่คณะวิจัยเห็นว่าเป็นผู้ที่ไม่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัย

*ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ที่ได้รับยา indinavir ตรวจสอบเฉพาะจากประวัติการรักษาของผู้ป่วย ไม่มีการตรวจเพิ่มเติม

งานวิจัยนี้เริ่มตั้งแต่ก่อนการรักษาด้วยวิธีทางสัลยกรรม เช่น การสลายนิ่วหรือการผ่าตัดนิ่วออก โดยเริ่มจากขั้นตอนการคัดกรองผู้ป่วย เก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และก้อนนิ่ว เพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการ จากนั้นเมื่อผู้ป่วยมาติดตามผลการรักษาตามปกติ (เป็น standard protocol ของการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่ว) คณะวิจัยทำการคัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การคัดเข้าและคัดออกให้เข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกแล้วได้รับการอธิบายโครงการวิจัยและได้รับแจกเอกสารแนะนำสำหรับอาสาสมัคร เมื่อผู้ป่วยรับทราบและเข้าใจโครงการวิจัยอย่างถ่องแท้แล้ว คณะวิจัยได้ขอคำยินยอมจากผู้ป่วย โดยการลงนามในใบยินยอมของผู้ป่วยเป็นไปด้วยความสมัครใจ และเมื่อผู้ป่วยลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว คณะวิจัยขอให้ตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต อาการและปัญหาที่เกี่ยวข้องกับโรคนิ่วไต รวมทั้งการดูแลตนเองด้านการสร้างเสริมสุขภาพของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

แบบสอบถามนี้จะให้ผู้ป่วยตอบ 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ก่อนการได้รับยาวิจัย และครั้งที่ 2 หลังได้ยาวิจัยครบ 6 เดือน บันทึกข้อมูลผู้ป่วยตามภาคผนวกที่ 1

สถานที่ทำการวิจัยหลัก คือ ฝ่ายศัลยศาสตร์ยูโร โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นศูนย์การรวบรวมกลุ่มประชากรตัวอย่าง (Single center) สำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ ดำเนินการที่ ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยโรคไตและโรคระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

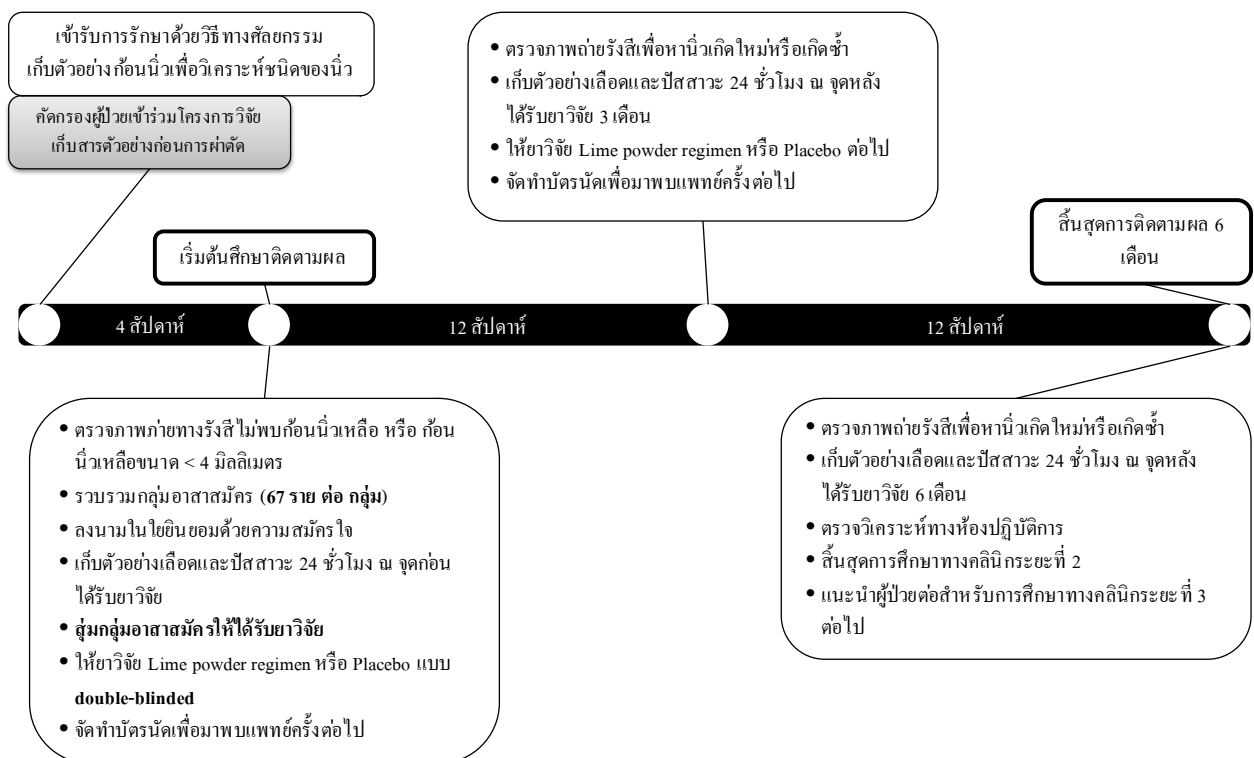
การให้ LPR และ placebo

ผู้ป่วยที่คัดเลือกเข้าศึกษาถูกสุ่มให้ได้รับการรักษาด้วย LPR หรือ Placebo (Lactose) (ภาพที่ 6) การให้การรักษาเป็นแบบ double-blinded ยาที่ให้ทั้ง 2 ชนิด เป็นผงปริมาณ 5 กรัม บรรจุในซองกันแสง ผู้ป่วยได้คำแนะนำให้ละลายผงยาในน้ำดื่มสะอาดปริมาตร 250 ml หรือ 1 แก้ว แล้วดื่มให้หมดภายใน 5 นาที ดื่มทุกวัน วันละ 1 ซอง หลังอาหารเช้า หรือ ก่อนนอน ใน 1 ซองของ LPR มีปริมาณซิเตรตและโพแทสเซียมอยู่ในช่วง 57-63 และ 19-23 mEq ตามลำดับ ส่วน Placebo เป็นน้ำตาลแลคโตสมีรสหวานเล็กน้อยและไม่มี การแต่งกลิ่นและรสเพิ่มเติม ซึ่งจะต่างจาก LPR ที่มีรสเปรี้ยว อาจจะทำให้ผู้ป่วยที่เป็นอาสาสมัครทราบได้ว่าได้ยาวิจัยคนละชนิด ส่งผลถึงประสิทธิภาพของการ blinding อย่างไรก็ดีตามจากการพูดคุยกับแพทย์ใน คณะวิจัย คณะแพทย์ที่จะทำการรักษาในโครงการวิจัยลงความเห็นตรงกันว่า ผู้ป่วยมาจากคนละที่คนละ ภูมิภาคไม่มีโอกาสได้มีปฏิสัมพันธ์กัน อีกทั้งผู้เข้าร่วมโครงการได้รับยาวิจัย (LPR หรือ placebo) ชนิดเดิม ไปจนจบการศึกษา จึงไม่เกิดการเปรียบเทียบในตัวผู้เข้าร่วมโครงการเอง สุดท้าย คณะผู้วิจัยมีความเห็นตรงกันว่า การแต่งกลิ่นหรือรสของ placebo อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิซึมที่จะส่งเสริมหรือยับยั้งการเกิดนิ่ว อันจะทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ และตามแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคไตในทางเดินปัสสาวะ (โรคไตในไต ท่อไต กระเพาะปัสสาวะ และท่อปัสสาวะ) โดย ชมรมศัลยแพทย์ระบบปัสสาวะ ภาควิชา уроวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ผู้ป่วยโรคไตภายหลังการผ่าตัดไม่ได้รับสารหรือยาใดๆ เพื่อป้องกันการเกิดนิ่ว กลับเป็นซ้ำ ยกเว้นการให้คำแนะนำด้านอาหารและการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในการดำเนินชีวิต จึงมั่นใจได้ว่าได้รับเพียงยาวิจัยซึ่งอาจเป็น LPR หรือ Lactose placebo

การวิจัยทางคลินิกระยะที่ 2 นี้ ผู้ป่วยต้องรับประทานยาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ติดตามผลการรักษาทุก 3 เดือน ผู้ป่วยมาพบแพทย์รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง (visits) ได้แก่ ที่ 0, 3 และ 6 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 3 แต่ละครั้งต้องมีการตรวจการเกิดนิ่วใหม่หรือเป็นนิ่วซ้ำโดย KUB x-ray หรือ ultrasound หรือ computed tomography หรือ intravenous pyelogram และเก็บสารตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ 24 ชั่วโมง สำหรับวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และมีการเก็บสารตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ก่อนการผ่าตัด (pre-operative specimen collection) ไว้สำหรับเปรียบเทียบกับ รายละเอียดพอสต์เชพของการดำเนินการวิจัยและระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 แสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงการวิจัยทางคลินิกระยะที่ 2



ภาพที่ 7 แสดงรายละเอียดพอสังเขปของการดำเนินการวิจัยและระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2

มาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของ LPR อยู่ภายใต้การควบคุมของ ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ณ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน โดยจะคัดเลือกมะนาวคุณภาพสูงในฤดูฝน ล้างให้สะอาด คั้นเอาน้ำมะนาว และขั้นตอนที่สำคัญคือการเติมสารโพแทสเซียมที่เป็น Pharmaceutical grade ลงในน้ำมะนาว เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 21 mEq ในน้ำมะนาวสด 25 มล. จากนั้นทำให้ระเหิดแห้ง (freeze-drying technique) ซึ่งโดยเฉลี่ยน้ำมะนาวสด 25 มล. จะได้มะนาวผง (lime powder) 5 กรัม หลังจากนั้นจะนำส่งมาที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อตรวจปริมาณสาร pharmaceutical active components คือ ซิเตรต และ โพแทสเซียม ใน Lime powder regimen หากตรวจแล้วไม่ได้ปริมาณ ซิเตรต และ โพแทสเซียม อยู่ในช่วง 57-63 และ 19-23 mEq ตามลำดับ จะต้องนำกลับไปผลิตใหม่ ให้ได้ตามขนาดรักษาที่กำหนดไว้ การตรวจสอบนี้จะกระทำทุกครั้งเมื่อมีการผลิต LPR Lot ใหม่ เพื่อการควบคุมคุณภาพของ LPR ในแต่ละ Lot

การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนักกระทำในทุก Lot ของการผลิต และการตรวจได้รับการรับรองจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก ดังแสดงในภาพที่ 8 นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก โดยคณะผู้วิจัย ณ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก็ให้ผลยืนยันว่า ไม่พบปริมาณสารโลหะหนักเกินกว่าระดับที่อนุญาตให้มีได้ในยา



King Mongkut's University of Technology Thonburi
126 Prachauthit Road Bangmod Thungkru Bangkok 10140 THAILAND
Process and Environmental Analysis Center

Certificate of Analysis on Formulated Freeze Dried Lime Juice Powder

Customer : Report No. : IPC-2010-CU-001

Receive Date : 15 September 2010

Sample ID : IPC-LJFDP-9001

Date of Analysis : 15-28 September 2010

Date of Report : 29 September 2010

Microbiological Analysis	Specification	Method
Standard Plate Count (CFU/g)	Non Detected	FDA/BAM
MPN Coliform /g	Non Detected	AOAC 991.14
MPN <i>E. Coli</i> /g	Non Detected	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus</i> /25 g	Non Detected	FDA/BAM
<i>Salmonella</i> /25 g	Non Detected	FDA/BAM
Yeast&Mold (CFU/g)	Non Detected	AOAC 997.02
Chemical Analysis	Specification	Method
Moisture (%)	4.5	AOAC 934.06
Ascorbic acid (mg/gm)	5.46	AOAC 984.26
Lead (mg/Kg)	0.2	AOAC 986.15
Mercury(mg/Kg)	Non Detected	AOAC 971.21
Arsenic(mg/Kg)	Non Detected	AOAC 986.15
Calcium(mg/gm)	3.1	AOAC 975.03
Iron(mg/Kg)	2.0	AOAC 975.03
Potassium(mg/gm)	164	AOAC 966.16
Sodium(mg/gm)	1.35	AOAC 975.30

Oranee Deerasamee
(Oranee Deerasamee)
Analyst

Surachai Keawboonruang
(Surachai Keawboonruang)
Analyst

Boosya Bunmag
(Assoc.Prof.Boosya Bunmag)
Pilot Plant Development and Training Institute

รายงานนี้จัดทำขึ้นจากรายงานที่ผ่านการตรวจสอบเท่านั้น ผลการทดสอบตามรายงานนี้ใช้ไม่ได้กับวัสดุอื่น หรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ แม้จะผลิตโดยบริษัทเดียวกัน

ภาพที่ 8 การรับรองการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Primary endpoint (primary outcome)

Metabolic stone risk factors (hypocitraturia, hypokaliuria, hypercalciuria, hyperoxaluria) และการเกิดนิ่วซ้ำ (recurrent stone formation) ภายหลังการรักษาด้วยวิธีทางสัลยกรรม เป็น primary outcome ของการศึกษานี้ รวมถึงการบันทึกผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นตลอดระยะเวลา 6 เดือนที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย LPR

Secondary outcomes ได้แก่ renal tubular damage, oxidative stress status และ kidney function (assessed by creatinine clearance)

แบบสอบถาม

การศึกษานี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบระดับคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคหัวใจ รวมทั้งอาการและปัญหาที่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจ และการดูแลตนเองด้านการสร้างเสริมสุขภาพของผู้ป่วยโรคหัวใจ อันประกอบด้วยอาหารที่ดีต่อสุขภาพของผู้ป่วย อาหารที่ส่งเสริมการเกิดโรคหัวใจซ้ำที่ต้องจำกัดปริมาณ และการออกกำลังกายและการจัดการความเครียดของผู้ป่วย (ภาคผนวกที่ 2)

คณะผู้วิจัยเลือกใช้แบบสอบถามเป็นเครื่องมือในการประเมิน และการตอบแบบสอบถามเป็นแบบสัมภาษณ์โดยตรง (direct interview) ทำการสอบถามผู้ป่วยก่อนได้รับการรักษาทางศัลยกรรม แบบสอบถามมีทั้งหมด 59 ข้อ ใช้เวลาในการตอบแบบสอบถามประมาณ 30 นาที แบบสอบถามแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 (ข้อ 1-11) เป็นแบบสอบถามคุณภาพชีวิตทั่วไป ส่วนที่ 2 (ข้อ 12-28) เป็นแบบสอบถามผู้ป่วยเพิ่มเติมว่ามีอาการและปัญหาที่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจภายในช่วงสัปดาห์ที่ผ่านมา และส่วนที่ 3 (ข้อ 29-59) เป็นแบบทดสอบการดูแลตนเองด้านการสร้างเสริมสุขภาพของผู้ป่วยโรคหัวใจ

สารตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างเลือด 10 ml โดยใช้ Heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่างพลาสมาที่ -20°C สำหรับวัดครีเอตินิน และตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน MDA และ protein carbonyl
2. เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง สำหรับตรวจวัดความถี่ต่อการเกิดหัวใจซ้ำ ครีเอตินิน แคลเซียม ออกซาเลต ซิเตรต โพแทสเซียม รวมทั้งตัวบ่งชี้การบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยใช้ Thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย
3. เก็บตัวอย่างก้อนเนื้อสำหรับวิเคราะห์ชนิดของเนื้อโดยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)
4. คำนวณ creatinine clearance เพื่อประเมินการทำงานของไต

การวิเคราะห์ข้อมูล (Statistical analysis)

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

สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้ในสรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังนี้

- O One way ANOVA test หรือ Kruskal-Wallis test ใช้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median ของสองกลุ่มขึ้นไปที่เป็นอิสระต่อกัน

- Two sample T-test หรือ Mann-Whitney test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median ของสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Pearson's correlation test หรือ Spearman's rank correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่องสองตัวแปร
- Chi-square test ใช้ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่เป็นกลุ่ม

หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ตรงตามข้อตกลงเบื้องต้น (Assumptions) ของ parametric tests ที่เลือกใช้ non-parametric tests ที่เหมาะสมแทน โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ STATA version 8, GraphPad Prism 5 และ SPSS version 10 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

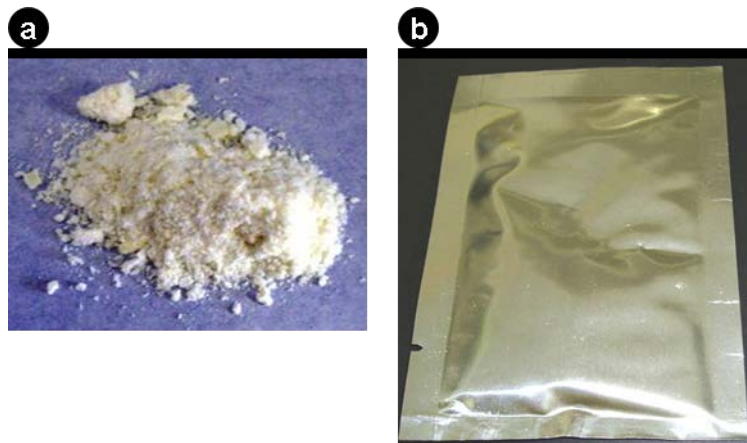
บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยโครงการระยะที่ 1 (Clinical phase 1 trial)

การวิเคราะห์สารองค์ประกอบสำคัญของ LPR และผลการทดสอบความเป็นพิษของ LPR ต่อเซลล์บุท่อไต (HK-2 cells)

LPR มีลักษณะเป็นผงร่วนซุย สีขาวอมเหลือง ละลายได้ดี บรรจุในซองอลูมิเนียมป้องกันแสงและความชื้น ขนาดซองละ 5 กรัม ดังแสดงในภาพที่ 9 รับประทานโดยละลายในน้ำดื่ม 200-300 มล ดื่มทุกวัน วันละ 1 ซอง ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบทางยาที่สำคัญของ LPR ดังแสดงในตารางที่ 3



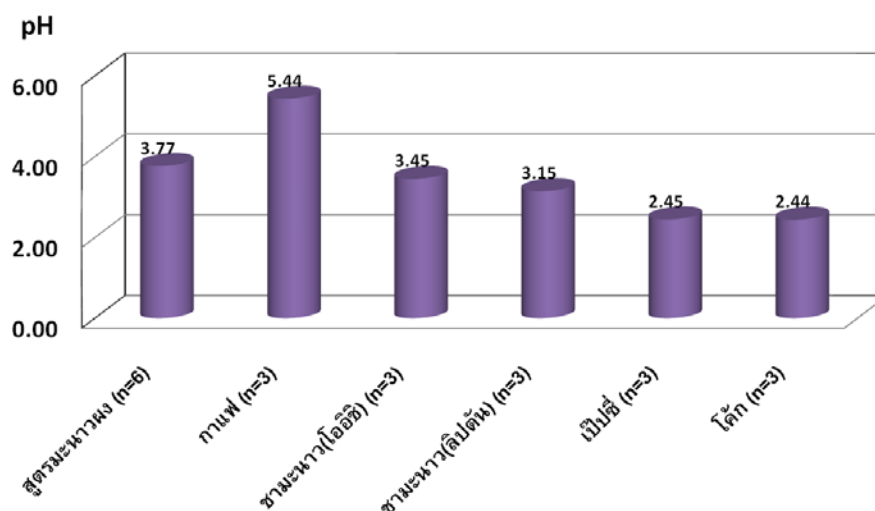
ภาพที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของ LPR เป็นผงร่วนซุยสีขาวอมเหลือง (a) บรรจุในซองอลูมิเนียม (ขนาด 7.5 x 12 ซม) สำหรับป้องกันแสงและความชื้น ปริมาณบรรจุ 5 กรัมต่อซอง (5 g/sachet) (b)

ผลการวัดค่า pH ในสารละลายสูตรมะนาวผง (LPR 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มล) พบว่าเท่ากับ 3.77 ± 0.02 เมื่อเทียบกับเครื่องดื่มที่นิยมดื่มในชีวิตประจำวัน ได้แก่ กาแฟ ชามะนาว (โออิชิ) ชา

มะนาว (ลิปตัน) เป๊ปซี่ และโค้ก มีค่า pH เท่ากับ 5.54 ± 0.09 , 3.54 ± 0.01 , 3.15 ± 0.01 , 2.45 ± 0.01 และ 2.44 ± 0.01 ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าค่า pH ของ LPR สูงกว่าหรือมีความเป็นกรดน้อยกว่าชามะนาวและน้ำอัดลมที่ขายในท้องตลาดทั่วไป ดังนั้นยืนยันได้ว่าไม่น่าจะมีผลข้างเคียงจากความเป็นกรดของ LPR หรือมีน้อยกว่าน้ำอัดลม

ตาราง 3 ชนิดของสารองค์ประกอบสำคัญที่วิเคราะห์ใน Lime powder regimen และวิธีวิเคราะห์

Chemical composition	Method
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	pH meter
Citrate	HPLC
Calcium, potassium และ magnesium	Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES)
Metals: arsenic, cadmium, chromium, cobalt, copper, iron, lead, lithium, manganese, molybdenum, nickel, selenium, strontium, vanadium, และ zinc	ICP-OES
Oxalate	HPLC
Nutritional composition: Total protein, carbohydrate, fat และ energy	AOAC (2005)
Total antioxidant capacity	Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) method



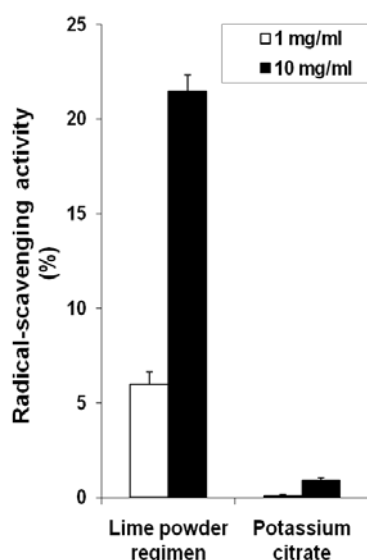
ภาพที่ 10 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลาย LPR เปรียบเทียบกับ กาแฟ ชามะนาว (โออีซี) ชามะนาว (ลิปตัน) เป๊ปซี่ และโค้ก ตัวเลขแสดง pH เฉลี่ย

