



Journal of the Medical Technologist

Association of Thailand

วารสารเทคนิคการแพทย์

Vol. 48 No. 3 December 2020

ปีที่ 48 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2563

CONTENTS



Review Article

- School-age Children Obesity: Causes and Prevention 7447
Suwit Klongthalay
Kanjana Suriyaprom and
Chutima Sirikulchayanonta

Original Articles

- Evaluation of Capillary Hemoglobin Estimation in 7466
Blood Donors by Using Specific Gravity (CuSO_4)
and Portable Hemoglobin Photometer
Sittiporn Suwannamit
Nichaporn Punya
Thanaphorn Saengmuk and
Narin Pongtussanaham
- A Study of Reference Interval for Platelet 7482
Aggregation Test Using Light Transmission
Aggregometry in Thai Population
Pawadee Chinudomwong
Karan Paisooksantivatana and
Narin Khongjaroensakun
- Efficiency Improvement of The Workflow for 7493
Nucleated Red Blood Cell (NRBC) Enumeration
by Beckman Coulter Unice1®DxH Hematology
Analyzer
Pichaisiri Nualmanee
Nutdanai Chaothai
Benjarat Chatachote and
Karan Paisooksantivatana

- *In vitro* Study of Antioxidant, Anti-glycation 7504
and Anti-inflammatory Effects of Thai
Medicinal Plants for Diabetic Patients
Kanyanath Piumngam
- Antioxidant Properties, Total Phenolics and 7519
Flavonoids and the Inhibition of Cell
Proliferation in Cholangiocarcinoma from
Thai Herbals
Kittipat Sopitthummakhun
Worrawat Promden and
Panhip Rattanasinganchan
- The Comparison of Efficiency, 7532
Sensitivity, and Effect of Inhibitors on
Commercial DNA Analysis Kits
Phatcharin Mahawong
Supakit Khacha-ananda and
Yutti Amornlertwatana
- Comparison of Urine Dipstick 7549
and Urine Culture in Diagnosis of Urinary
Tract Infection
Putza Chonsawat
Benjamaporn Wongphan
Jantawan Satayarak and
Asrinda Abdulkanan



ISSN 0125-2682

**An Official Publication of
The Association of Medical Technologist of Thailand
under the Royal Patronage of HRH Princess Soamsawali**
สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์
พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

CLINICAL CHEMISTRY

IMMUNOASSAY SYSTEM

HEMATOLOGY



sysmex

BX-4000

Throughput : 400 test/h
Sample barcode reader (Basic) : LASER
Sample volume : 2.0 - 35ul (0.1ul step)
Total reaction volume : 150ul ~ 450ul

HISCL-5000

Processing Capacity 200 tests per hour

XN-Series

Automated Hematology Analyzer

อ่านค่าเตือนในจอภาพและเอกสารกำกับเครื่องมือแพทย์ก่อนใช้
หมายเหตุ : โฆษณาต่อผู้ประกอบการวิชาชีพทางการแพทย์ และสาธารณสุข
ใบอนุญาตเลขที่ : ขพ.400/2562

www.aechealthcare.com

[f aechealthcare](https://www.facebook.com/aechealthcare)

[y aechealthcare](https://www.youtube.com/aechealthcare)

info@aechealthcare.com

gibthai
A 3N HOLDING COMPANY

VERSANT kPCR

molecular system

SPECIFICATION

Footprint	~1.4 m ² (16 ft ²)
Sample capacity	89-94
Consumables	Moderate
Ready-to-use reagents	Yes
Manual labor (48 samples)	34 minutes
Open system capability	Yes, with VERSANT MiPLX Software Solution

NOTICE

The warning on the label and accompanying documents before use.



หมายเหตุ : โฆษณาต่อผู้ประกอบการวิชาชีพทางการแพทย์ และสาธารณสุข
ใบอนุญาตเลขที่ : ขพ.429/2562

CONTACT FOR INFORMATION
(66) 0 2274 8331

www.gibthai.com/laboratory

[f gibthai](https://www.facebook.com/gibthai)

[in @gibthai](https://www.linkedin.com/company/gibthai)

จัดจำหน่ายและนำเข้าโดย บริษัท กิบทัย จำกัด

อาคาร กรีน โอเดียน เวิลด์ 44/6 ถนนสุขุมวิทซอย 1 แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10310



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 48 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2563

วารสารเทคนิคการแพทย์ ขอเรียนเชิญผู้แต่งส่งบทความมาตีพิมพ์ในวารสารเทคนิคการแพทย์ ซึ่งสามารถส่งบทความได้ทั้งรูปแบบภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยลงทะเบียนเพื่อส่งบทความเข้าสู่ระบบออนไลน์ Thai Journals online (ThaiJo 2) ที่ <https://www.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt/index> เท่านั้น และเลือก “สำหรับผู้แต่ง” เพื่อศึกษาการเตรียมต้นฉบับบทความประเภทต่างๆ ของวารสารฯ ก่อนเลือก “ส่งบทความ” เข้าสู่ระบบออนไลน์