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ citrate และ potassium ใน LPR พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 4,092 mg (63 mEq) และ 819 mg (21 mEq) ต่อซอง ตามลำดับ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ปริมาณ magnesium, calcium, phosphate, oxalate และ sodium มีปริมาณเท่ากับ 3.78, 78.90, 4.10 และ 0.26 mg/sachet ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

เนื่องจากกรรมวิธีการผลิต LPR สามารถคงความสดและอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) หลายชนิด การศึกษานี้วิเคราะห์ปริมาณของ vitamin C, polyphenols และ flavonoids ใน LPR พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 27.30, 9.20 และ 8.80 mg/sachet (ตารางที่ 4) และเมื่อวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (total antioxidant status) หรือประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical-scavenging activity) เทียบกับยาโพแทสเซียมซีเทรตพบว่า LPR มีค่า radical-scavenging activity สูงกว่ายาโพแทสเซียมซีเทรตอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 20 เท่า) และปริมาณ radical-scavenging activity สูงขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของ LPR (dose-dependent manner) (ภาพที่ 11) แสดงให้เห็นว่า LPR มีสรรพคุณเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งเป็นข้อดีที่เหนือกว่ายาโพแทสเซียมซีเทรตมาก

ตารางที่ 4 ปริมาณองค์ประกอบสำคัญใน Lime powder regimen

Chemical and antioxidant constituents	Amount (mg/sachet)
Citrate	4092 (63 mEq)
Potassium	819 (21 mEq)
Magnesium	3.78
Calcium	78.90
Phosphate	4.10
Oxalate	0.26
Sodium	6.58
Vitamin C	27.30
Polyphenols	9.20
Flavonoids	8.80



ภาพที่ 11 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (total antioxidant status) หรือประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical-scavenging activity) ของ LPR เทียบกับยาโพแทสเซียมซิเตรต พบว่า LPR มีค่า radical-scavenging activity สูงกว่ายาโพแทสเซียมซิเตรตอย่างมีนัยสำคัญ (21.5 ± 0.85 % vs. 0.88 ± 0.16 %, at 10 mg/ml; 5.99 ± 0.64 vs. 0.10 ± 0.05 %, at 1 mg/ml) และปริมาณ radical-scavenging activity สูงขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของ LPR (dose-dependent manner)

การศึกษานี้ยังวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของ LPR ผลการวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต (รวมไฟเบอร์) และไขมันรวม เท่ากับ 3.30, 65.56 และ 0.94 g/100g ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ปริมาณเถ้าและความชื้นเท่ากับ 27.02 และ 3.18 g/100g สำหรับพลังงาน LPR 100 g ให้พลังงานเท่ากับ 283.90 Kcal

การศึกษาองค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง

การศึกษาค้นคว้าองค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง 5 กรัม) 1 ซอง (พบว่ามีปริมาณสารหนู (arsenic, As) นิกเกิล (nickel, Ni) ตะกั่ว (lead, Pb) แอนติโมนี (antimony, An) วานาเดียม (vanadium, V) เท่ากับ 0.07, 0.06, 0.02, 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ไม่พบ แคดเมียม (cadmium, Cd) โคบอลต์ (cobalt, Co) และโครเมียม (chromium, Co) ในสารละลายสูตรมะนาวผง ดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงพบว่าปริมาณสารโลหะหนักที่มีในยาสูตรมะนาวผงไม่เกินค่าที่อนุญาตให้มีได้ในผลิตภัณฑ์อาหารและยา

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางโภชนาการของ LPR

รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ/อ้างอิง	ผลการทดสอบ	หน่วย
Ash	AOAC (2005), 940.26	27.02	g/100g
Moisture	AOAC (2005), 930.04	3.18	g/100g
Protein (Nx6.25)	In-house method TM-CH-017 based on AOAC (2005), 981.10	3.30	g/100g
Total Carbohydrate (Included fiber)	Darry M. Sullivan & Donald E. Carpenter. Method of Analysis for Nutrition Labeling; 1993 Chapter 6 page 105-107	65.56	g/100g
Total Energy	Darry M. Sullivan & Donald E. Carpenter. Method of Analysis for Nutrition Labeling; 1993 Chapter 6 page 105-107	283.90	Kilocalories/100g
Total Fat	AOAC (2005), 922.06	0.94	g/100g

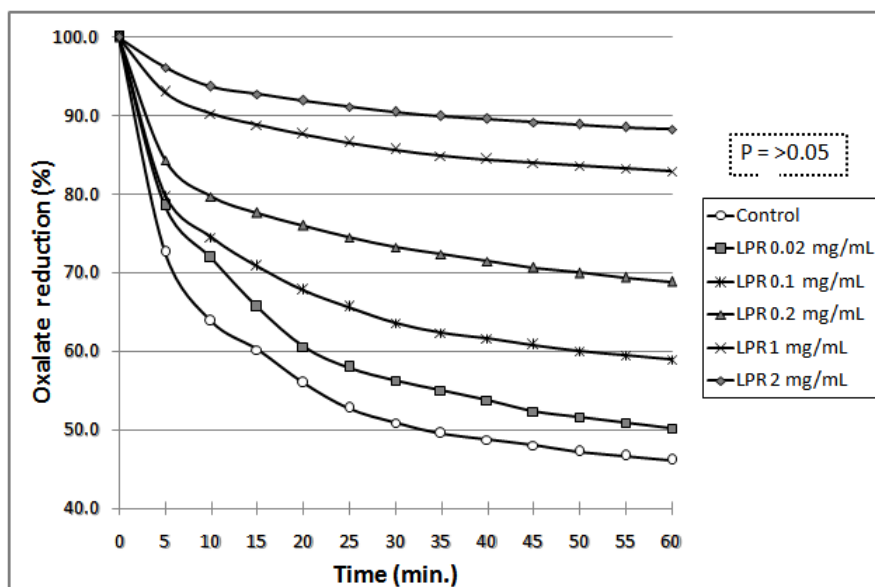
ตารางที่ 6 แสดงองค์ประกอบของสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผง (LPR)

Chemical constituents	Amount (ppm)	ALDC-HM USP reference (ppm)	OPDE-DF USP reference (mg/day)	RDA (mg/day)
Arsenic (As)	0.07	1.5	0.015	-
Cadmium (Cd)	UD	0.5	0.025	-
Cobalt (Co)	UD	nd	0.10	-
Chromium (Cr)	UD	25	0.15	0.0002-0.05
Nickel (Ni)	0.06	25	nd	-
Lead (Pb)	0.02	1	0.01	-
Antimony [65]	0.01	nd	0.02	-
Vanadium (V)	0.01	25	nd	-
Mercury	0.001	3	0.015	-

USP : United States Pharmacopeia; ALDC-HM : Acceptable Limits for Daily Consumption of Heavy Metals; OPDE-DF : Oral Permitted Daily Exposure for Dosage Forms; RDA : Recommended Dietary Allowances; UD : undetectable; nd : no data

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของสูตรมะนาวต่อการเกิด crystal growth

ผลของสูตรมะนาวต่อการเกิด crystal growth พบว่า ทุก 5 นาที ปริมาณการลดลงของ free oxalate ซ้ำลงตามลำดับความเข้มข้นของ LPR (0.02, 0.1, 0.2, 1, และ 2 mg/ml) ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 12 พิสูจน์ว่า LPR มีสมบัติยับยั้งการเจริญของผลึก COM (crystal growth inhibitor)



ภาพที่ 12 แสดงผลของสูตรมะนาวต่อการเกิด crystal growth พบว่า ปริมาณการลดลงของ free oxalate จะซ้ำลงตามความเข้มข้นของ LPR เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

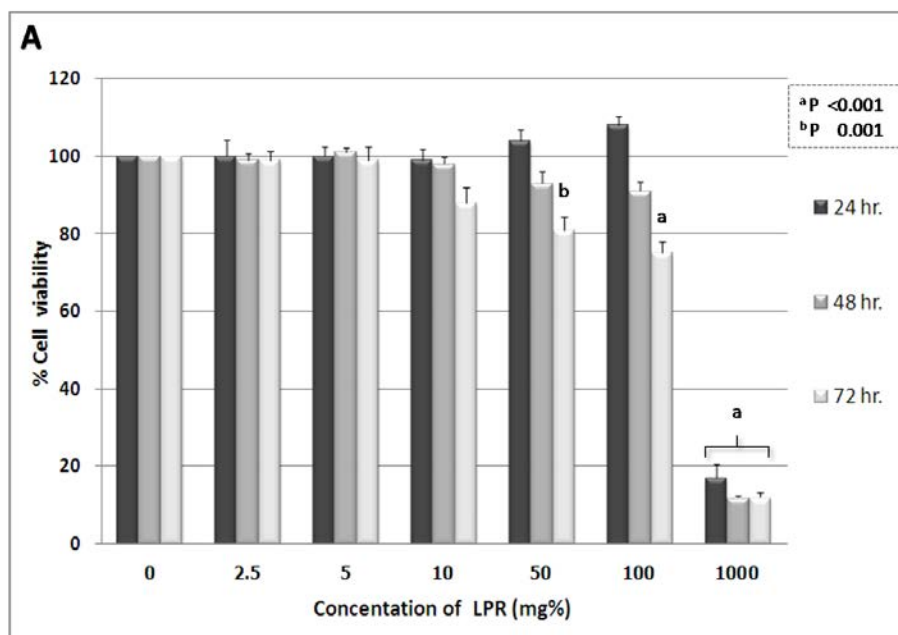
การศึกษาผลของสูตรมะนาวต่อการมีชีวิต (cell viability) ของเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cell)

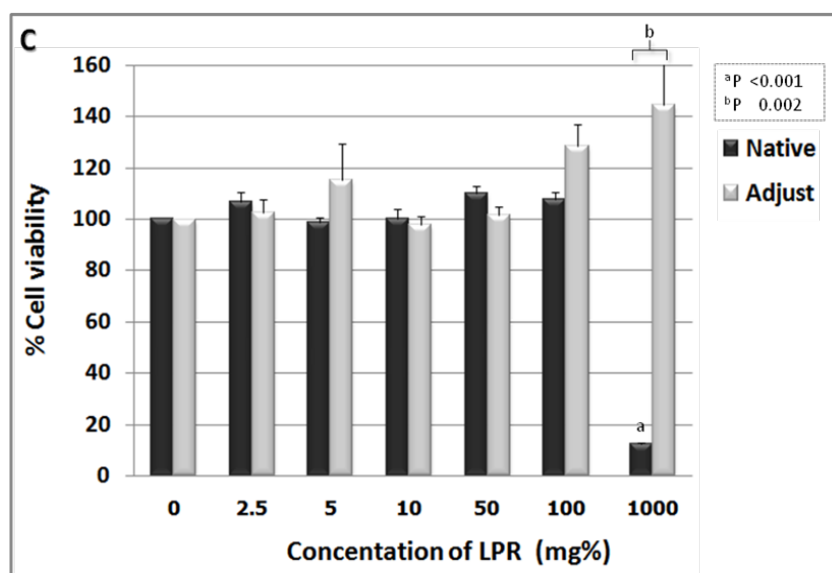
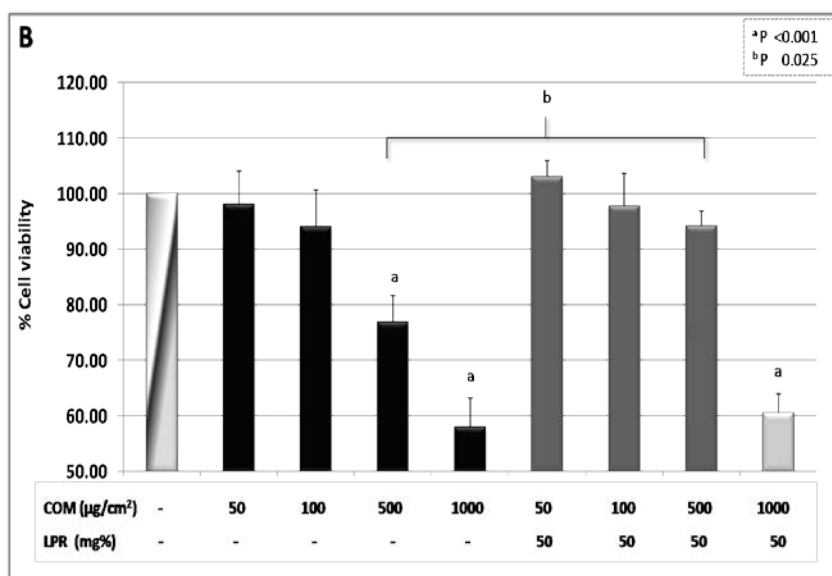
ผลของสูตรมะนาวต่อ cell viability ของ HK-2 cell พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาว ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 50 และ 100 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell viability เพิ่มขึ้นแต่ไม่พบนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวความเข้มข้น 1,000 mg% ส่งผลให้ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสูตรมะนาว ($P < 0.001$) (ภาพที่ 13A) และที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า cell viability เริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของสูตรมะนาว 10, 50 และ 100 mg% และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 1,000 mg% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) เช่นเดียวกันเมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า cell viability เริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของสูตรมะนาว 5 และ 10 mg% และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 1,000 mg% ตามลำดับ ($P = 0.001, <0.001, <0.001$ ตามลำดับ) ดังภาพที่ 13A

เป็นที่ทราบกันดีว่าผลึกนิวเคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮดรต (COM) เป็นพิษต่อเซลล์บุผิวท่อไต ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ผลึก COM มีผลทำให้ cell viability ของ HK-2 cell ลดลง โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของผลึก COM เท่ากับ 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (ภาพที่ 13B) และเมื่อศึกษาผลของ

สูตรมะนาวผงต่อ cell viability ของ HK-2 cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า cell viability ของ COM-treated HK-2 cell เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ COM สูตรมะนาวผง LPR สามารถเพิ่ม cell viability ของ HK-2 cell ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.025$) (ภาพที่ 13B) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สูตรมะนาวผง LPR สามารถลดความเป็นพิษของผลึก COM ต่อ HK-2 cell ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ สูตรมะนาวผง (50 mg%) ไม่สามารถเพิ่ม cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 1.000$) (ภาพที่ 13B) อาจเป็นเพราะมีปริมาณ COM มากเกินกว่าที่สูตรมะนาวผง 50 mg% หากเพิ่มปริมาณสูตรมะนาวผงขึ้นอาจช่วยลดพิษของ COM ที่ความเข้มข้นสูงๆ ได้

จากภาพที่ 5A ความเข้มข้นของสูตรมะนาวผง 1,000 mg% ทำให้ HK-2 cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าที่ความเข้มข้นสูง สูตรมะนาวผงเป็นพิษต่อเซลล์ ผู้วิจัยคาดว่า การลดลงของ cell viability น่าจะเป็นผลมาจากความเป็นกรดของสูตรมะนาวผง ซึ่งโดยทั่วไป HK-2 cell จะเจริญได้ดีที่ pH ประมาณ 7.25 หากภาวะเป็นกรดมากเซลล์จะตาย จึงทำการทดสอบผลของ pH ของสูตรมะนาวผงต่อ cell viability ของ HK-2 cell ผลการทดสอบพบว่า เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงที่ไม่ได้ปรับ pH (native pH LPR) ที่ความเข้มข้น 1,000 mg% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) (ภาพที่ 13C) ขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงที่ปรับค่า pH ให้เป็น 7.25 (adjusted pH LPR) ที่ความเข้มข้น 1,000 mg% ส่งผลให้ cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.002$) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าที่ทุกความเข้มข้นของสูตรมะนาวผงที่ปรับค่า pH ให้เป็นกลาง (2.5, 5, 10, 50, 100 และ 1,000 mg%) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ cell viability อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 13C) ดังนั้น การลดลงของ cell viability ที่ความเข้มข้นสูงของสูตรมะนาวผงเป็นผลมาจากความเป็นกรดมากเกินไป (acid-induced cell death)

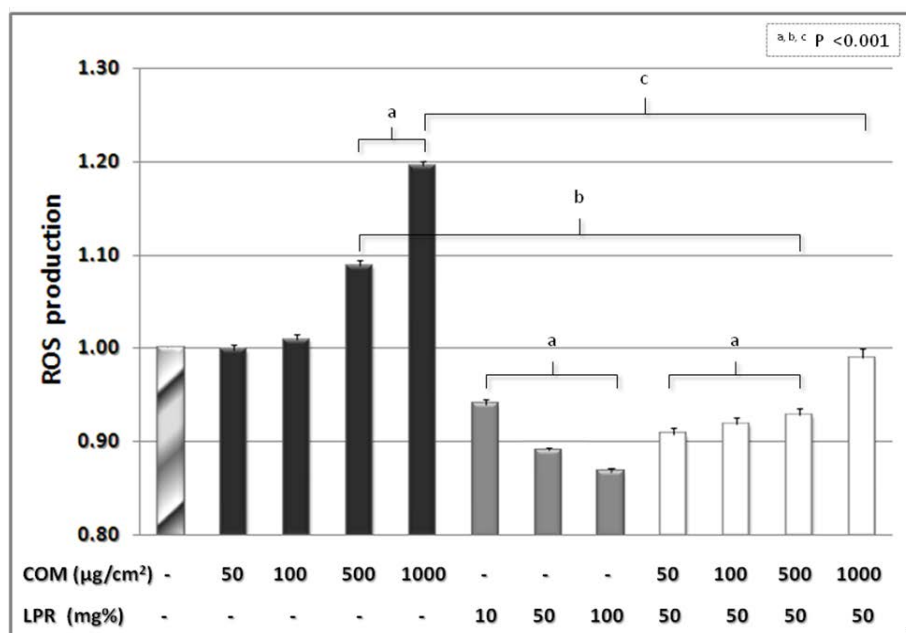




ภาพที่ 13 แสดงผลของสูตรมะนาวผง (LPR) ต่อ cell viability ของ HK-2 cell และ COM-treated HK-2 cell A: เมื่อ HK-2 cell ได้รับ LPR เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 50, 100 และ 500 mg% พบว่า cell viability (%) เพิ่มขึ้นตามลำดับแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อได้รับ LPR ที่ความเข้มข้นสูง 1,000 mg% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ LPR ($P < 0.001$) B: ผลของ LPR ต่อ HK-2 cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM (COM-treated HK-2 cell) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า กลุ่ม HK-2 cell ที่ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 500 µg/cm² ร่วมกับ LPR ที่ความเข้มข้น 50 mg% ทำให้ cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ COM 500 µg/cm² อย่างเดียว ($P = 0.025$) C: เมื่อเซลล์ได้รับ LPR ที่ปรับ pH เป็น 7.25 (adjusted pH LPR) พบว่า cell viability ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของ adjusted pH LPR ที่ได้รับ และที่ความเข้มข้น 1,000 mg% พบว่า adjusted pH LPR สามารถเพิ่ม cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ native pH LPR ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ($P = 0.002$)

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระ (ROS production) ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cell)

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผง (LPR) ต่อการสร้าง reactive oxygen species (ROS) พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ LPR ระดับของการสร้าง ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามความเข้มข้นของ LPR ที่สูงขึ้น (10, 50 และ 100 mg%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ LPR ($P < 0.001$) (ภาพที่ 14) ในทางตรงกันข้ามเมื่อเซลล์ที่ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ พบว่าระดับ ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) และเมื่อเซลล์ได้รับผลึก COM ที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ร่วมกับได้รับ LPR ที่ความเข้มข้น 50 mg% พบว่า ระดับ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) ยกเว้นที่ความเข้มข้นของ COM 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ไม่พบการลดลงของ ROS อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับผลึก COM อย่างเดียว (ความเข้มข้น 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) กับเซลล์ที่ได้รับทั้งผลึก COM และ LPR (COM ความเข้มข้น 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ร่วมกับ LPR 50 mg%) พบว่าเซลล์ที่ได้รับทั้งผลึก COM และ LPR มีระดับการสร้าง ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 ผลของ LPR และการยับยั้งการสร้าง ROS ใน HK-2 cell พบว่า LPR ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg% ทำให้ระดับ ROS ลดลงตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) ในเซลล์ที่ได้รับ COM ที่ 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ มีระดับการสร้าง ROS สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) ขณะที่ในเซลล์ที่ได้รับ COM ที่ 50, 100 และ 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ร่วมกับ LPR 50 mg% พบว่า ระดับ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกับเซลล์ที่ได้รับ COM อย่างเดียว ($P < 0.001$)

การศึกษา Acute animal toxicity ของ Lime powder regimen

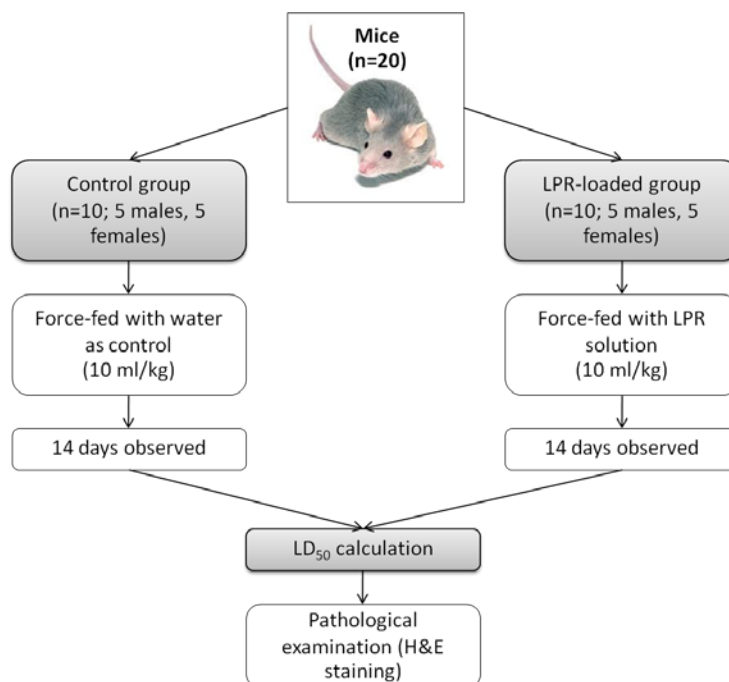
ทำการศึกษาในหนูเพื่อทดสอบพิษเฉียบพลันและหาค่า LD-50 ของ LPR โดยส่งสารตัวอย่าง LPR ไปทดสอบที่ศูนย์วิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และนำอวัยวะของหนู ได้แก่ ตับ ไต และสมอง มาตรวจทางพยาธิวิทยา ย้อมด้วยวิธี H&E staining เพื่อวิเคราะห์หาความผิดปกติของอวัยวะดังกล่าว ภาพที่ 15 แสดงผังการทดสอบค่า LD-50 ของ LPR ในหนู (mice) จำนวน 20 ตัว

นำตัวอย่าง LPR มาละลายน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.5 g/ml ดังทิ้งไว้ให้ตกตะกอนนำส่วนใสมาทดสอบ กรอกสารตัวอย่าง LPR ทางปากแก่หนูถีบจักรกลุ่มทดลอง (LPR-loaded group) จำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว) ในขนาด 10 ml/kg จำนวน 2 ครั้ง (ห่างกัน 4 ชั่วโมง) คิดเป็นขนาดของสารละลาย LPR ที่ได้รับ เท่ากับ 10.0 g/kg สำหรับหนูกลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว) ได้รับน้ำกลั่นทางปากในขนาดที่เท่ากับหนูกลุ่มทดลอง สังเกตอาการทุกวันจนครบกำหนด 14 วัน ผลการทดสอบพิษเฉียบพลันพบว่า หนูกลุ่มทดลองทุกตัวหลังได้รับตัวอย่างสารละลาย LPR 3 นาที มีอาการคล้อยคลื่อนได้ อารมณ์เหล่านี้กลับสู่ภาวะปกติหลังได้รับตัวอย่าง 24 ชม หนูทุกตัวมีชีวิตรอดจนครบกำหนด ผลการผ่าชันสูตร ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางพยาธิวิทยาของหนูกลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

ดังนั้นขนาดของตัวอย่างสารละลาย LPR ที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 หรือค่า LD-50 ของ LPR คือ >10.0 g/kg และผล Hematoxylin and Eosin (H&E) staining ของชิ้นเนื้อไตและตับไม่พบความผิดปกติระดับเซลล์ใดๆ ในหนูกลุ่มที่ได้รับ LPR (ประเมินหรืออ่านผลโดยพยาธิแพทย์) แสดงให้เห็นว่า LPR ไม่เป็นพิษหรือมีความปลอดภัยสูงมาก

เมื่อจัดกลุ่มความเป็นพิษ (toxicity class) ของ LPR ตามเกณฑ์ของ Hodge and Sterner (ตารางที่ 7) พบว่า LPR อยู่ในกลุ่มที่ 5 หรือกลุ่มเป็นพิษต่ำมาก (very low toxicity, LD-50 oral route: 5-15 g/kg) อย่างไรก็ตามการศึกษา acute toxicity ครั้งนี้ทดสอบเพียงขนาด (dose) เดียว คือ 10 g/kg และไม่พบสัญญาณการเป็นพิษในหนูทดลองเลย คณะวิจัยเชื่อว่าหากเพิ่มขนาดของ LPR มากขึ้นเป็น >15 g/kg ก็ยังคงไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลองหรือความเป็นพิษของ LPR น่าจะอยู่ในกลุ่มที่ 6 คือ ก่ออันตรายไม่เป็นอันตราย (relatively harmless) ซึ่งคณะวิจัยจะทำการศึกษาในหนูขนาดใหญ่ขึ้น (rats) เพื่อยืนยันผลต่อไป

ผลการศึกษาในระยะก่อนคลินิก (pre-clinical study) นี้ บ่งชี้ชัดเจนว่า LPR มีความเป็นพิษต่ำมากในสัตว์ทดลอง คณะวิจัยจึงวางแผนทำการศึกษาในระยะคลินิกต่อไป โดยลำดับแรกเป็นการศึกษาทางคลินิก ระยะที่ 1 (phase 1 clinical trial) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา pharmacokinetic (PK) ของ LPR ในอาสาสมัครคนปกติสุขภาพดี และสังเกตผลข้างเคียง (side effects) ที่อาจเกิดขึ้น



ภาพที่ 15 แผนผังการทดสอบค่า LD-50 ของ LPR ในหนู (mice)

ตารางที่ 7 Classes of human toxicity based on the results of animal assays according to the Hodge and Sterner scale

Toxicity Class	Common description	LD ₅₀ oral (Single dose for rats) mg/kg	LC ₅₀ inhalation (Dose over a 4 hour period for rats) ppm	LD ₅₀ dermal (Single application to the skin of rabbits) mg/kg	Probable lethal dose for humans
1	Extremely high toxicity	1 or less	10	5 or less	1 grain (1 drop, contact with mouth)
2	High toxicity	1-50	10-100	5-43	4 ml (1 teaspoon)
3	Moderate toxicity	50-500	100-1,000	44-340	30 ml (1 liquid oz)
4	Low toxicity	500-5,000	1,000-10,000	350-2,810	600 ml (1 pint)
5	Very low toxicity	5,000-15,000	10,000-100,000	2,820-22,590	1 liter (1 quart)
6	Relatively harmless	15,000 or more	100,000 or more	22,600 or more	more than 1 liter (more than 1 quart)

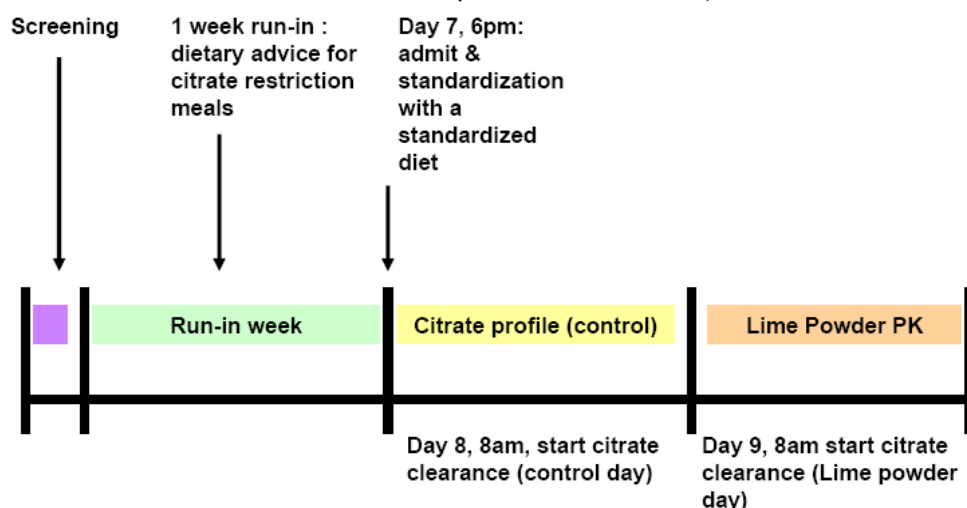
Classes of human toxicity table developed by toxicologists Hodge and Sterner

การศึกษา Pharmacokinetic (PK) parameters ของ LPR (Phase 1 clinical trial)

ดำเนินการศึกษาในอาสาสมัครไทยที่มีสุขภาพปกติ (healthy volunteers) จำนวน 13 ราย

ประชากรที่นำมาศึกษาในโครงการได้เซ็นใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ และอาสาสมัครทุกรายได้รับการตรวจร่างกายทั่วไปและการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันความพร้อมของร่างกาย

ดำเนินการวิจัยโดยการศึกษารูปแบบ single dose (oral route) ตามแผนภูมิการดำเนินการวิจัยและการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 16, 17 และ 18 ตามลำดับ



Screening period: 2 – 15 ธ.ค .2553

Run-in week: 18 – 24 ธ.ค .2553

Citrate profile (control day): 25 ธ.ค .2553

Lime powder PK (LPR-loaded day): 26 ธ.ค .2553

ภาพที่ 16 สรุปวิธีดำเนินการวิจัยของ phase 1 clinical trial

ผลการ Screening

รวบรวมอาสาสมัครวันที่ 2 และ 9 ธันวาคม 2553 จำนวนเริ่มต้น 16 ราย อาสาสมัครทุกรายได้รับการตรวจกรอง (screening) ว่ามีคุณสมบัติเข้าได้กับ inclusion criteria ทั้งหมด รายการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีดังนี้

1. CBC
2. Fasting blood sugar
3. Blood urea nitrogen (BUN)
4. Serum creatinine
5. Alkaline phosphatase (ALP)
6. ALT

7. AST
8. Total bilirubin
9. Total protein and albumin
10. HBs-antigen
11. Anti-HIV
12. Electrolytes
13. U/A (Chemical Exam/ Microscopic exam)
14. Urine pregnancy test เฉพาะผู้หญิง (6 ราย)

จาก 16 ราย อาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์ inclusion criteria มี จำนวน 15 ราย และจาก 15 รายที่ผ่านการคัดกรอง 13 ราย เข้าร่วมจนสิ้นสุดโครงการ ขณะที่ 2 ราย ประสงค์ที่จะถอนตัวออกจากโครงการวิจัยเนื่องจากปัญหาส่วนตัว คือ รายที่ 1 ติดเชื้อไขหวัดใหญ่ และรายที่ 2 แย้งว่าบิดาต้องเข้าโรงพยาบาล กระทั่งหันหลังต้องไปเฝ้าดูแลบิดา จึงไม่สามารถเข้าร่วมโครงการวิจัยได้ ก่อนการทดลอง อาสาสมัครหญิง (5 ราย) ได้รับการตรวจยืนยันอีกครั้งว่าไม่มีการตั้งครรภ์ ในวันที่ 24 ธันวาคม 2553 (วันก่อนทำการทดลอง)

ดังนั้น ในการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 นี้ มีอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการทั้งสิ้น จำนวน 13 ราย เป็นเพศชาย 8 ราย (62%) เพศหญิง 5 ราย (38%) อายุเฉลี่ย 34 ± 4 ปี BMI เฉลี่ย $23 \pm 2 \text{ kg/m}^2$ ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของอาสาสมัครทั้ง 13 ราย แสดงในตารางที่ 8 และค่าเฉลี่ยของผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของอาสาสมัครแต่ละคนที่เข้าร่วมโครงการ (n=13)

Subject No.	Hb (g/dl)	Hct (%)	FBS (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	CrCl	Total Bilirubin (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	TCO2 (mmol/L)	Anti-HIV	HBsAg
1	13.4	40	85	9	0.6	120.5	0.7	33	35	108	143	4.0	104	31	Neg	Neg
2	12.1	36	80	7	0.6	124.5	1.0	24	12	61	141	4.2	105	29	Neg	Neg
3	17.0	49	85	12	0.8	129.1	0.7	44	45	71	141	4.3	103	33	Neg	Neg
4	12.4	38	88	9	0.6	111.5	0.7	18	8	58	143	3.8	106	30	Neg	Neg
5	13.8	41	82	13	0.7	92.5	0.8	19	11	76	143	4.4	105	30	Neg	Neg
6	12.4	37	91	12	0.6	129.1	1.1	16	12	75	143	4.2	106	30	Neg	Neg
7	14.1	42	82	10	0.9	107.3	0.7	21	20	78	144	4.6	104	33	Neg	Neg
8	15.3	47	83	12	0.9	104.2	1.1	41	35	56	146	4.6	106	32	Neg	Neg
9	14.9	45	90	11	1.0	91.6	0.8	32	36	62	144	4.3	104	31	Neg	Neg
10	15.6	46	87	10	1.0	95.1	0.6	25	22	59	144	4.3	104	30	Neg	Neg
11	14.2	43	104	10	0.8	113.1	0.6	37	26	59	142	4.1	106	30	Neg	Neg
12	15.0	43	80	14	1.3	87.7	1.2	33	23	63	143	4.5	104	30	Neg	Neg
13	15.1	46	95	10	1.0	92.4	0.9	28	17	46	143	4.2	105	30	Neg	Neg

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของอาสาสมัครที่เข้าโครงการ (n=13)

Measurements	Mean	SD	Min	Max
Hb (g/dl)	14.3	1.4	12.1	15.6
Hct (%)	42	4	36	49
FBS (mg/dl)	87	7	80	104
BUN (mg/dl)	11	2	7	14
Creatinine (mg/dl)	0.8	0.2	0.6	1.3
Creatinine clearance (mg/dl)	107.5	15.0	87.7	129.1
Total Bilirubin (mg/dl)	0.8	0.2	0.6	1.2
AST (U/L)	29	9	16	44
ALT (U/L)	23	12	8	45
ALP (U/L)	67	15	46	108
Na (mmol/L)	143	1	141	146
K (mmol/L)	4.3	0.2	3.8	4.5
Cl (mmol/L)	105	1	103	106
TCO2 (mmol/L)	31	1	29	33

Run-in week

อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับคำแนะนำการบริโภคอาหารที่มี citrate และ potassium ต่อพร้อมบันทึกข้อมูลการบริโภคอาหารประจำวันตลอด 1 สัปดาห์ ระหว่างวันที่ 18 – 24 ธ.ค. 2553

ในวันที่ 7 (24 ธ.ค. 2553) ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครเข้ามาพักที่ศูนย์ Chula Clinical Research Center ตั้งแต่เวลา 18.00 น. เพื่อบริโภคอาหารแบบเดียวกันและจำกัดอาหารที่มี citrate และ potassium สูง พร้อมกับงดอาหารหลัง 21.00 น. โดยไม่ต้องงดน้ำ

Citrate clearance control day

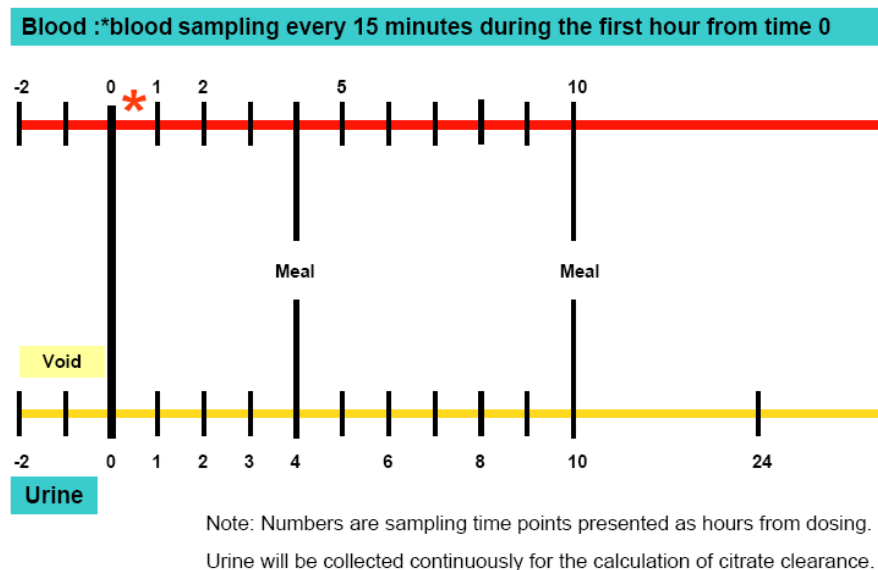
ในวันที่ 8 (25 ธ.ค. 2553) ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครได้รับการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะที่เวลาต่างๆ ดังภาพที่ 17 โดย baseline (time 0) ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะจะเริ่มที่เวลา 7.00 น. และสิ้นสุดที่ 24 ชั่วโมง (7.00 น. ของเช้าวันที่ 9 ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย)

การเก็บตัวอย่างเลือด: เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะที่หลอดเลือดดำบริเวณแขนครั้งละประมาณ 7 ml ที่เวลา baseline (time 0), 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 5 และ 10 ชั่วโมง หลัง time 0 เก็บเลือดใน

หลอดสูญญากาศที่เคลือบด้วย EDTA เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ตัวอย่างเลือดนำมาปั่นแยกเอาพลาสมา และพลาสมาที่แยกได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 C จนกระทั่งถึงเวลาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ citrate ในเลือด

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ: ก่อนการเจาะเลือดที่ time 0 อาสาสมัครปัสสาวะออกทั้งหมดเพื่อทำให้กระเพาะปัสสาวะว่างและเก็บเป็นตัวอย่างปัสสาวะ baseline (time 0) จากนั้นให้ดื่มน้ำ 500 มล. เก็บปัสสาวะทั้งหมดที่เกิดขึ้น ณ เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, และ 24 ชั่วโมงหลังจาก time 0 เก็บตัวอย่างปัสสาวะที่อุณหภูมิ -70 C จนถึงวันวิเคราะห์

อาสาสมัครได้รับประทานอาหารที่จัดไว้ให้ ภายหลัง dosing (การให้น้ำเปล่าที่มีปริมาตรเท่ากับสารละลาย LPR) แล้วที่ 4 ชั่วโมง และ 10 ชั่วโมง อาหารที่จัดให้จะเป็นอาหารผู้วิจัยกำหนด โดยอาสาสมัครทุกรายจะได้รับอาหารที่เหมือนกัน



ภาพที่ 17 สรุป time point ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะของวันควบคุม (citrate clearance control day)

Lime powder regimen PK day (LPR-PK day)

เช้าวันที่ 9 (26 ธันวาคม 2553) ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย (LPR-PK day หรือ LPR day) อาสาสมัครได้รับการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะที่เวลาต่างๆ ดังภาพที่ 18 โดย baseline (time 0) ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะจะเริ่มที่เวลา 7.00 น. และสิ้นสุดที่ 24 ชั่วโมง (7.00น. ของเช้าวันที่ 10 ของการเข้าร่วมโครงการวิจัย)

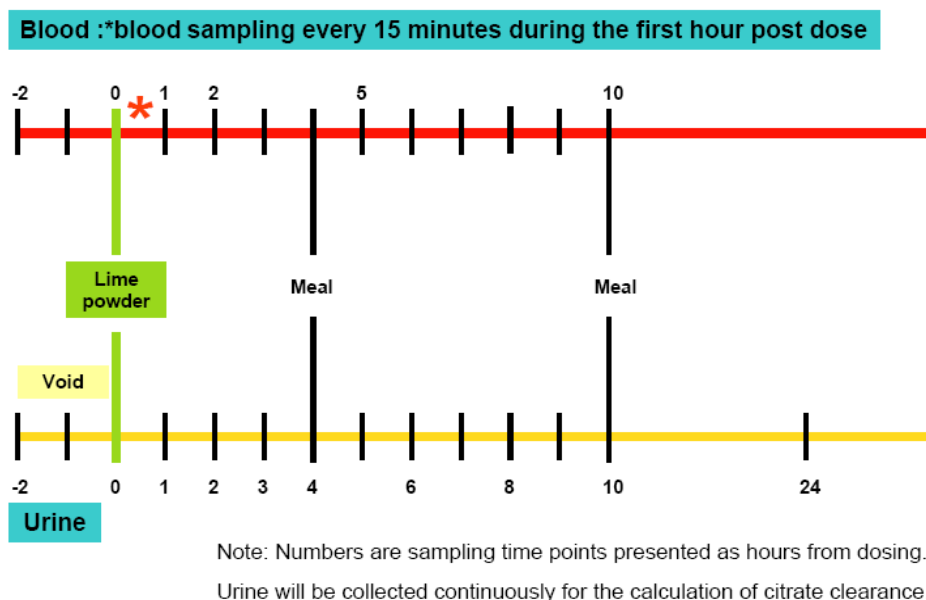
การเก็บตัวอย่างเลือด: เก็บตัวอย่างเลือดตามช่วงเวลาเหมือนกับในวันที่ 8 (25 ธ.ค. 2553)

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ: อาสาสมัครปัสสาวะทิ้งทั้งหมดเพื่อทำให้กระเพาะปัสสาวะว่างก่อนได้รับ lime powder regimen และเก็บเป็นตัวอย่างปัสสาวะ baseline (time 0) เหมือนกับ ในวันที่ 8 (25 ธ.ค. 2553)

จากนั้นให้รับประทาน LPR ตามที่แสดงไว้ในภาพที่ 16 พร้อมเพิ่มน้ำอีก 250 ml จากนั้นเก็บปัสสาวะทั้งหมดที่เกิดขึ้น ณ เวลา 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับ LPR ตัวอย่างปัสสาวะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 C จนถึงเวลาวิเคราะห์

ใน LPR-PK day หลังจาก dosing (การได้รับสารละลาย LPR 200 มล) แล้วอาสาสมัครจะต้องนั่งตัวตรงเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง และยังไม่รับประทานอาหารเช้า อาสาสมัครจะได้รับประทานอาหารที่จัดไว้ให้ภายหลัง dosing แล้วที่ 4 ชั่วโมงและ 10 ชั่วโมง อาหารที่จัดให้จะเป็นอาหารที่ผู้วิจัยกำหนด โดยอาสาสมัครทุกรายจะได้รับอาหารที่เหมือนกัน อาสาสมัครจะต้องงดเครื่องดื่ม alcohol และงดสูบบุหรี่ รวมถึงยาทุกชนิดตลอดระยะเวลาที่เข้าร่วมการวิจัย การเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะตลอดโครงการกระทำโดยแพทย์และคณะวิจัย

ตารางที่ 10 แสดงรายการการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะที่เวลาต่างๆ ทั้งจาก control และ LPR-PK days



ภาพที่ 18 สรุป time point ของการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะของวัน LPR-PK day

ตารางที่ 10 รายการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะที่เก็บ ณ เวลาต่างๆ ทั้งจาก control และ LPR-PK days

ตัวอย่างเลือด/พลาสมา	ตัวอย่างปัสสาวะ
Citrate	Volume
Potassium	pH
Creatinine	Creatinine
Total antioxidant status (TAS)	Citrate
	Potassium
	Magnesium
	Calcium
	Protein
	Oxalate
	TAS

ค่า Pharmacokinetic parameters ทั้งในเลือดและปัสสาวะที่สนใจได้แก่ $AUC_{0 \rightarrow t}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$ และ K_{el} ของ citrate (ภาพที่ 19) โดย

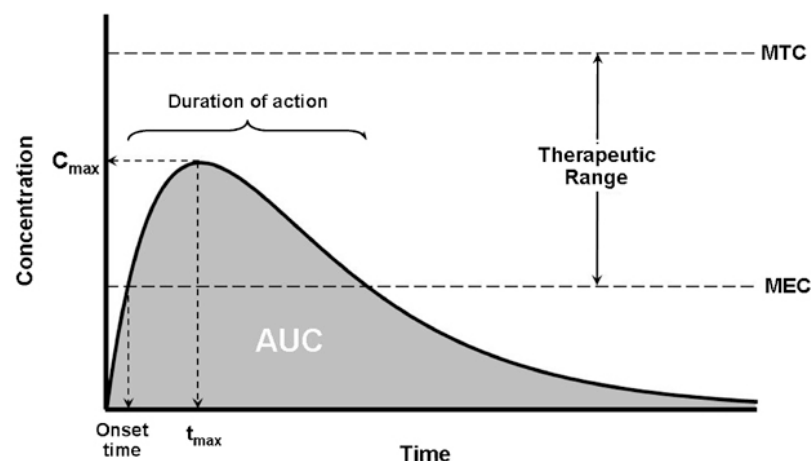
$AUC_{0 \rightarrow t}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ใช้อธิบายถึง bioavailability

C_{max} ความเข้มข้นสูงสุดของยาในพลาสมา

t_{max} ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มให้ยาถึงเวลาที่ความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด

$t_{1/2}$ ค่าครึ่งชีวิตของยา (Half-life)

K_{el} ค่าคงที่ในการกำจัดยา (elimination constant)



ภาพที่ 19 Pharmacokinetic parameters ของโปรไฟล์ระดับยาในพลาสมาภายหลัง oral administration. C_{max} , maximum concentration; t_{max} , time to C_{max} ; AUC, area under the curve; MEC, minimum effective concentration; MTC, maximum tolerated concentration

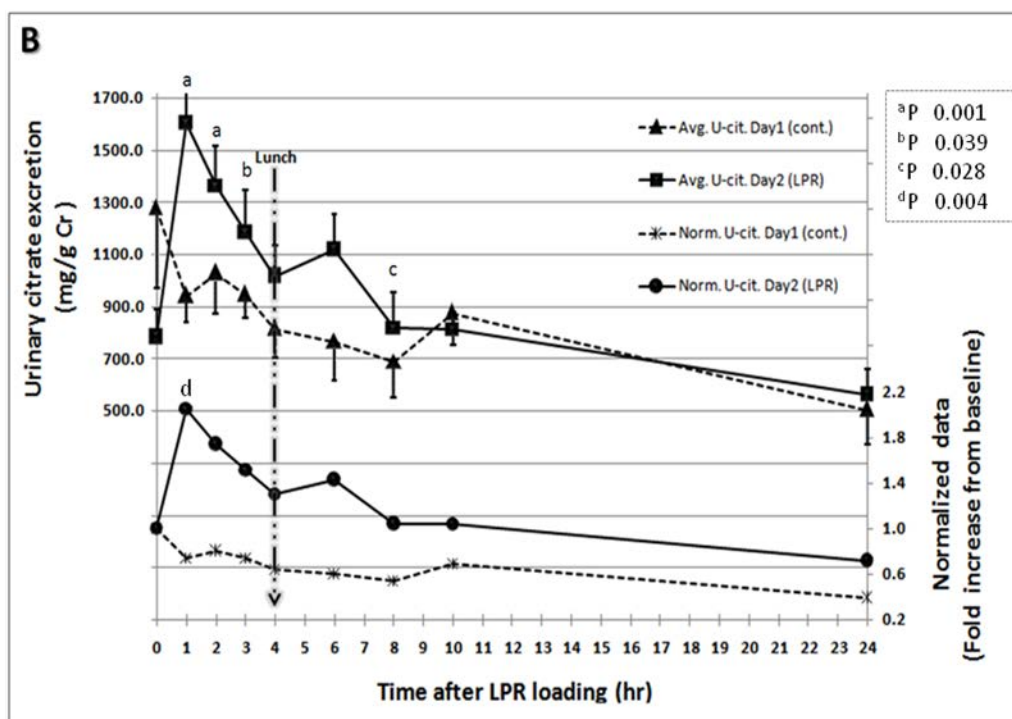
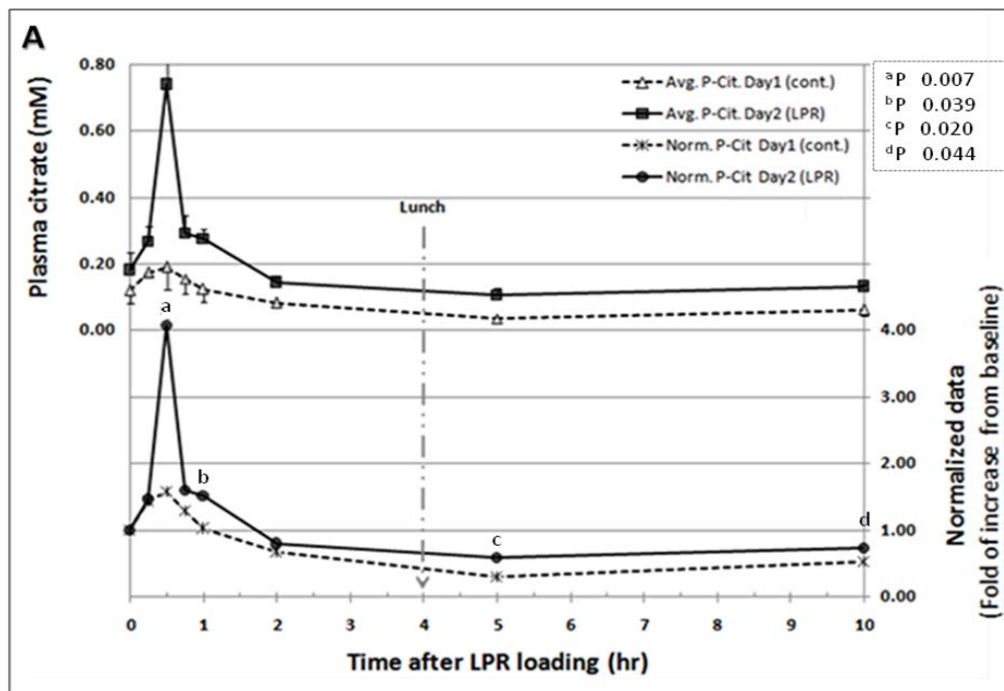
ค่าทั้งหมดนี้จะนำมาคำนวณ dose ที่เหมาะสมของ LPR ที่จะใช้ในผู้ป่วยจริงต่อไป ข้อมูลทั้งหมดจะได้รับการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย program SPSS version 17.0 และ Pharmacokinetics สำหรับการวิเคราะห์ Pharmacokinetics parameters

ผลการศึกษา Pharmacokinetic parameters ของ LPR

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณซีเทรตในเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี

ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณซีเทรตในเลือดและปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า โปรไฟล์ของระดับซีเทรตในเลือดของอาสาสมัคร ในวันที่ 1 (control day) และวันที่ 2 (LPR loading day) แตกต่างกันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.12 ± 0.05 และ 0.27 ± 0.20 mM ตามลำดับ (ภาพที่ 20A) โดยในวันที่ 2 ปริมาณของซีเทรตในเลือดของอาสาสมัครสูงสุดภายหลังจากได้รับ LPR 30 นาที และสูงกว่าในวันที่ 1 ณ เวลาเดียวกัน แต่ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลาเริ่มต้น (t_0 , ก่อนได้รับ LPR) ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน (t_i/t_0) พบว่า วันที่ 2 ระดับของซีเทรตในเลือดของอาสาสมัครเพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาที่ที่ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับ LPR ($P = 0.049$) และนาที่ที่ 30 ของวันที่ 1 ($P = 0.007$) ภายหลังครึ่งชั่วโมงหลังได้รับ LPR ระดับของซีเทรตในเลือดของอาสาสมัครลดลงตามลำดับที่ 45 นาที และชั่วโมงที่ 1, 2, 5 และ 10 โดยยังคงมีระดับของซีเทรตในเลือดสูงกว่าวันที่ 1 โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 1, 5 และ 10 ระดับของซีเทรตในเลือดในวันที่ 2 สูงกว่าวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.040, 0.020$ และ 0.044 ตามลำดับ) ดังภาพที่ 20A

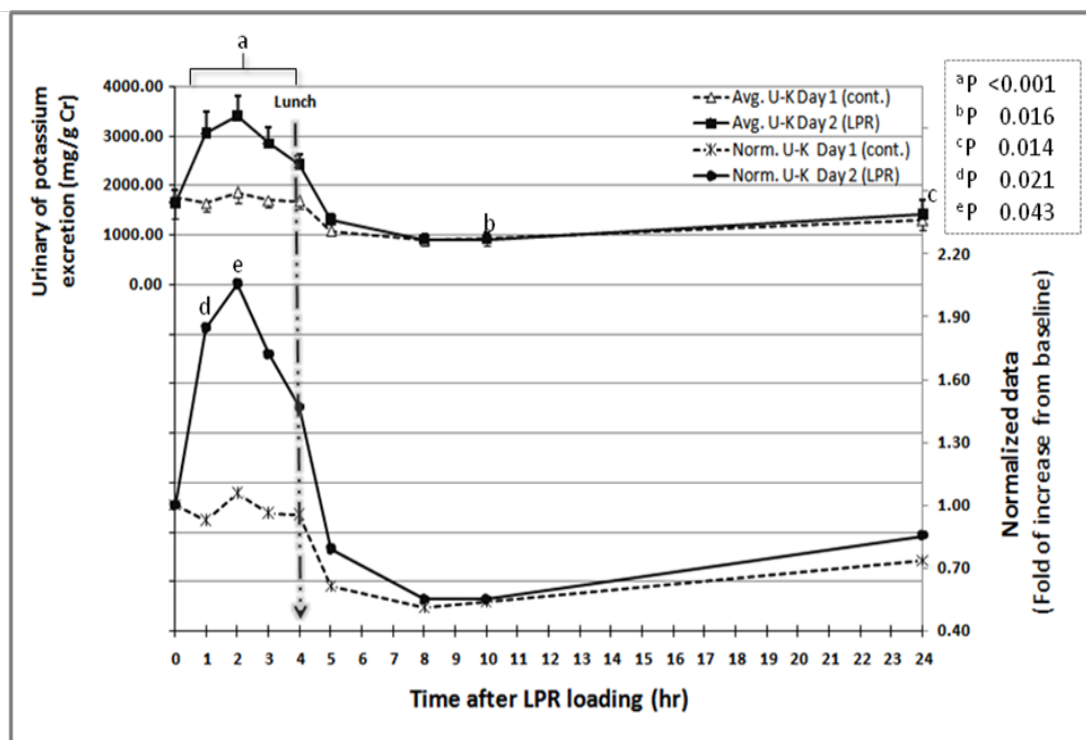
ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงซีเทรตในปัสสาวะ พบว่า โปรไฟล์ของระดับซีเทรตในปัสสาวะของอาสาสมัคร ในวันที่ 1 และวันที่ 2 แตกต่างกันเช่นเดียวกันกับระดับซีเทรตในเลือด (ภาพที่ 20B) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 868.4 ± 206.2 และ $1,032.9 \pm 306.4$ mg/g Cr ตามลำดับ ในวันที่ 2 ภายหลังจากได้รับ LPR ซีเทรตถูกขับออกมาในปัสสาวะสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 และเริ่มลดลงในชั่วโมงถัดไปตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับนาที่เริ่มต้น (t_0) และในวันที่ 2 ระดับซีเทรตในปัสสาวะในชั่วโมงที่ 1, 2, 3 และ 8 สูงกว่านาที่เริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001, 0.001, 0.039$, และ 0.028 ตามลำดับ) และเมื่อปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่า ในชั่วโมงที่ 1 ของวันที่ 2 มีระดับซีเทรตในปัสสาวะสูงกว่าวันที่ 1 ที่เวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.004$) (ภาพที่ 20B) สรุปผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการรับประทาน LPR สามารถเพิ่มระดับซีเทรตในเลือดสูงสุดที่นาที่ที่ 30 และขับออกในปัสสาวะสูงสุดในนาที่ที่ 60



ภาพที่ 20 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับซิเตรตในเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี A: ปริมาณของซิเตรตในเลือดของอาสาสมัครสูงสุดในนาที่ที่ 30 ภายหลังได้รับ LPR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.007$) เมื่อเปรียบเทียบกับในวันที่ 1 ณ เวลาเดียวกัน B: ระดับซิเตรตในปัสสาวะสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 หลังจากได้รับ LPR และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0)

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพแทสเซียมในปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี

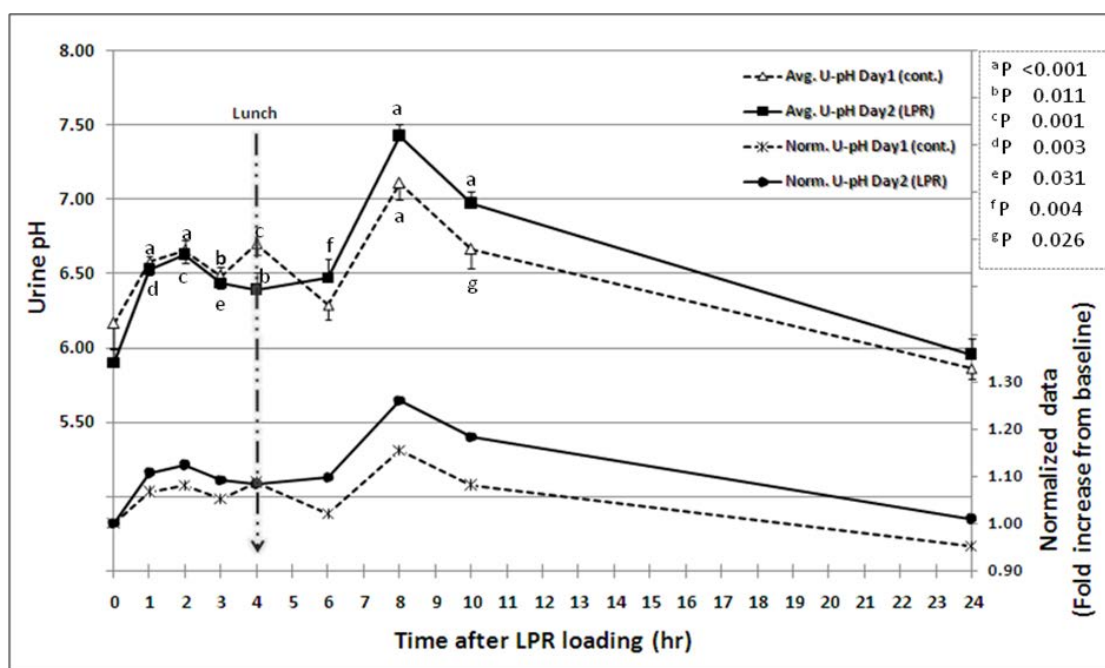
ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพแทสเซียมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ระดับของโพแทสเซียมในปัสสาวะของอาสาสมัครในวันที่ 2 แตกต่างอย่างเด่นชัดจากวันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1,431.8 \pm 377.3$ และ $1,995.8 \pm 955.4$ mg/g Cr ตามลำดับ หลังได้รับ LPR ในวันที่ 2 ระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 ซึ่งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับที่ t_0 ($P < 0.001$) (ภาพที่ 21) จากนั้นระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มลดลงตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่า หลังได้รับ LPR ระดับของโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเดียวกันในวันที่ 1 ($P = 0.021$ และ 0.043 ตามลำดับ)



ภาพที่ 21 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) ของวันที่ 2

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี

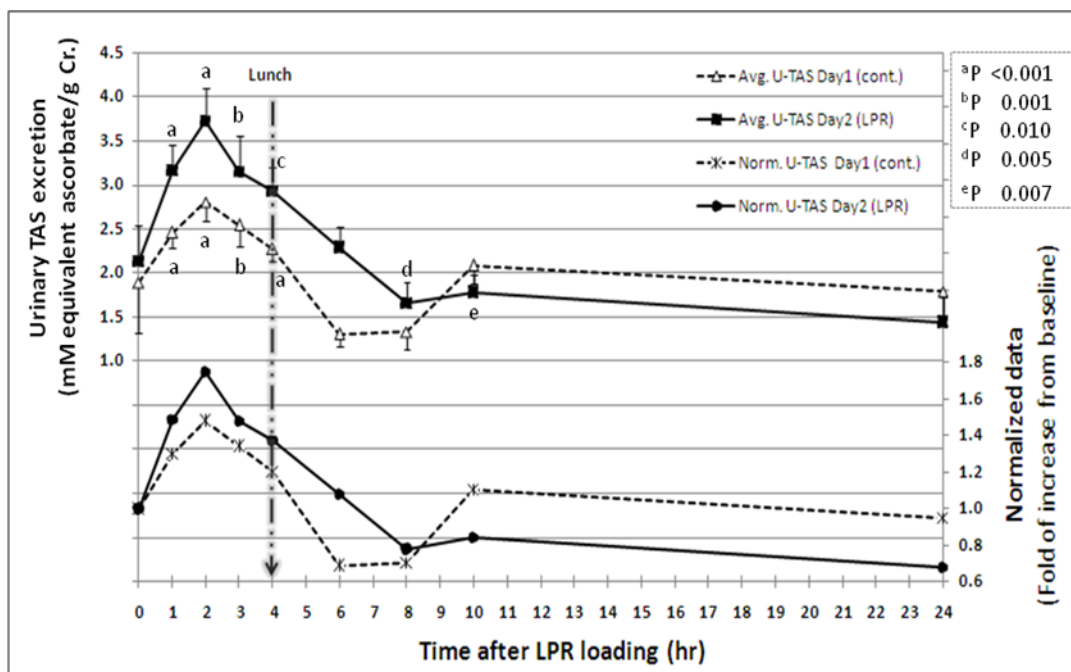
ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า โปรไฟล์ของค่า pH ของปัสสาวะระหว่างวันที่ 1 และวันที่ 2 ค่อนข้างใกล้เคียงกัน วันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยของ pH ในปัสสาวะเท่ากับ 6.50 ± 0.36 และวันที่ 2 เท่ากับ 6.52 ± 0.47 ในวันที่ 1 ระดับ pH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลาที่ 1, 2, 3, 8 และ 10 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) ($P = 0.003, 0.001, 0.031, <0.001$ และ 0.026 ตามลำดับ) และในวันที่ 2 ระดับของ pH เพิ่มขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกันในช่วงเวลาที่ 1, 2, 3, 5 และ 8 เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา t_0 ($P < 0.001, <0.001, 0.011, <0.001$ และ <0.001 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่าในวันที่ 2 ที่อาสาสมัครได้รับ LPR ค่า pH ของปัสสาวะมีแนวโน้มสูงกว่าวันที่ 1 ในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 22) แสดงให้เห็นว่าการรับประทาน LPR มีแนวโน้มที่จะเพิ่มค่า pH ของปัสสาวะ (urinary alkalinizing effect) ได้ ซึ่งเป็นผลดีต่อการป้องกันการเกิดนิ่ว



ภาพที่ 22 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ทั้งวันที่ 1 และวันที่ 2 ค่า pH ของปัสสาวะเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่ 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 10 ตามลำดับ และเริ่มลดลงหลังจาก 10 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) ของวันเดียวกัน เมื่อปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน (normalization) วันที่ 2 ที่ได้รับ LPR มีแนวโน้มที่จะเพิ่มค่า pH ของปัสสาวะได้สูงกว่าวันที่ 1 (control day)

การศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant status, TAS) ในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี

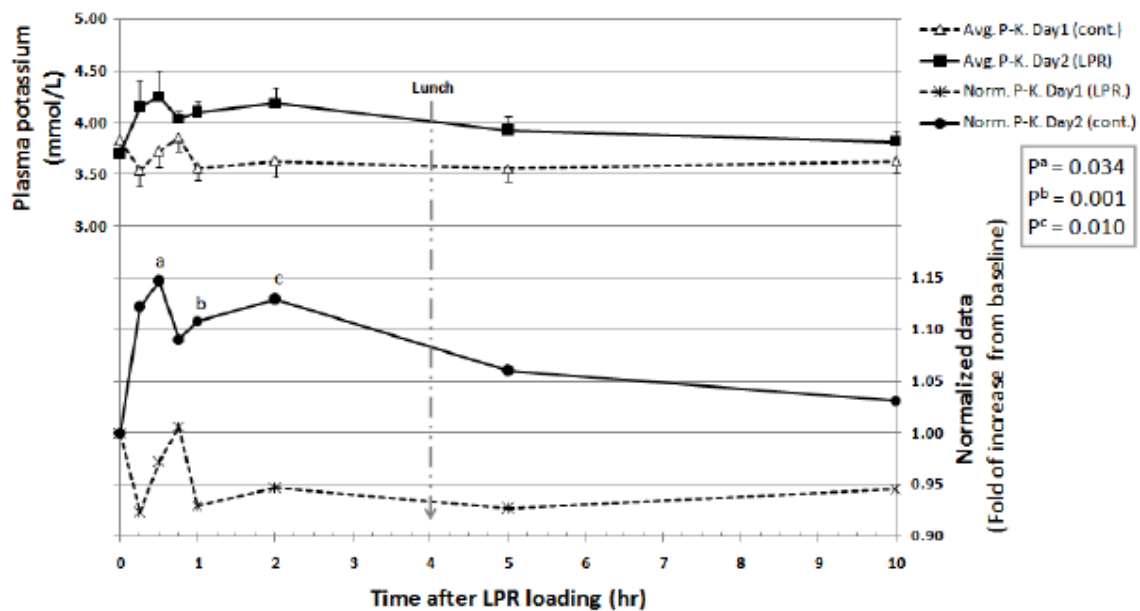
ผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า โปรไฟล์ของระดับ TAS ในปัสสาวะในของวันที่ 1 และวันที่ 2 แตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.05 ± 0.52 และ 2.47 ± 0.79 %/g Cr ตามลำดับ ในวันที่ 1 ระดับ TAS ในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 1 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (t_0) ($P < 0.001$) และเช่นเดียวกันในวันที่ 2 ระดับ TAS ในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา t_0 ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบโดยปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน พบว่า ระดับของ TAS ในวันที่ 2 ชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 มีแนวโน้มที่สูงกว่าในวันที่ 1 ช่วงเวลาเดียวกัน (ภาพที่ 23)



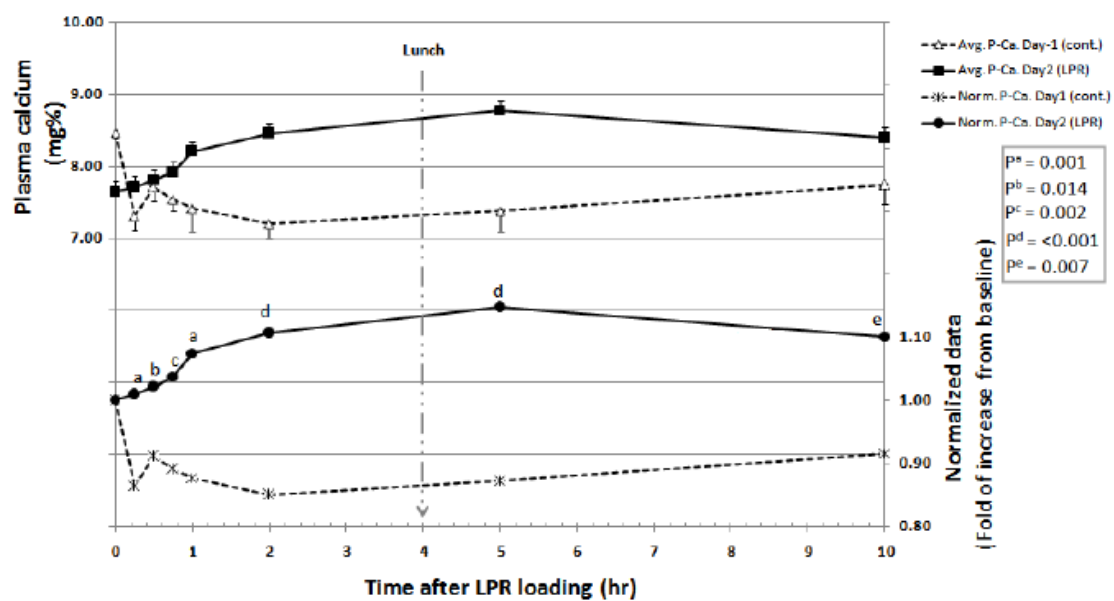
ภาพที่ 23 แสดงผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของ TAS ในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ทั้งวันที่ 1 และ 2 ระดับ TAS เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชั่วโมงที่ 1 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (t_0) ($P < 0.001$) เมื่อปรับค่าที่เวลา t_0 ของทั้ง 2 วันให้เริ่มต้นเท่ากัน (normalization) พบว่า ระดับ TAS ในปัสสาวะของอาสาสมัครในวันที่ 2 ในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังได้รับ LPR สูงกว่าในช่วงเวลาเดียวกันของวันที่ 1

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังศึกษาผลของการได้รับ LPR ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารอิเล็กโทรไลต์อื่นๆ ด้วย ได้แก่ ระดับโพแทสเซียมในพลาสมา (ภาพที่ 24) ระดับแคลเซียมในพลาสมา (ภาพที่ 25) ระดับแคลเซียมในปัสสาวะ (ภาพที่ 26) ระดับโซเดียมในพลาสมา (ภาพที่ 27) ระดับโซเดียมในปัสสาวะ (ภาพที่ 28) และระดับของแมกนีเซียมในปัสสาวะ (ภาพที่ 29) ซึ่งผลการศึกษพบว่า สารอิเล็กโทรไลต์ทุกตัวดังกล่าว เพิ่มขึ้นภายหลังได้รับ LPR แต่ไม่สูงเกินระดับปกติของร่างกาย

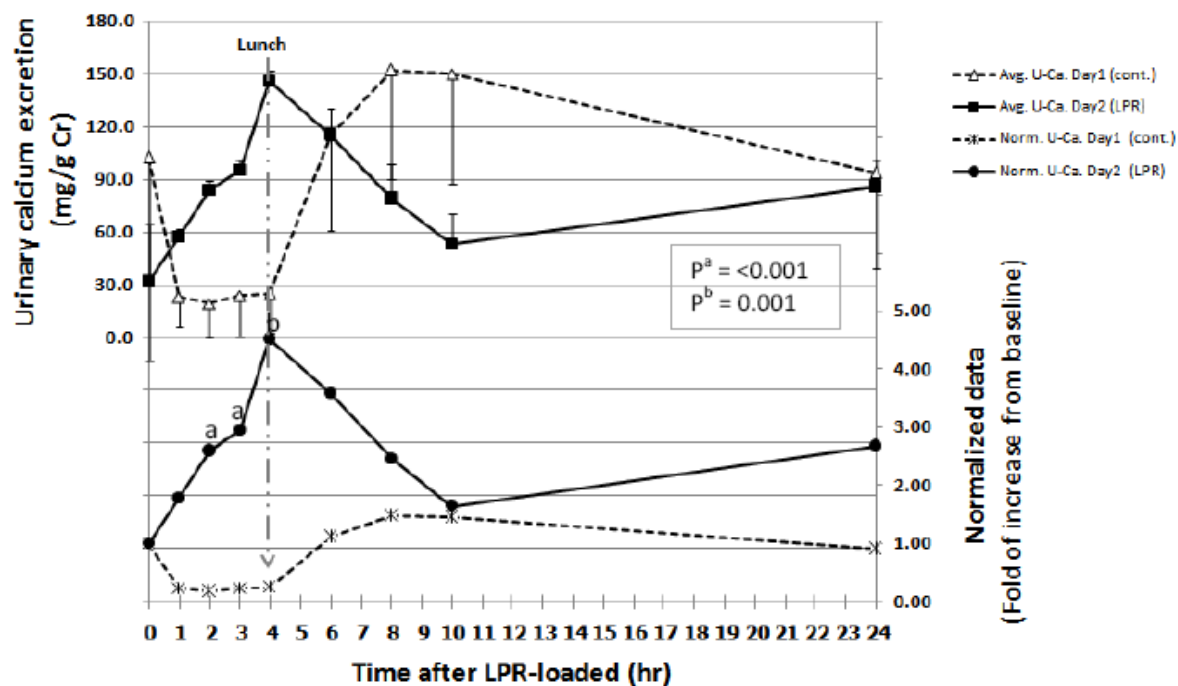
ผลสรุปของค่าเภสัชจลนศาสตร์ของสูตรมะนาวผงที่ได้จากการทดลองในคนปกติสุขภาพดี 13 ราย แสดงในตารางที่ 11 ระดับซีเทรตในปัสสาวะ และ bioviability ของซีเทรตในร่างกายในวันที่ได้รับ LPR สูงกว่าวันที่ไม่ได้รับ LPR อย่างมีนัยสำคัญ และสถิติทดสอบมี power of test > 95%



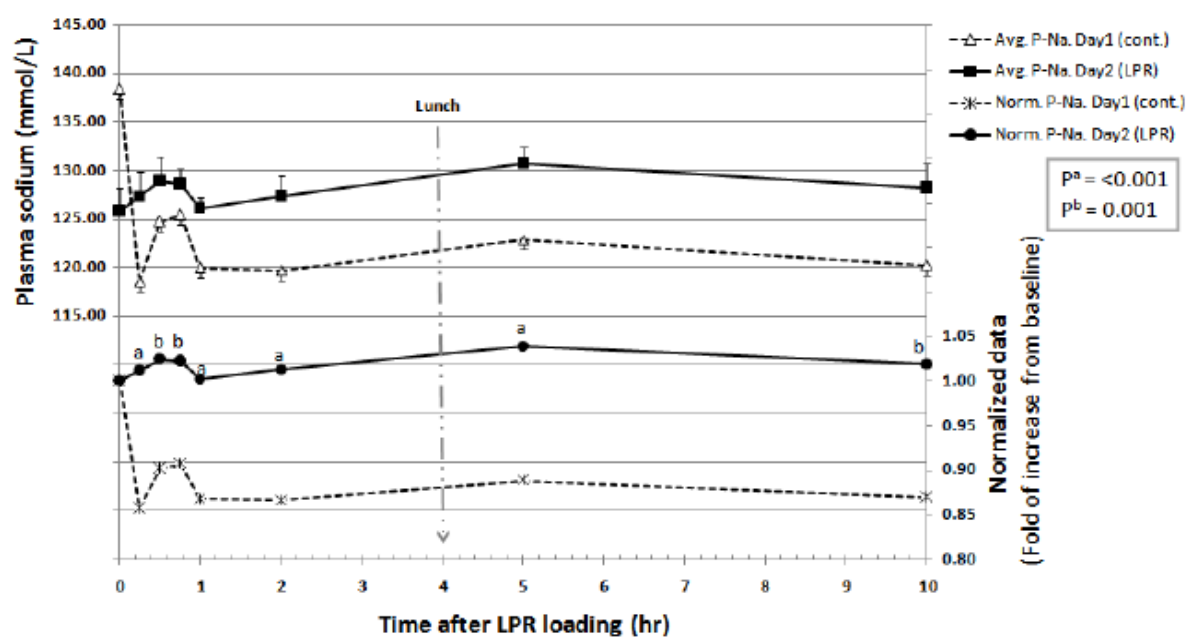
ภาพที่ 24 Profile of plasma potassium after oral LPR administration



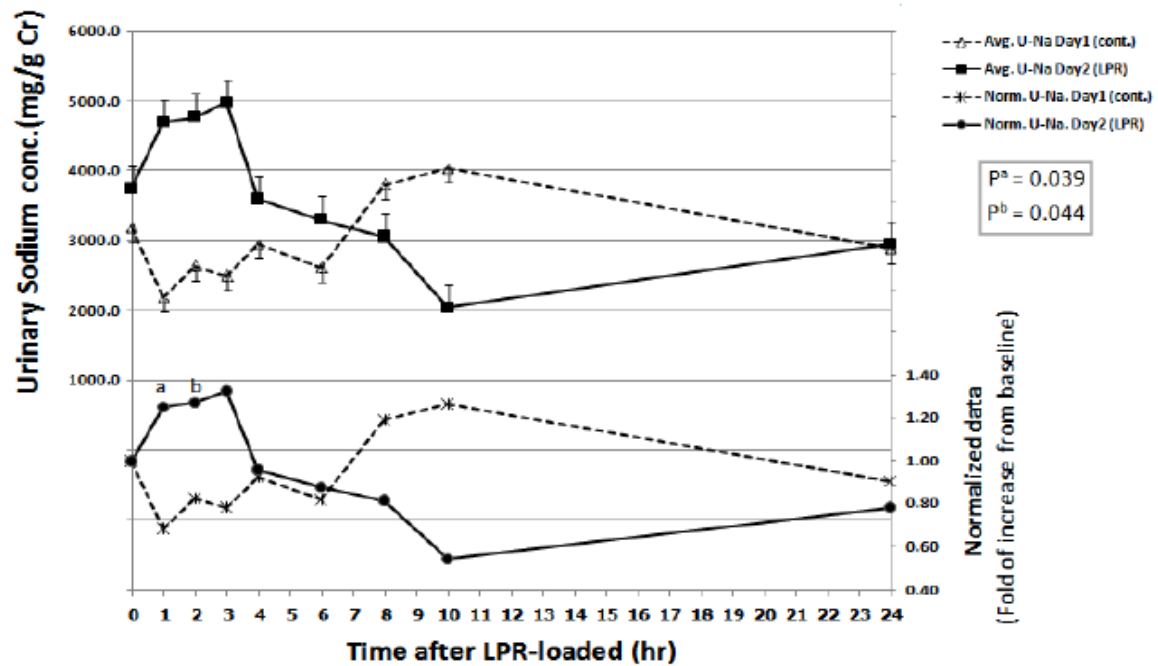
ภาพที่ 25 Profile of plasma calcium after oral LPR administration



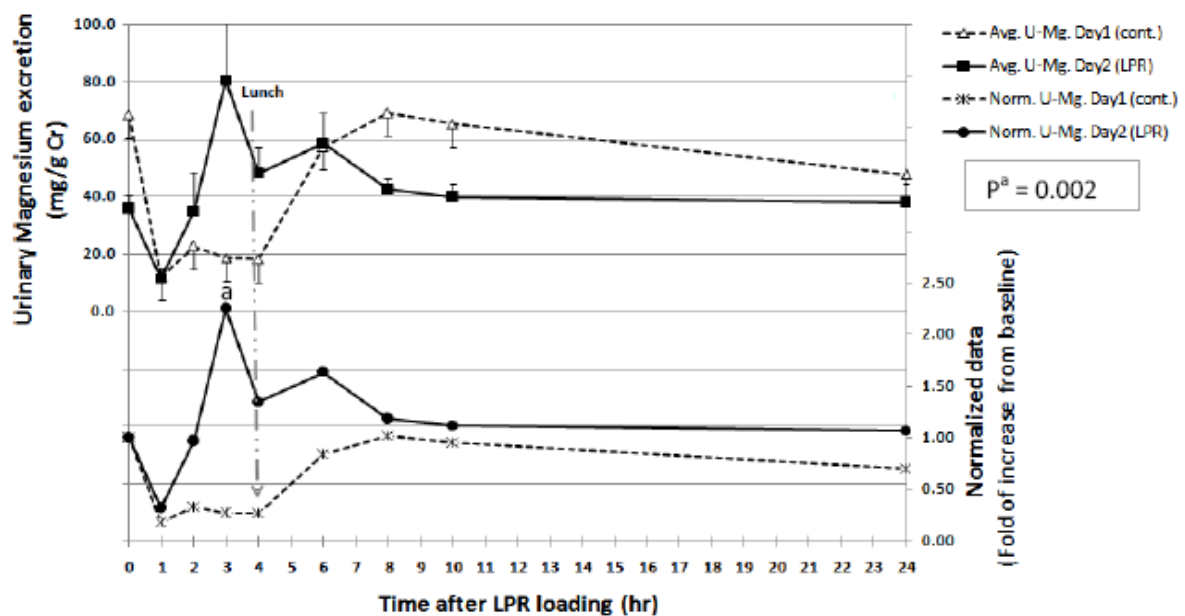
ภาพที่ 26 Profile of urinary calcium after oral LPR administration



ภาพที่ 27 Profile of plasma sodium after oral LPR administration



ภาพที่ 28 Profile of urinary sodium after oral LPR administration



ภาพที่ 29 Profile of urinary magnesium after oral LPR administration

ตารางที่ 11 สรุปผลค่าเภสัชจลนศาสตร์ของสูตรมะนาวผง (na: not applicable)

Parameters		Baseline	LPR	P values	Actual power
Plasma citrate					
	C _{max}	1.18 ± 0.06	1.55 ± 0.33	0.29	
	T _{max}	0.58 ± 0.09	0.92 ± 0.34	0.29	
	K _{el}	0.0073 ± 0.0011	0.0055 ± 0.0009	0.09	
	Half-life	357.54 ± 205.98	444.21 ± 241.99	0.37	
	AUC _{0→t}	9.59 ± 0.31	9.98 ± 0.36	0.51	
	AUC _{0→∞}	476.50 ± 263.68	675.83 ± 375.79	0.38	
Urinary citrate					
	C _{max}	2.62 ± 0.77	3.65 ± 0.98	0.04	0.952
	T _{max}	4.15 ± 1.00	7.31 ± 2.27	0.12	
	K _{el}	0.0816 ± 0.0147	0.0534 ± 0.0071	0.67	
	Half-life	18.02 ± 7.16	23.74 ± 8.27	0.91	
	AUC _{0→t}	24.83 ± 7.49	44.44 ± 11.63	0.03	0.959
	AUC _{0→∞}	38.61 ± 8.95	56.97 ± 13.69	0.19	
Urinary potassium					
	C _{max}	1.69 ± 0.34	2.23 ± 0.45	0.61	
	T _{max}	6.77 ± 2.80	9.23 ± 2.90	0.57	
	K _{el}	0.1340 ± 0.0339	0.0217 ± 0.0010	na	
	Half-life	42.83 ± 71.54	32.48 ± 1.54	na	
	AUC _{0→t}	20.71 ± 5.91	22.04 ± 3.67	0.87	
	AUC _{0→∞}	33.11 ± 12.77	29.24 ± 5.33	na	
Urinary TAS					
	C _{max}	3.29 ± 0.56	2.69 ± 0.49	0.48	
	T _{max}	2.23 ± 0.70	3.23 ± 0.47	0.29	
	K _{el}	0.0190 ± 0.0060	0.0750 ± 0.0443	0.03	0.965
	Half-life	90.33 ± 24.31	57.89 ± 15.20	0.51	
	AUC _{0→t}	39.37 ± 7.04	35.17 ± 7.60	0.73	
	AUC _{0→∞}	233.87 ± 68.69	101.24 ± 12.55	0.21	

การประเมินความปลอดภัยของการใช้ LPR

ตลอดระยะเวลาที่เข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครทุกคนไม่มีอาการผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น การถอนตัวของอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัยนั้นเกิดเนื่องจากเหตุผลส่วนตัวของอาสาสมัคร และเกิดขึ้นก่อนที่จะได้รับ LPR

ดังนั้น สรุปได้ว่า การได้รับ LPR ทางการกิน (oral route) ขนาด 1 ซองต่อวัน (ละลายน้ำ 200 มล.) มีความปลอดภัยและไม่พบผลข้างเคียงใดๆ เกิดขึ้นในอาสาสมัครคนปกติสุขภาพดี

และจากผลการทดลองทางคลินิกเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย (Tosukhowong et al. 2008) ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต (n=13) เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า LPR มีฤทธิ์ alkalinizing และ citraturic actions เทียบเท่ากับยาโพแทสเซียมซิเตรต และมีข้อดีที่เหนือกว่าคือ LPR สามารถลดระดับความเครียดจากออกซิเดชันและลดระดับการทำลายของเซลล์บุท่อไต และยังช่วยให้ไตทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งคณะวิจัยเชื่อว่าจะเป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระใน LPR ข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า LPR มีศักยภาพที่จะนำมาวิจัยและพัฒนาให้เป็นยารักษาโรคนิ่วไตได้ ที่สำคัญในระยะเวลา 3 เดือนที่ศึกษาไม่พบผลข้างเคียงใดๆ แสดงว่า LPR น่าจะปลอดภัยสำหรับการบริโภคระยะยาว

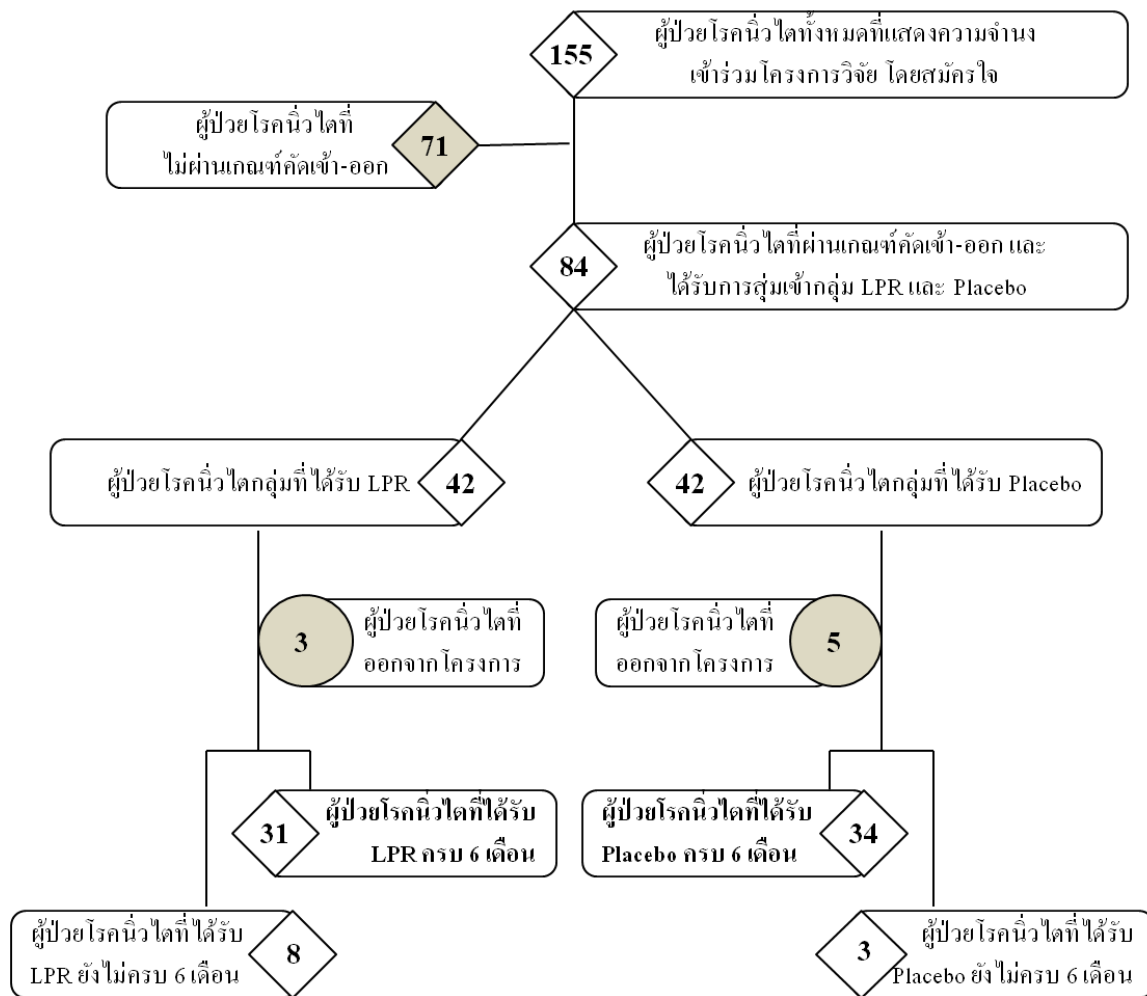
สรุปความโดดเด่นของสูตรมะนาวผง คือ มีองค์ประกอบทางยาที่น่าจะสามารถป้องกันหรือยับยั้งการเกิดนิ่วซ้ำได้

ผลการวิจัยโครงการระยะที่ 2 (Clinical phase 2 trial)

ประชากรตัวอย่างผู้ป่วยโรคหัวใจที่เข้าร่วมโครงการวิจัย Phase 2

มีผู้ป่วยโรคหัวใจที่ได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่ 19 พฤศจิกายน 2554 ถึงวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2556 และยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ รวมทั้งสิ้น จำนวน 155 ราย พบว่า 29 ราย จำเป็นต้องคัดออกเนื่องจากยังคงมีนิ่วขนาดใหญ่กว่า 4 มิลลิเมตรเหลืออยู่หลังได้รับการรักษาทางสัลยกรรม ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคไตวายเรื้อรังโดยมีค่า plasma creatinine สูงกว่า 2.0 mg% 1 ราย เป็นโรคไตแต่กำเนิด 1 ราย เป็นโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ 1 ราย เป็นโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะชนิดรุนแรง 1 ราย จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการตัดไต 5 ราย ถึงแก่กรรม 2 ราย เป็นผู้ป่วยที่ไม่สะดวกที่จะติดตามการรักษา 14 ราย และสาเหตุอื่นๆ อีก ทำให้มีผู้เข้าร่วมโครงการที่จำเป็นต้องออกจากโครงการก่อนการสุ่ม ได้รับสารที่ศึกษา รวมทั้งสิ้น 71 ราย จึงคงเหลือผู้ป่วยโรคหัวใจที่เข้าร่วมโครงการวิจัย จำนวนทั้งสิ้น 84 ราย (ร้อยละ 54.19) (ภาพที่ 30)

ภายหลังการรักษาโรคหัวใจ ผู้เข้าร่วมโครงการทั้ง 84 ราย ได้รับการสุ่มเข้าสู่กลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผง (LPR group) จำนวน 42 ราย และกลุ่มเปรียบเทียบได้รับยาหลอก (Placebo group) จำนวน 42 ราย ซึ่งในจำนวนนี้ได้รับการติดตามการรักษาจนครบ 6 เดือนแล้วในวันที่ 22 ธันวาคม 2556 ในแต่ละกลุ่มเป็นจำนวน 31 และ 34 รายตามลำดับ และมีผู้เข้าร่วมโครงการที่ขอยุติการเข้าร่วมโครงการ (dropout) จำนวน 8 ราย (ร้อยละ 10) โดยเป็นผู้ป่วยในกลุ่ม LPR 3 ราย และกลุ่ม Placebo 5 ราย สาเหตุหลักของการขอยุติการเข้าร่วมโครงการ มาจากไม่สามารถกลับมาติดตามการรักษาได้ และเหลือผู้เข้าร่วมโครงการที่รอดูติดตามผลการรักษาให้ครบ 6 เดือน อยู่ จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 13.10) โดยเป็นผู้ป่วยในกลุ่ม LPR 8 ราย และกลุ่ม Placebo 3 ราย (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 แผนภาพแสดงจำนวนอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการในแต่ละช่วงเวลาตั้งแต่การเริ่มรวบรวมกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย จนถึงการศึกษาติดตามผลการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงและยาหลอก เป็นเวลา 6 เดือน

ตารางที่ 12 จะพบว่าอาสาสมัครจำนวน 84 ราย พบว่า ในกลุ่มผู้ได้รับสูตรมะนาวผง เป็นเพศชาย จำนวน 58.1% และหญิง 41.9% โดยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 44.4 ± 9.0 ปี และมีค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยเป็น 24.0 ± 4.5 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ในขณะที่กลุ่มเปรียบเทียบ เป็นเพศชายจำนวน 53.5% และหญิง 46.5% โดยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 47.8 ± 10.4 ปี และมีค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยเป็น 23.3 ± 3.3 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันในทางสถิติระหว่างทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะการกระจายของประชากรของอาสาสมัครในกลุ่มทดลอง (LPR) และกลุ่มเปรียบเทียบ (Placebo) ทั้งหมด 84 คน

Characteristics	LPR	Placebo	P
จำนวน (คน)	42	42	
เพศชาย (%)	58.1%	53.5%	0.366
อายุ (ปี)	44.4±9.0	47.8±10.4	0.154
BMI (Kg/m ²)	24.0±4.5	23.3±3.3	0.366
นิ่วไต/นิ่วท่อไต	62.8%	62.8%	
องค์ประกอบของนิ่ว			
isolated CaOx stone	15	12	
mixed CaOx and CaP stone	4	6	
mixed CaP, CaCO ₃ and struvite stone	4	4	
mixed calcium and uric stone	5	4	
isolated uric acid stone	2	1	

CaOx: calcium oxalate, CaP: calcium phosphate, CaCO₃: calcium carbonate. Isolated means pure component. BMI: body mass index.

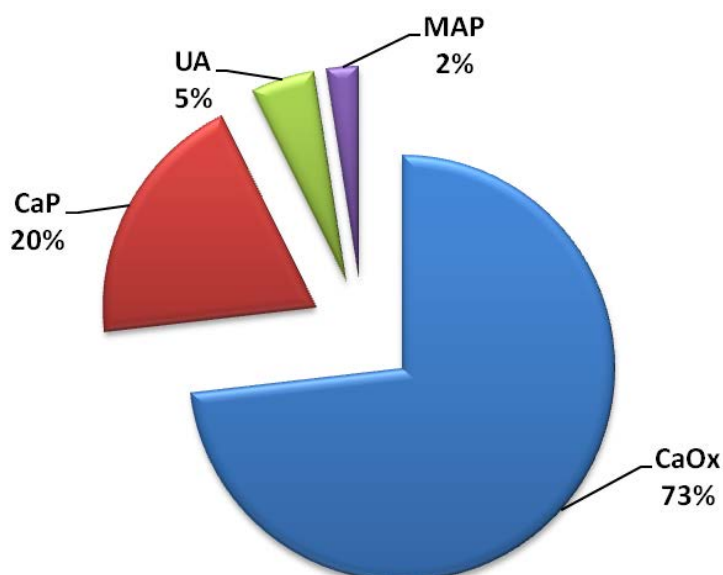
ในอาสาสมัครทั้ง 84 ราย มีผู้ที่เข้าร่วมโครงการต่อเนื่องครบ 6 เดือน เป็นจำนวนทั้งสิ้น 65 ราย โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผง 31 ราย และกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับยาหลอก 34 ราย พบว่า ในกลุ่มผู้ได้รับสูตรมะนาวผง เป็นเพศชาย จำนวน 14 ราย (ร้อยละ 45.16) เพศหญิง จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 54.84) โดยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 47.35 ± 11.19 ปี และมีค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยเป็น 23.08 ± 3.43 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ในขณะที่กลุ่มเปรียบเทียบ เป็นเพศชาย จำนวน 19 ราย (ร้อยละ 55.88) เพศหญิง จำนวน 15 ราย (ร้อยละ 44.12) โดยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 45.79 ± 9.86 ปี และมีค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยเป็น 23.01 ± 3.81 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติระหว่างทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะการกระจายของประชากรของอาสาสมัครในกลุ่มทดลอง (LPR) และกลุ่มเปรียบเทียบ (Placebo) ซึ่งเข้าร่วมโครงการจนครบ 6 เดือนแล้ว ทั้งหมด 65 ราย

Characteristics	LPR	Placebo	P
จำนวน (คน)	31	34	
เพศชาย (%)	45.16%	55.88%	0.684
อายุ (ปี)	47.35 ± 11.19	45.79 ± 9.86	0.052
BMI (Kg/m ²)	23.08 ± 3.43	23.01 ± 3.81	0.648
องค์ประกอบของนิ่ว			
CaOx stone	13	17	
CaP stone	5	3	
UA stone	0	2	
MAP	0	1	

CaOx: calcium oxalate, CaP: calcium phosphate, UA: uric acid, MAP: magnesium ammonium phosphate, BMI: body mass index.

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของนิ่วได้พบในกลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และยาหลอก ทั้ง 65 ราย พบว่า นิ่วแคลเซียมออกซาเลตเป็นนิ่วที่พบบ่อยที่สุด (ร้อยละ 70) ตามมาคือนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต(ร้อยละ 20) นิ่วกรดยูริก และนิ่วติดเชื้อแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต พบได้ ร้อยละ 5 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 ร้อยละของนิ่วแต่ละชนิดในกลุ่มประชากรศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม CaOx: calcium oxalate, CaP: calcium phosphate, UA: uric acid, MAP: magnesium ammonium phosphate.

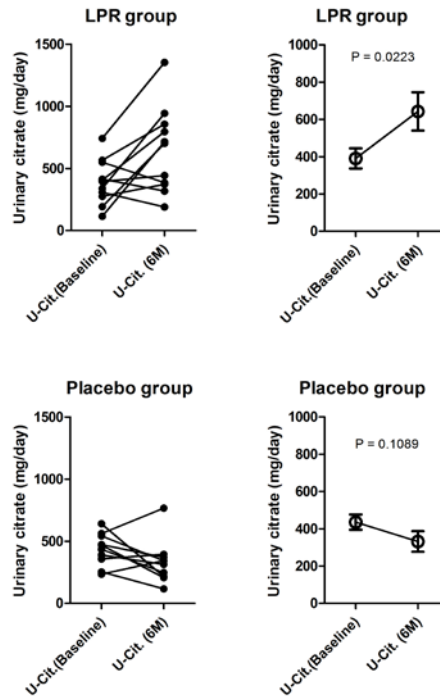
**ผลการวิเคราะห์สารตัวอย่างเลือด และปัสสาวะ ของผู้ป่วยที่ได้รับสูตรมะนาวผงหรือยาหลอกครบ 6 เดือน
ผลของการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงต่อสารยับยั้งนิวโรในปัสสาวะ**

สารยับยั้งนิวโรที่สำคัญในปัสสาวะ คือ ซิเทรต โปแทสเซียม และ แมกนีเซียม ผลการศึกษานี้พบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับสูตรมะนาวผง (LPR group) เป็นเวลา 6 เดือน มีระดับซิเทรตในปัสสาวะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ในกลุ่มยาหลอก (Placebo group) ระดับซิเทรตในปัสสาวะสูงไม่แตกต่างจากก่อนได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 14) (ภาพที่ 32) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับ โปแทสเซียม (ภาพที่ 33) และแมกนีเซียม (ภาพที่ 34) ในปัสสาวะระหว่างก่อนและหลังการรักษาในทั้ง 2 กลุ่ม ตารางที่ 12 แสดงสรุปผลการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิวโรในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับสูตรมะนาวผงหรือยาหลอกครบ 6 เดือน

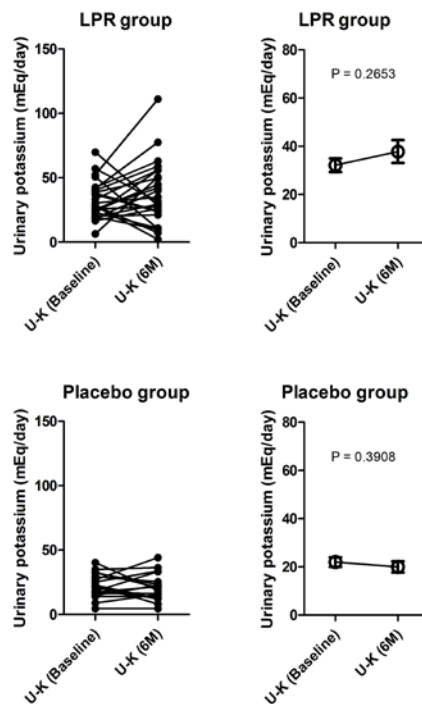
ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับสูตรมะนาวผงหรือยาหลอกรับ 6 เดือน

Urine parameters	LPR group			Placebo group		
	Baseline	6-months	P value	Baseline	6-months	P value
Stone inhibitors						
Citrate (mg/day)	390.8 ± 178.20	643.0 ± 340.90	0.0223*	436.0 ± 130.70	332.1 ± 175.40	0.1089
Potassium (mEq/day)	32.17 ± 14.29	37.79 ± 24.22	0.2653	22.00 ± 8.93	19.99 ± 10.38	0.3908
Magnesium (mg/day)	48.53 ± 34.22	40.63 ± 37.96	0.1579	54.48 ± 32.54	58.23 ± 106.40	0.8407
Stone promoters						
Calcium (mg/day)	10.50 ± 8.33	6.221 ± 5.71	0.0058 *	10.40 ± 7.62	11.34 ± 17.94	0.8417
Oxalate (mg/day)	48.28 ± 34.11	26.32 ± 24.83	0.0159*	32.12 ± 22.56	19.50 ± 21.99	0.0213*
Phosphate (mg/day)	534.3 ± 284.10	464.7 ± 278.10	0.2907	409.6 ± 188.80	437.7 ± 241.80	0.5357
Uric acid (mg/day)	617.7 ± 402.60	321.6 ± 233.00	0.0008*	590.1 ± 332.00	235.3 ± 203.30	0.0008*
Others						
Volume (L)	2.112 ± 0.92	1.989 ± 1.30	0.4940	1.647 ± 0.84	1.375 ± 0.86	0.0256*
Creatinine (mg/day)	2074 ± 1582.00	1117 ± 581.10	0.0073*	1406 ± 1028.00	986.2 ± 374.00	0.0850
pH	6.591 ± 1.03	7.178 ± 1.20	0.0261*	6.382 ± 0.59	6.838 ± 1.26	0.1223
Sodium (mEq/day)	140.0 ± 76.66	123.7 ± 75.54	0.2783	110.6 ± 75.41	97.06 ± 63.40	0.4648
Chloride (mEq/day)	132.8 ± 56.49	124.1 ± 76.05	0.5109	109.3 ± 69.57	102.7 ± 61.76	0.7023

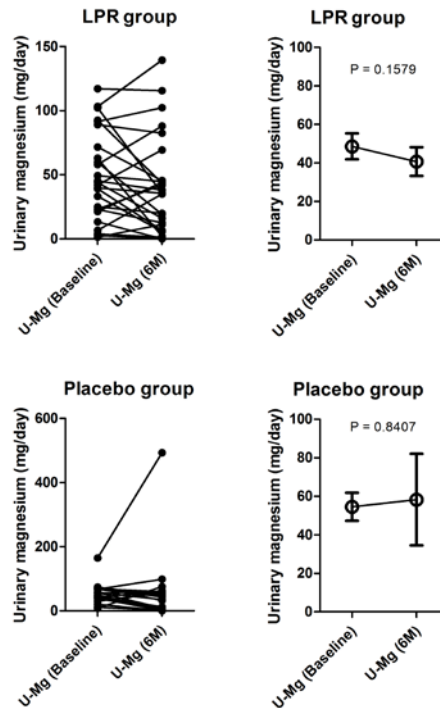
Data presented as mean ± SD.



ภาพที่ 32 ระดับซิเตรตในปัสสาวะ (U-Cit.) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



ภาพที่ 33 ระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะ (U-K) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



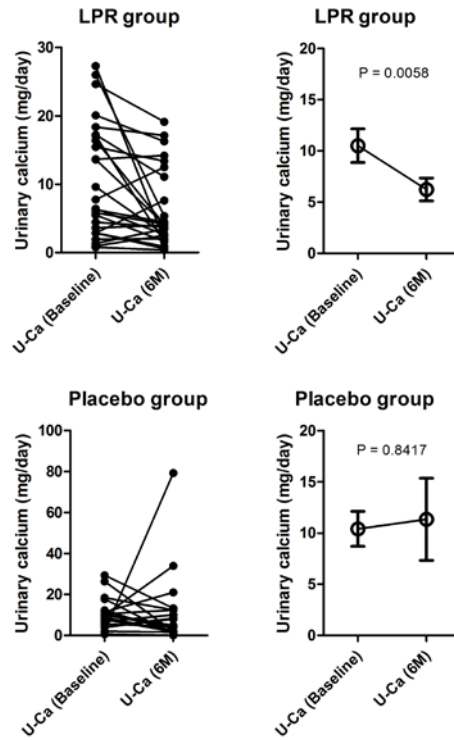
ภาพที่ 34 ระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะ (U-Mg) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)

ผลของการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงต่อสารก่อนิ่วในปัสสาวะ

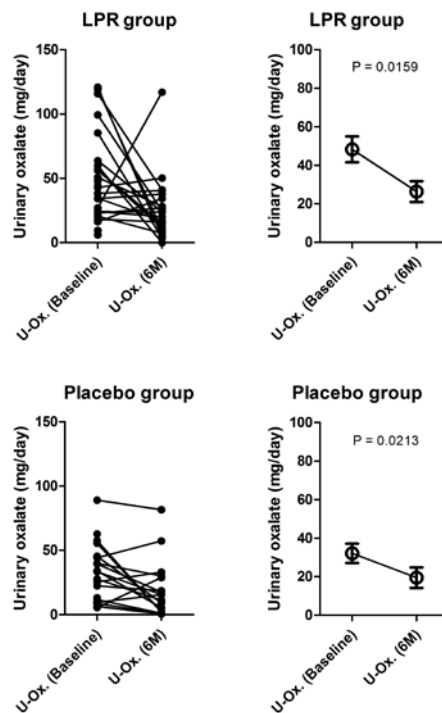
เมื่อวิเคราะห์ระดับสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต และกรดยูริก พบว่า ระดับของแคลเซียมในปัสสาวะของกลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผงลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ในกลุ่มที่ได้รับยาหลอกไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 12) (ภาพที่ 35) ระดับออกซาเลตในปัสสาวะ ภายหลังการรักษาทั้งในกลุ่มสูตรมะนาวผงและยาหลอก ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนการรักษา (ภาพที่ 36) ระดับฟอสเฟตในปัสสาวะในทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการรักษา (ภาพที่ 37) ขณะที่ระดับกรดยูริกในปัสสาวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการรักษาทั้งในกลุ่มยาหลอกและกลุ่มสูตรมะนาวผง (ภาพที่ 38)

ผลของการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงต่อปริมาตรปัสสาวะ ความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะ และระดับโซเดียม และคลอไรด์ในปัสสาวะ

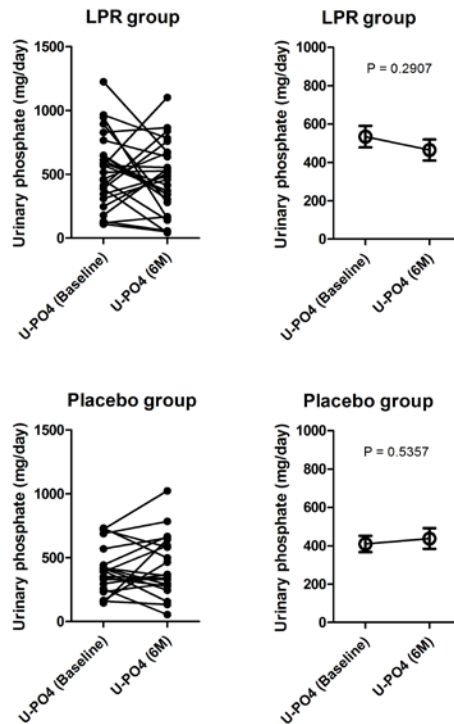
ปริมาตรปัสสาวะในกลุ่มยาหลอกลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการรักษา ขณะที่ในกลุ่มสูตรมะนาวผงไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 39) ค่า pH ในปัสสาวะ ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงสูงขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนการรักษา แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มยาหลอก (ภาพที่ 40) ระดับโซเดียม (ภาพที่ 41) และคลอไรด์ (ภาพที่ 42) ในปัสสาวะก่อนและหลังการรักษาไม่เปลี่ยนแปลงในทั้ง 2 กลุ่ม



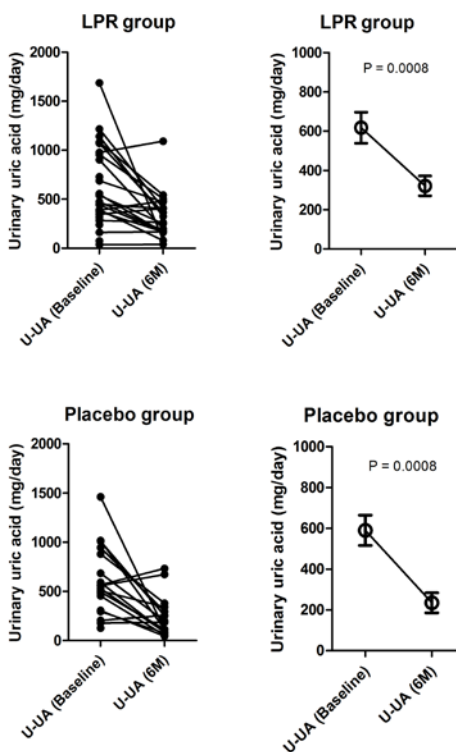
ภาพที่ 35 ระดับแคลเซียมในปัสสาวะ (U-Ca) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



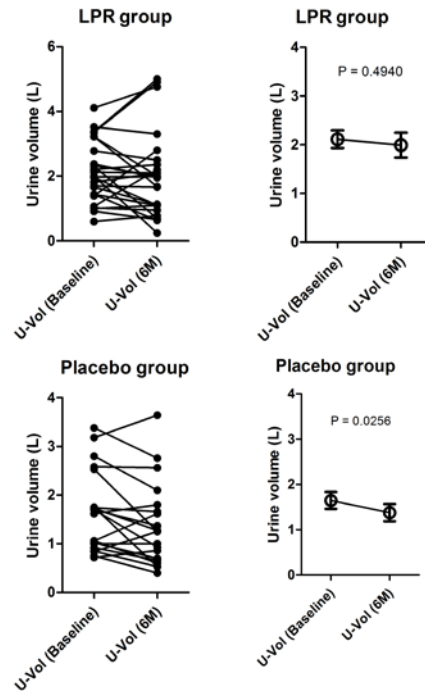
ภาพที่ 36 ระดับออกซาลตในปัสสาวะ (U-Ox) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



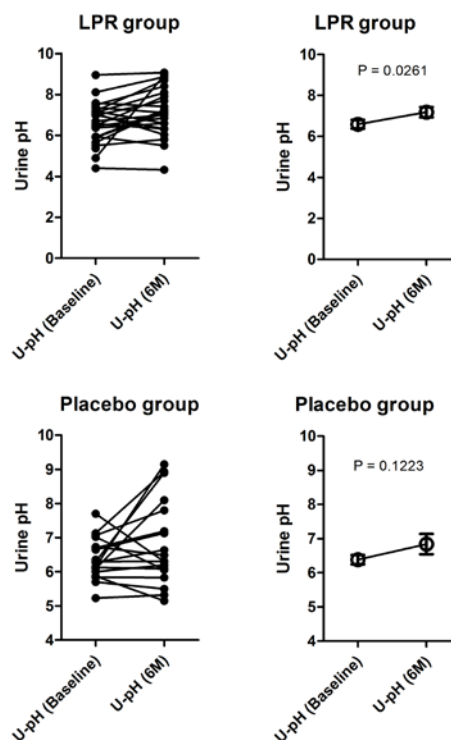
ภาพที่ 37 ระดับฟอสเฟตในปัสสาวะ (U-PO₄) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



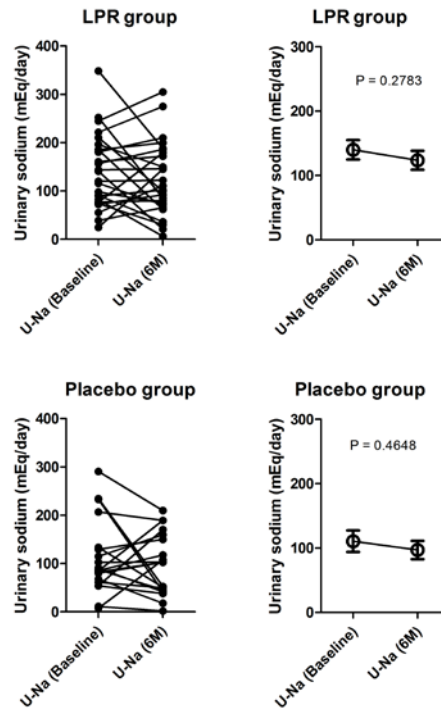
ภาพที่ 38 ระดับกรดยูริกในปัสสาวะ (U-UA) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



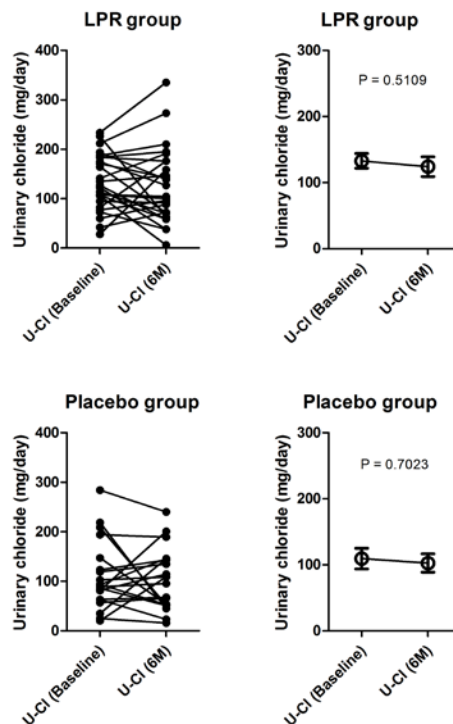
ภาพที่ 39 ปริมาตรปัสสาวะ (U-Vol) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



ภาพที่ 40 ระดับความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะ (U-pH) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



ภาพที่ 41 ระดับโซเดียมในปัสสาวะ (U-Na) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)



ภาพที่ 42 ระดับคลอไรด์ในปัสสาวะ (U-Cl) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)

ผลของการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress)

กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับสูตรมะนาวผง และกลุ่มที่ได้รับยาหลอก มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะ (urinary total antioxidant status, U-TAS) สูงวก่อก่อนได้รับสูตรมะนาวผงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าระดับสารต้านอนุมูลอิสระรวมในพลาสมา (plasma total antioxidant status, P-TAS) เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับสูตรมะนาวผง แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าโปรตีนที่เกิดจากออกซิเดชันในพลาสมา (plasma protein carbonyl, P-Protein carb.) ลดลงวก่อก่อนได้รับสูตรมะนาวผงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงข้ามพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอก มีปริมาณ P-Protein carb. ลดลงแต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับมะนาวผงมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันลดลงมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอก ดังตารางที่ 15

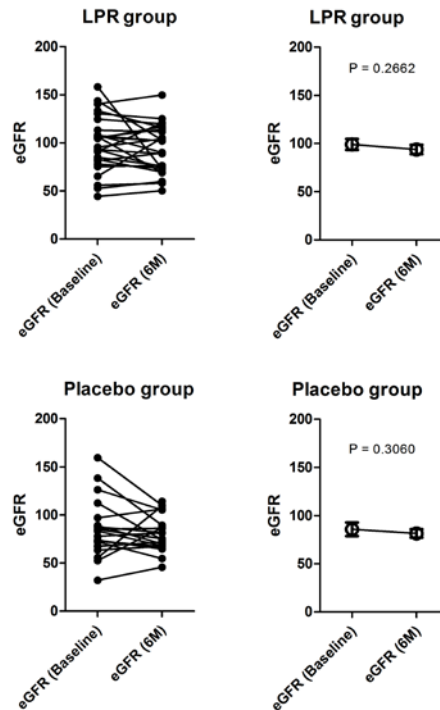
ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ oxidative stress markers ในพลาสมา และปัสสาวะ ของผู้ป่วยโรคนี้ไตและกลุ่มควบคุม ก่อนและหลังได้รับมะนาวผง 6 เดือน

Parameters	LPR group			Placebo group		
	Baseline	6-months	P	Baseline	6-months	P
U-TAS (g/g Cr.)	0.77±0.53	1.66±1.52	0.030	0.78±0.31	1.15±0.58	0.004
P-TAS (mM)	0.77±0.27	0.86±0.29	0.368	0.89±0.16	0.92±0.20	0.529
P-Protein carb. (nmol/ml)	5.89±3.53	3.88±1.63	0.006	4.53±4.36	3.57±1.17	0.283

U-TAS: urinary total antioxidant status, P-TAS: plasma total antioxidant status, P-Protein carb.: plasma protein carbonyl,

ผลของการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงต่อการทำงานของไต

การศึกษานี้คำนวณค่า estimate glomerular filtration rate (eGFR) เพื่อเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไต พบว่า ค่า eGFR ภายหลังการรักษาทั้งในกลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาว (99.03 ± 28.71 vs. 93.76 ± 24.59 mL/min, P = 0.2662) และกลุ่มยาหลอก (85.83 ± 30.70 vs. 81.43 ± 19.37 mL/min, P = 0.3060) ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับก่อนการรักษา (ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 อัตราการกรองที่ไต (eGFR) เปรียบเทียบระหว่างก่อน (Baseline) และ 6 เดือน (6M) ภายหลังการได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) หรือยาหลอก (Placebo)

จากผลงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า การได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงเป็นเวลา 6 เดือน สามารถช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วซ้ำได้ดังนี้

1. เพิ่มระดับซิเตรตในปัสสาวะ (citraturoic action)
2. เพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ (alkalinizing action)
3. ลดระดับการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (antioxidative effect)

ผลการประเมินการสัมภาษณ์คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

(Evaluation of quality of life questionnaire in patients with kidney stones)

ตอนที่ 1 ผลการสัมภาษณ์ผู้ป่วยโรคนิ่วไตเกี่ยวกับอาการและความผิดปกติที่เกิดขึ้น ในระบบทางเดิน

ปัสสาวะ (n = 69)

1.1 ก่อนมาพบแพทย์ พบว่า อาการผิดปกติที่พบบ่อยที่สุด คือ

การปวดแสบหรือเจ็บเวลาปัสสาวะ (ร้อยละ 100)

ปัสสาวะมีเลือดหรือตะกอนนิ่วปน (ร้อยละ 98.6)

ปัสสาวะเล็ด (ร้อยละ 97.2)

อาการปวดท้อง ไข้ และต้องตื่นขึ้นมาปัสสาวะบ่อยครั้ง (ร้อยละ 92.5)

อาการผิดปกติที่พบรองลงไป ได้แก่

การไม่สามารถกลั้นปัสสาวะได้เมื่อปวด (ร้อยละ 87.3)

และอาการปวดเอว (ร้อยละ 80.3)

ด้วยเหตุนี้ผู้ป่วยมากถึงร้อยละ 94.4 มีความกังวลใจเมื่อต้องออกจากบ้าน และ

ร้อยละ 81.9 ของผู้ป่วยกังวลว่าโรคนิ่วไตจะส่งเสริมให้เกิดโรคอื่นๆ ในอนาคต

จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตเกือบทุกรายมีอาการผิดปกติทางกาย ก่อให้เกิดความทุกข์ทรมานและขาดความเชื่อมั่นในตนเองและในอนาคต เมื่อพิจารณาร่วมกับความชุกของโรคที่สูงในประเทศไทย ทำให้โรคนิ่วไตจัดเป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความสำคัญอย่างยิ่งของชาติ

1.2 ผลกระทบทางจิตใจ

เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบทางจิตใจ จากผลการตอบแบบสอบถามคุณภาพชีวิตในผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าผู้ป่วยส่วนมากมีความกังวลในปัญหาสุขภาพตนเองอย่างเห็นได้ชัด โดยผู้ป่วยร้อยละ 32.4 คิดว่าตนเองมีสุขภาพไม่ดี และร้อยละ 39.4 เชื่อว่าสุขภาพของตนแย่ลงในช่วงปีที่ผ่านมา แม้ว่าเมื่อสอบถามถึงกิจกรรมในแต่ละวัน ไม่มีผู้ป่วยคนใดพบว่าตนเองกระทำกิจกรรมตามปกติ อาทิเช่น การเดินระยะไกล การขึ้นลงบันได หรือการช่วยเหลือตนเอง ได้น้อยลงกว่าเดิม กลับกัน ผู้ป่วยทุกคน (ร้อยละ 100) กลับรู้สึกว่าการเจ็บป่วยทางร่างกายที่เป็นอยู่ในขณะนี้ ซึ่งรวมไปถึงโรคนิ่วไต ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลง และมีผลต่อสภาพจิตใจ ทำให้ขาดสมาธิ และทำงานไม่ได้ตามที่ตั้งเป้าไว้ โดยพบว่าปัญหาที่ผู้ป่วยกังวลมากที่สุด คือ การสูญเสียความตั้งใจในการทำงาน ทำให้ไม่สามารถทำงานได้เท่าที่เคยทำ นอกจากนี้ ผู้ป่วยร้อยละ 81.7 ให้ความเห็นว่า ความเจ็บป่วยจากโรคนิ่วไตที่เกิดขึ้นมีผลต่อการปฏิสัมพันธ์ของตนเองกับบุคคลรอบข้าง สัมพันธ์กับจำนวนผู้ป่วยที่รายงานอาการเจ็บปวดรุนแรงจากโรคนิ่วไตจนกระทบต่อการทำงานและการดำรงชีวิต (ร้อยละ 71.9) ในส่วนของความสุขทางใจ ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 60.6-82.7) มีความกังวล ไม่สด

ขึ้น ท้อแท้ หดหู่กำลังใจ เบื่อหน่าย และไม่มีความสุข โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 90.0 ยอมรับว่ามีภาวะซึมเศร้าจนไม่มีสิ่งใดทำให้รู้สึกดีขึ้นได้ ท้อแท้ และหดหู่กำลังใจ

จากผลการสัมภาษณ์ข้างต้น ทำให้เห็นได้ว่า คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคนี้วัดตกต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะในด้านความทุกข์ทรมานทั้งทางกายและทางใจ ซึ่งส่งผลไปยังการทำงาน และการปฏิสัมพันธ์ต่อผู้อื่น และสัมพันธ์กับความเจ็บปวดที่เกิดจากโรค ถึงแม้ว่าสมรรถภาพร่างกายจริงจะไม่เปลี่ยนแปลงแต่ประการใด

ตอนที่ 2 ผลการประเมินอาหารที่มีผลกระทบต่อปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนี้

2.1. การบริโภคอาหารที่ช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้

การประเมินอาหารที่ผู้ป่วยรับประทาน ทำได้โดยการสัมภาษณ์ผู้ป่วยถึงอาหารที่รับประทานในช่วง 5 วันที่ผ่านมา พบว่า ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับโภชนาการต่อการเกิดโรคนี้ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ได้แก่

- การรับประทานผักใบเขียวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของอาหารในแต่ละมื้อ (ร้อยละ 73.2)
- ผลไม้ไม่น้อยกว่าเศษหนึ่งส่วนสี่ของอาหารในแต่ละมื้อ (ร้อยละ 50.1)
- การดื่มน้ำไม่เพียงพอ หรือเว้นระยะห่างในการดื่มนานเกินไป (ร้อยละ 73.2)
- การรับประทานเนื้อปลาหรืออาหารทะเลอื่นๆ น้อย (ร้อยละ 75.6)

2.2. การบริโภคอาหารที่เพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้

พบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้รับประทานอาหารที่เพิ่มปัจจัยส่งเสริมการก่อโรค เช่น เพิ่มแคลเซียม ออกซาเลต กรดยูริกและอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกายสูง อาทิเช่น

- เนื้อสัตว์ติดมัน หรือเนื้อสัตว์แปรรูปผสมมันสัตว์ (ร้อยละ 85.4)
- อาหารที่มีรสหวานจัด (ร้อยละ 97.5)
- อาหารที่มีรสเค็มจัด (ร้อยละ 78.0)
- เครื่องดื่มแอลกอฮอล์หรือเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีนสูง (ร้อยละ 90.2)
- อาหารจานด่วน (ร้อยละ 85.4)
- อาหารกึ่งสุกกึ่งดิบ (ร้อยละ 80.5)
- อาหารที่มีส่วนประกอบของกะทิ (ร้อยละ 82.9)
- อาหารที่มีองค์ประกอบเป็นออกซาเลตสูง (ร้อยละ 70.7)
- และอาหารที่มีกรดยูริกสูง (ร้อยละ 85.4)

นอกจากนี้ ยังพบว่า ผู้ป่วยทุกรายนิยมดื่มชา ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่มีออกซาเลตเป็นองค์ประกอบสูงเป็นประจำ

โดยสรุป จากผลการสัมภาษณ์ผู้ป่วยโรคนี้ 69 คน ดังกล่าว บ่งชี้ว่าผู้ป่วยโรคนี้มีความทุกข์ทั้งทางร่างกายและจิตใจ แนวทางแก้ไขปัญหาลดอัตราการเกิดโรคนี้ซ้ำเพื่อป้องกันความเสื่อมของไต คือ

การให้ความรู้ และคำแนะนำด้วยหลักการสร้างเสริมสุขภาพและการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การดำรงชีวิต ทั้งการบริโภคอาหารให้ถูกต้อง การบริหารจัดการความเครียดและเพิ่มความแข็งแรงของร่างกายด้วยการ แนะนำการออกกำลังกายที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วยโรคนี้ไว้ รวมถึงการเฝ้าระวังในผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อไป

ผลของการสร้างเสริมสุขภาพและการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การดำรงชีวิตต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคนี้ไว้

พบว่าภายหลังผู้ป่วยได้รับคำแนะนำและได้รับการรักษาจากแพทย์ ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตด้านต่างๆ ดีขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 16

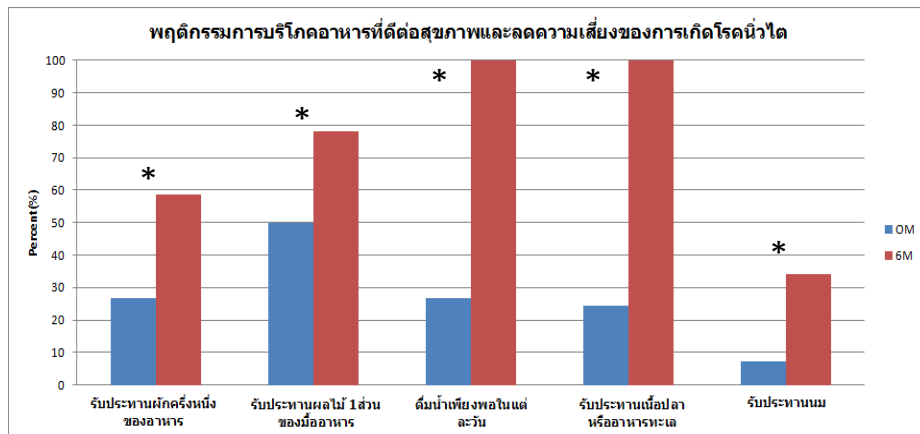
ตารางที่ 16 แสดงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ก่อนได้รับมะนาวผง (0M) และหลังได้รับคำแนะนำและรักษาด้วยมะนาวผง 6 เดือน (6M)

คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคนี้ไว้

รายการ	0M(%)	6M(%)	p-value
สุขภาพโดยทั่วไปอยู่ในเกณฑ์ดี	57.14	78.05	0.002
เมื่อเทียบกับ 1 ปีที่แล้ว สุขภาพอยู่ในเกณฑ์ดี	11.43	53.66	<0.001
ปัญหาทางด้านสุขภาพ ไม่มีผลต่อการออกกำลังกาย	48.57	26.83	0.002
ปัญหาทางด้านสุขภาพ ส่งผลต่อกิจวัตรประจำวัน	60	36.59	0.002
มีอาการปวดตามร่างกายรุนแรง	5.71	0	0.029
มีความสุขตลอดเวลา	37.14	68.29	<0.001
ผู้ป่วยคิดว่าสุขภาพอยู่ในเกณฑ์ดี มีสุขภาพแข็งแรง	34.29	80.49	<0.001
ผู้ป่วยมีอาการปวดข้อสภาวะบ่อย	11.43	2.44	0.018
ผู้ป่วยต้องคืนมาปีสภาวะเวลากลางคืน	10	2.44	0.033
ผู้ป่วยมีอาการปวดสภาวะเวลาปีสภาวะ	40	20	0.003
ผู้ป่วยถ่ายปีสภาวะออกมาเป็นเลือด	21.43	0	<0.001

ผลการสัมภาษณ์เกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงที่เพิ่มโอกาสการเกิดนี้ไว้ในผู้ป่วยโรคนี้ไว้

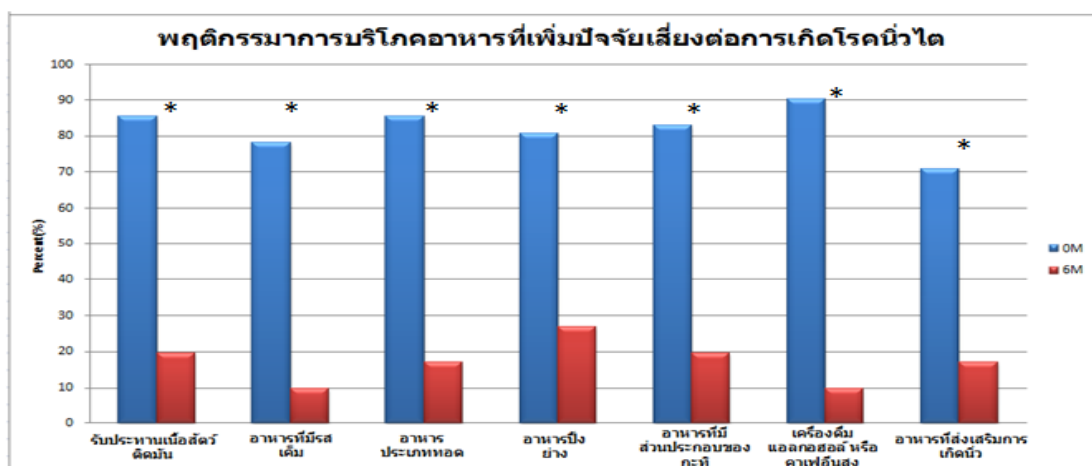
พบว่าภายหลังผู้ป่วยได้รับคำแนะนำและได้รับการรักษาจากแพทย์และพยาบาลพบว่าปัจจัยที่ดีต่อสุขภาพและลดโอกาสการเกิดนี้ไว้เพิ่มขึ้นแต่ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนี้ไว้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 44 และ 45



* P<0.001, P values from chi-square test

ภาพที่ 44 แสดงผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ก่อนและหลังได้คำแนะนำและหลังได้รับมะนาวผง 6 เดือน

การบริโภคอาหารที่เพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ



* P<0.001, P values from chi-square test

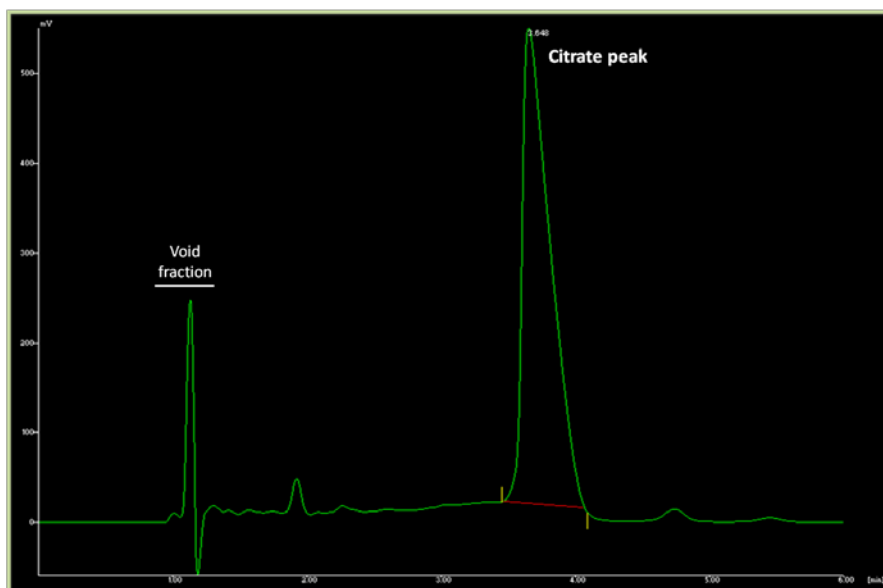
ภาพที่ 45 แสดงผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ก่อนและหลังได้คำแนะนำและหลังได้รับมะนาวผง 6 เดือน

Monograph specifications ของสูตรมะนาวผง

จากข้อมูลผลการวิเคราะห์สูตรมะนาวผงและผลการวิจัยทางคลินิกระยะที่ 1 และ 2 สามารถสรุปเป็น monograph specification ได้ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 Monograph specification of lime powder regimen

Monograph Specification		LPR ::: Lime Powder Regimen :::
Introduction: Lime powder regimen (LPR) is a new formula derived from naturally fresh lime juice. Powder form is produced by freeze-dried technique. It contains key substances namely citrate, potassium and naturally-derived antioxidants that are beneficial for preventing kidney stone formation. This innovative product is invented by Professor Piyaratana Tosukhowong and Assistant Professor Suchada Chaisawasdi. Preclinical study and clinical trial phase 1 and 2 have been conducted to evaluate the safety and efficacy of LPR for reducing the recurrence of kidney stone formation.		
Dosage form: - LPR is white-pale yellowish powder packed in an aluminum sachet for preventing light and moisture. - Each sachet contains 5 g of LPR.		
Active pharmaceutical substances: - Citrate 4092 mg (63 mEq) - Potassium 819 mg (21 mEq) - Various natural antioxidants (vitamin C, polyphenols, flavonoids)		
Assay tolerance: - Citrate: 3683-4501 mg - Potassium: 737-901 mg		

Chromatographic profile:

Assayed by HPLC (Jasco, Japan):

Column: Prevail™ Organic Acid 150 x 4.6 mm, 5 μm

Mobile phase: 15 mM KH₂PO₄, pH 2.0 with phosphoric acid

Flowrate: 1.5 ml/min

Detector: UV at 210 nm

Manufacturer:

- สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ภายใต้การควบคุมการผลิตโดย ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์
- ตรวจสอบคุณภาพภายใต้การควบคุมของ ศ.ปิยะรัตน์ โตสุขโงวงศ์

Indication (This product is strictly used in research):

- LPR is under clinical trial aimed to prevent formation of recurrent calculi in post-operative adult patients with kidney stone disease.

Dosage and administration:

- Use in adults: one sachet per day
- Dissolve in 200-300 ml water and drink all within 5-10 minutes, every evening between 6 and 9 pm.

Safety profiles:*Heavy metal impurities*

- Cadmium, cobalt and chromium are undetectable.
- Arsenic, lead, mercury, antimony, nickel and vanadium contents do not exceed the oral permitted daily exposure and the acceptable limits for daily consumption of heavy metals (Reference: United States Pharmacopeia).

Cytotoxicity test

- Viability of human kidney cells (HK-2) do not change after exposed up to 100 mg% of LPR for 24 hours.

Acute animal toxicity test

- LD₅₀ of LPR (oral route) in mice is > 10 g/kg, indicating a very low toxicity.

Human subjects

- No side effect and complaint is observed in 13 healthy volunteers after consumption of one sachet LPR.

Pharmacokinetic profile:

- LPR delivers citraturic, alkalinizing and antioxidative effects in healthy volunteers.
- Urinary citrate is maximally raised at 7.31 ± 2.27 hr ($T_{\max}$) after LPR intake.

In vitro efficacy of LPR for preventing stone formation:

- LPR effectively inhibits formation and growth of calcium oxalate crystals.
- LPR significantly reduces oxidative stress in HK-2 cells exposed to of calcium oxalate monohydrate crystals.

Clinical efficacy:

- After 6-month treatment with LPR in patients with kidney stone, urinary citrate, potassium, pH and total antioxidant status are significantly higher than the pre-treatment baseline.
- The phase 2 clinical trial data indicate that LPR has the citraturic, urine alkalinizing and antioxidative actions in kidney stone patients. These medicinal actions potentially reduce the risk for kidney stone recurrence.

Adverse effects:

- No adverse effect is found in 32 trialed post-operative kidney stone patients after 6-months daily consumption.

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัยโครงการวิจัยที่ 1

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของสูตรมะนาวผง มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ไขมันรวม โปรตีนรวม และพลังงานรวมสูงกว่าในน้ำมะนาวสด (กรัม/100 กรัม ของน้ำผลไม้สด) (ที่รายงานโดย USDA และจากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าในสูตรมะนาวผงหนึ่งซองมีปริมาณซีเทรตสูง (4,792 มิลลิกรัมต่อซอง) และออกซาเลตต่ำ ปริมาณแร่ธาตุแมกนีเซียม ซีลีเนียม แคลเซียม แมกนีเซียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เกินค่ามาตรฐานที่อนุญาตให้มีได้ในอาหารและยา (ALDC-HM, OPDE-DF) ปริมาณสารโลหะหนักในสูตรมะนาวผงพบว่ามีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานที่อนุญาตให้มีได้ในอาหารและยา (ALDC-HM, OPDE-DF) สรุปได้ว่า สูตรมะนาวผงมีปริมาณซีเทรตสูง ซึ่งน่าจะใช้เป็นยาที่ยับยั้งการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนี้ได้ดี อีกทั้งมีสารโลหะหนักอยู่ในปริมาณที่ต่ำมากหรือแทบไม่มีเลย จึงน่าจะปลอดภัยสำหรับผู้ป่วยในการรับประทานต่อเนื่องเป็นเวลานาน

ผลการทดสอบในหลอดทดลองพบว่า LPR สามารถยับยั้งการเจริญของผลึกนิ่ว calcium oxalate monohydrate ได้ แบบ dose-dependent manner และไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์หนูท่อไต (HK-2 cells) ที่สำคัญ LPR มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงในหนูถีบจักร โดยให้ LPR ทางปากครั้งเดียวขนาดความเข้มข้นสูง และพบว่า ขนาดของสูตรมะนาวผงที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) > 10 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า LPR ไม่มีผลข้างเคียงต่อหนู อีกทั้งหนูทุกตัวที่ได้รับ LPR มีชีวิตอยู่รอดครบกำหนด 14 วัน และเมื่อผ่าชันสูตรศพไม่พบความผิดปกติที่อวัยวะภายใน ดังนั้นจากการศึกษาผลของ LPR ในสัตว์ทดลอง สามารถสรุปได้ว่า LPR ไม่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองในระยะเฉียบพลัน เพื่อยืนยันผลความปลอดภัยของ LPR ในสัตว์ทดลอง จึงควรทำการทดสอบความเป็นพิษของ LPR ในระยะเรื้อรัง (chronic toxicity test) ต่อไป

จากการวิเคราะห์ผลของ LPR ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับซิเตรตในเลือดและปัสสาวะระดับโพแทสเซียม ค่า pH และ ค่า TAS ในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี สามารถสรุปได้ว่า ภายหลังจากได้รับ LPR ไปแล้ว ซิเตรตจะถูกดูดซึมเข้าไปที่กระแสเลือดสูงสุดในนาที่ที่ 30 และจะถูกขับออกทางปัสสาวะสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 ตามด้วยโพแทสเซียม และ TAS ในชั่วโมงที่ 2 นอกจากนี้ LPR ยังส่งผลให้ค่า pH ในปัสสาวะสูงขึ้นด้วย นั่นคือ LPR มี citraturic, kaliuric, alkalinizing และ antioxidative effects ดังนั้นจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้คณะผู้วิจัยสรุปได้ว่า สูตรมะนาวผงมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วได้ โดยเพิ่มระดับซิเตรต โพแทสเซียม และค่าความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะ และสามารถช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์บุท่อไตเนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง และที่สำคัญไม่พบผลข้างเคียงต่ออาสาสมัครสุขภาพดี

สรุปผลการวิจัยโครงการวิจัยที่ 2

เพื่อตรวจสอบและยืนยันประสิทธิภาพของ LPR ในการใช้รักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต คณะผู้วิจัยทำการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี

ผลการศึกษาพบว่า สูตรมะนาวผง ไม่มีผลข้างเคียงใดๆ ต่อผู้ป่วย สามารถเพิ่มระดับซิเตรตและโพแทสเซียมในปัสสาวะได้ ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ และยังเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระในปัสสาวะให้สูงขึ้นด้วย และลดการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว ดังนั้นจากการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับสูตรมะนาวผงเป็นระยะเวลา 6 เดือน สรุปได้ว่าสูตรมะนาวผงสามารถใช้เป็นยาลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ

1. เพิ่มระดับซิเตรตในปัสสาวะ (citraturic action)
2. เพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ (alkalinizing action)
3. ลดระดับการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (antioxidative action)

อุปสรรคและข้อจำกัดของการวิจัย

พบว่าผู้ที่มีความตั้งใจเข้าร่วมโครงการจำนวนมาก คิดเป็นร้อยละ 39 ไม่สามารถเข้าร่วมโครงการวิจัยได้ โดยสาเหตุที่สำคัญที่สุด คือ การมีนิ่วขนาดใหญ่ค้างอยู่ (ร้อยละ 48 จากผู้ที่ถูกคัดออกทั้งหมด) รองลงมา คือ ไม่สะดวกในการติดตามการรักษา เนื่องจากผู้ป่วยส่วนหนึ่งเป็นผู้ที่มีถิ่นพำนักอยู่ต่างจังหวัด และถูกส่งตัวมารับการรักษาต่อที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์และมีความพร้อมในการรักษามากกว่า ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักได้รับการรักษาโดยวิธีทางยา หรือการสลายนี่วมาก่อนแล้ว แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็นโรคนิ่วที่มีความซับซ้อน (complicated renal stone) ที่อาจต้องรักษาโดยการสลายนี่วหลายครั้ง หรือจำเป็นต้องตัดไตออกจากไตไม่ทำงานแล้ว และมีโอกาสที่จะยังคงพบนิ่วค้างหรือหลงเหลืออยู่หลังการรักษาสูงมาก นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ที่รักษาหายขาดก็จะถูกส่งตัวกลับไปรักษาที่

โรงพยาบาลต้นสังกัด และไม่สะดวกที่จะกลับมารักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์อีก ด้วยเหตุนี้ก่อให้เกิดความล่าช้าในการรับสมัครผู้เข้าร่วมโครงการกว่าที่ประมาณการณ์ไว้แต่ต้นเป็นอันมาก รวมถึงมีอัตราการขอยุติการเข้าร่วมโครงการในภายหลัง (รวมทั้งสองกลุ่ม คิดเป็นร้อยละ 9)

ข้อเสนอแนะและแนวทางแก้ปัญหา

1. การรวบรวมผู้ป่วยได้ช้า เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ stone-free rate ภายหลังผ่าตัดเอนโดเมทรีออสโกปี จึงควรเพิ่มโรงพยาบาลเข้าร่วมโครงการวิจัย เช่น เพิ่มโรงพยาบาลวารินชำราบที่อยู่ใกล้เคียงกับโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ให้สามารถรวบรวมผู้ป่วยเข้าโครงการวิจัยได้เร็วขึ้น
2. อัตราการออกจากโครงการวิจัยค่อนข้างสูง มีแนวทางแก้ไข ดังนี้
 - ทำโครงการเยี่ยมบ้านผู้ป่วยเป็นระยะๆ
 - สร้างเครือข่ายกับ อสม. ในหมู่บ้านที่ผู้ป่วยอาศัยอยู่ เพื่อเป็นช่องทางติดต่อกับผู้ป่วย และให้อสม. ช่วยติดตามการรับประทานยาวิจัย และปัญหาส่วนตัวของแต่ละคน
 - ส่งจดหมายสอบถามเป็นประจำ หรือ สกส ให้กับผู้ป่วยในโอกาสสำคัญต่างๆ
3. ราคาเม็มนาวสูงขึ้น ปัจจุบันราคาประมาณ 2.5-8 บาทต่อลูก ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูตรเม็มนาวสูงขึ้น งบประมาณที่ได้รับจาก วช. ไม่พอ มีแนวทางแก้ไข คือ
 - เร่งผลิตในหน้าฝน
 - ปรับงบประมาณการวิจัยใหม่ โดยเฉพาะในหมวดค่าผลิตสูตรเม็มนาว และอาจต้องลดจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการลง
 - ติดต่อกับบริษัทผลิตยา ให้ผลิตให้ อาจจะได้อายุที่ต่ำกว่าในปัจจุบัน ที่ผลิตที่สถาบันการศึกษา
4. Placebo มีรสหวานแตกต่างจากสูตรเม็มนาวมาก และค่าการผลิต lactose placebo ก็สูงขึ้นด้วย ทำให้คณะผู้วิจัยคิดว่าอาจจะต้องเปลี่ยนเป็น cellulose

บรรณานุกรม

- Abdel-Halim RE. Urolithiasis in adults. Clinical and biochemical aspects. *Saudi Med J*. 2005 May; **26**:705-13
- Alexander RT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, Bello A, Morgan C, Samuel S, Klarenbach SW, Curhan GC, Tonelli M. Kidney stones and kidney function loss: a cohort study. *BMJ*. 2012; **345**:e5287
- Asplin JR. Evaluation of the kidney stone patient. *Semin Nephrol*. 2008 Mar; **28**:99-110
- Brikowski TH, Lotan Y, Pearle MS. Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. *PNAS*. 2008 Jul 15; **105**:9841-6
- Boonla C, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. *Urol Res*. 2007 Aug; **35**:185-91
- Boonla C, Hunapathed C, Bovornpadungkitti S, Poonpirome K, Tungsanga K, Sampatanukul P, Tosukhowong P. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in stone-containing kidneys. *BJU international*. 2008 May; **101**:1170-7
- Boonla C, Krieglstein K, Bovornpadungkitti S, Strutz F, Spittau B, Predanon C, Tosukhowong P. Fibrosis and evidence for epithelial-mesenchymal transition in the kidneys of patients with staghorn calculi. *BJU international*. 2011 Oct; **108**:1336-45
- Butterweck V, Khan SR. Herbal medicines in the management of urolithiasis: alternative or complementary. *Planta Med*. 2009 Aug; **75**:1095-103
- Butz M. Rational prevention of calcium urolithiasis. *Urol Int*. 1986; **41**:387-92
- Chutipongtanate S, Thongboonkerd V. Red Blood Cell Membrane Fragments but Not Intact Red Blood Cells Promote Calcium Oxalate Monohydrate Crystal Growth and Aggregation. *J urol*. 2010; **184**:743-9
- El-Zoghby ZM, Lieske JC, Foley RN, Bergstralh EJ, Li X, Melton LJ, 3rd, Krambeck AE, Rule AD. Urolithiasis and the risk of ESRD. *CJASN*. 2012 Sep; **7**:1409-15
- Goldfarb DS. Prospects for dietary therapy of recurrent nephrolithiasis. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2009 Jan; **16**:21-9
- Goldfarb DS. In the clinic. Nephrolithiasis. *Ann Intern Med*. 2009 Aug 4; **151**:ITC2
- Hassan K, Iqbal B, Khand F. Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1996; **675**: 147-51
- Kang DE, Maloney MM, Halebian GE, Springhart WP, Honeycutt EF, Eisenstein EL, Marguet CG,

- Preminger GM. Effect of medical management on recurrent stone formation following percutaneous nephrolithotomy. *J Urol*. 2007 May; **177**:1785-8; discussion 8-9
- Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci*. 2004 May 1; **9**:1450-82
- Klugman V, Favus MJ. Diagnosis and treatment of calcium kidney stones. *Adv Endocrinol Metab*. 1995; **6**:117-42
- Koff SG, Paquette EL, Cullen J, Gancarczyk KK, Tucciarone PR, Schenkman NS. Comparison between lemonade and potassium citrate and impact on urine pH and 24-hour urine parameters in patients with kidney stone formation. *Urology*. 2007 Jun; **69**:1013-6
- Lake KD, Brown DC. New drug therapy for kidney stones: a review of cellulose sodium phosphate, acetohydroxamic acid, and potassium citrate. *Drug Intell Clin Pharm*. 1985 Jul-Aug; **19**:530-9
- Massey L. Magnesium therapy for nephrolithiasis. *Magnes Res*. 2005 Jun; **18**:123-6
- Matlaga BR, Lingeman JE. Surgical management of stones: new technology. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2009 Jan; **16**:60-4
- Odvina CV. Comparative value of orange juice versus lemonade in reducing stone-forming risk. *CJASN*. 2006 Nov; **1**:1269-74
- Pak CY. Medical management of nephrolithiasis in Dallas: update 1987. *J Urol*. 1988 Sep; **140**:461-7
- Pak CY. Citrate and renal calculi: an update. *Miner Electrolyte Metab*. 1994; **20**:371-7
- Pak CY. Medical prevention of renal stone disease. *Nephron*. 1999; **81 Suppl 1**:60-5
- Pak CY. Pharmacotherapy of kidney stones. *Expert Opin Pharmacother*. 2008 Jun; **9**:1509-18
- Pearle MS. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and residual fragments after shockwave lithotripsy in lower caliceal calcium oxalate urolithiasis: a randomized controlled trial. *Int Braz J Urol*. 2002 Nov-Dec; **28**:570-1
- Penniston KL, Steele TH, Nakada SY. Lemonade therapy increases urinary citrate and urine volumes in patients with recurrent calcium oxalate stone formation. *Urology*. 2007 Nov; **70**:856-60
- Preminger GM, Sakhaee K, Skurla C, Pak CY. Prevention of recurrent calcium stone formation with potassium citrate therapy in patients with distal renal tubular acidosis. *J Urol*. 1985 Jul; **134**:20-3
- Preminger GM, Harvey JA, Pak CY. Comparative efficacy of "specific" potassium citrate therapy versus conservative management in nephrolithiasis of mild to moderate severity. *J Urol*. 1985 Oct; **134**:658-61
- Preminger GM, Sakhaee K, Pak CY. Alkali action on the urinary crystallization of calcium salts: contrasting responses to sodium citrate and potassium citrate. *J Urol*. 1988 Feb; **139**:240-2

- Rivers K, Shetty S, Menon M. When and how to evaluate a patient with nephrolithiasis. *Urol Clin North Am*. 2000 May; **27**:203-13
- Robert M, Boularan AM, Colette C, Averous M, Monnier L. Urinary calcium oxalate saturation in 'stone formers' and normal subjects: an application of the EQUIL2 program. *Br J Urol*. 1994 Apr; **73**:358-61
- Robinson MR, Norris RD, Sur RL, Preminger GM. Urolithiasis: not just a 2-legged animal disease. *J Urol*. 2008 Jan; **179**:46-52
- Saepoo S, Adstamongkonkul D, Tosukhowong P, Predanon C, Shotelersuk V, Boonla C. Comparison of urinary citrate between patients with nephrolithiasis and healthy controls. *Chula Med J*. 2009 Jan - Feb; **53**:51 - 65
- Sakhaee K. Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008 May; **17**:304-9
- Sakhaee K. Pharmacology of stone disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2009 Jan; **16**:30-8
- Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B. Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Jun; **97**:1847-60
- Sakhaee K. Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2009 Mar; **75**:585-95
- Sarica K, Erturhan S, Yurtseven C, Yagci F. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and regrowth after extracorporeal shockwave lithotripsy in children. *J Endourol*. 2006 Nov; **20**:875-9
- Schwille PO, Herrmann U, Wolf C, Berger I, Meister R. Citrate and recurrent idiopathic calcium urolithiasis. A longitudinal pilot study on the metabolic effects of oral potassium citrate administered over the short-, medium- and long-term medication of male stone patients. *Urol Res*. 1992; **20**:145-55
- Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol*. 1996 Sep; **156**:907-9
- Sitprija V, Tungsanga K, Tosukhowong P, Leelhaphunt N, Kruerkalai D, Sriboonlue P, Saew O. Metabolic problems in northeastern Thailand: possible role of vanadium. *Miner Electrolyte Metab*. 1993; **19**:51-6
- Sriboonlue P, Prasongwatana V, Suwantrai S, Bovornpadungkitti S, Tungsanga K, Tosukhowong P. Potassium contents of northeastern Thai foods. *J Med Assoc Thai*. 1998 Aug; **81**:616-26
- Straub M, Hautmann RE. Developments in stone prevention. *Curr Opin Urol*. 2005 Mar; **15**:119-26
- Tosukhowong P, Chotikasatit C, Tungsanga K, Sriboonlue P, Prasongwattana V, Pansin P, Sitprija V.

- Abnormal erythrocyte Na, K-ATPase activity in a northeastern Thai population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992 Sep; **23**:526-30
- Tosukhowong P, Chotigasatit C, Tungsanga K, Sriboonlue P, Pansin P, Sitprija V. Hypokalemia, high erythrocyte Na⁺ and low erythrocyte Na,K-ATPase in relatives of patients dying from sudden unexplained death syndrome in north-east Thailand and in survivors from near-fatal attacks. *Am J Nephrol*. 1996; **16**:369-74
- Tosukhowong P, Tungsanga K, Kittinantavorakoon C, Chaitachawong C, Pansin P, Sriboonlue P, Sitprija V. Low erythrocyte Na/K-pump activity and number in northeast Thailand adults: evidence suggesting an acquired disorder. *Metabolism*. 1996 Jul; **45**:804-9
- Tosukhowong P, Borvonpadungkitti S, Prasongwatana V, Tungsanga K, Jutuporn S, Dissayabutr T, Reungjui S, Sriboonlue P. Urinary citrate excretion in patients with renal stone: roles of leucocyte ATP citrate lyase activity and potassium salts therapy. *Clin Chim Acta*. 2002 Nov; **325**:71-8
- Tosukhowong P, Sangwatanaroj S, Jatuporn S, Prapunwattana P, Saengsiri A, Rattanapruks S, Srimahachota S, Udayachalerm W, Tangkijvanich P. The correlation between markers of oxidative stress and risk factors of coronary artery disease in Thai patients. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003; **29**:321-9
- 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 Feb; **12**:140-4
- Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, Boonla C, Tungsanga K. Nephrolithiasis: Pathophysiology, therapeutic approach and health promotion. *Chula Med J*. 2006; **50**:104-23
- Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, Dissayabutra T, Tungsanga K. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand : update 2007. *Asian Biomedicine*. 2007; **1**:87-95
- Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, Ratchanon S, Chaisawasdi S, Boonla C, Tungsanga K. Citraturic, alkalinizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. *Urol Res*. 2008 Aug; **36**:149-55
- Wabner CL, Pak CY. Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors. *J Urol*. 1993 Jun; **149**:1405-8
- Wasserstein AG. Nephrolithiasis: acute management and prevention. *Dis Mon*. 1998 May; **44**:196-213
- Wignall GR, Canales BK, Denstedt JD, Monga M. Minimally invasive approaches to upper urinary tract urolithiasis. *Urol Clin North Am*. 2008 Aug; **35**:441-54, viii

- Worcester EM, Coe FL. Nephrolithiasis. *Prim Care*. 2008 Jun: **35**:369-91, vii
- Yagisawa T, Chandhoke PS, Fan J. Metabolic risk factors in patients with first-time and recurrent stone formations as determined by comprehensive metabolic evaluation. *Urology*. 1998 Nov: **52**:750-5
- 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 Nov: **4**:537-40
- Youngjermchan P, Pumpaisanchai S, Ratchanon S, Pansin P, Tosukhowong P, Tungsanga K, Boonla C. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. *Chula Med J*. 2006 September: **50**:605-21
- Zanetti G, Trinchieri A, Montanari E, Rocco F. SWL: our twenty-four year experience. *Arch Ital Urol Androl*. 2008 Mar: **80**:21-6
- Zerwekh JE, Odvina CV, Wuermsler LA, Pak CY. Reduction of renal stone risk by potassium-magnesium citrate during 5 weeks of bed rest. *J Urol*. 2007 Jun: **177**:2179-84
- สมบัติ บวรผดุงกิตติ, พจน์ ศรีบุญลือ, เกรียง ตั้งสง่า. อัตราการเกิดนิ่วใหม่ภายหลังการผ่าตัดนิ่วไตในโรงพยาบาลขอนแก่น. *วารสารยูโร*. 2535: **13**