สำหรับบทความในวารสารฉบับนี้ ประกอบด้วย บทความปริทัศน์ (Review article) จำนวน 1 เรื่อง คือ เรื่อง “โรคอ้วนในเด็กวัยเรียน: จากพื้นฐานสู่นโยบายการป้องกัน” บทความนิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 7 เรื่อง ซึ่งประกอบด้วย บทความภาษาอังกฤษ 1 เรื่อง และบทความภาษาไทย 6 เรื่อง โดยเนื้อหาของบทความ จัดตามกลุ่มวิชาดังนี้ 1) บทความทางด้านโลหิตวิทยาคลินิก จำนวน 3 เรื่อง 2) บทความทางด้านเคมีคลินิก จำนวน 2 เรื่อง 3) บทความทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล จำนวน 1 เรื่อง และ 4) บทความทางด้านจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก จำนวน 1 เรื่อง

สมชาย วิริยะยุทธกร
บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 48 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2563

สารบัญ

บทความปริทัศน์

- โรคอ้วนในเด็กวัยเรียน: สาเหตุและการป้องกัน 7447
สุวิทย์ คล่องทะเล
กาญจนา สุริยะพรหม และ
ชุติมา ศิริกุลชยานนท์

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การประเมินผลการตรวจค่าฮีโมโกลบิน 7466
จากปลายนิ้วในผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธีตรวจ
สอบความถ่วงจำเพาะด้วยน้ำยาคอปเปอร์ซัลเฟต
และเครื่องวัดฮีโมโกลบินแบบพกพา
สิทธิพร สุวรรณมิตร
ณิชากรณ์ ปัญญา
ชนภรณ์ แสงमुख และ
นรินทร์ พงศ์ทัศนเหม
- การหาค่าอ้างอิงของการทดสอบ Platelet 7482
Aggregation Test ด้วยหลักการ Light
Transmission Aggregometry
ในประเทศไทย
ภาวดี ชินอุดมวงศ์
การันต์ ไพสุขสานติวัฒนา และ
นรินทร์ คงเจริญสกุล
- การเพิ่มประสิทธิภาพการรายงานผล 7493
Nucleated Red Blood Cell จากเครื่อง
วิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Beckman
Coulter Unicel® DxH
พิชัยสิริ นวลมณี
ณัฐดนัย ชาวไทย
เบญจรัตน์ ชาติะโชติ และ
การันต์ ไพสุขสานติวัฒนา

- การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 7504
ด้านปฏิกิริยาไกลเคชั่น และด้านการอักเสบ
ของสมุนไพรไทยสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน
กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม
- คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวม 7519
ของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และการ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
จากสมุนไพรไทย
กิตติพัฒน์ ไสยจิตรธรรมคุณ
วรวัฒน์ พรหมเด่น และ
ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ
- การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ความไว 7532
และผลของตัวยับยั้งชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์
ดีเอ็นเอสำเร็จรูป
พัชรินทร์ มหาวงค์
ศุภกิจ คชอนันต์ และ
ยุตติ อมรเลิศวัฒนา
- การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ 7549
ปัสสาวะด้วยแถบทดสอบกับการเพาะเชื้อ
เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ
พุทรา ชลสวัสดิ์
เบญจมาภรณ์ วงษ์พันธุ์
จันทวรรณ สัตยารักษ์ และ
อัสรินดา อับดุลกานาน



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Vol. 48 No. 3 December 2020

CONTENTS

Review Article

- School-age Children Obesity: Causes and Prevention 7447
Suwit Klongthalay
Kanjana Suriyaprom and
Chutima Sirikulchayanonta

Original Articles

- Evaluation of Capillary Hemoglobin Estimation in Blood Donors by Using Specific Gravity (CuSO_4) and Portable Hemoglobin Photometer 7466
Sittiporn Suwannamit
Nichaporn Punya
Thanaphorn Saengmuk and
Narin Pongtussanaham
- A Study of Reference Interval for Platelet Aggregation Test Using Light Transmission Aggregometry in Thai Population 7482
Pawadee Chinudomwong
Karan Paisooksantivatana and
Narin Khongjaroensakun
- Efficiency Improvement of The Work-flow for Nucleated Red Blood Cell (NRBC) Enumeration by Beckman Coulter Unicel®DxH Hematology Analyzer 7493
Pichaisiri Nualmanee
Nutdanai Chaothai
Benjarat Chatachote and
Karan Paisooksantivatana

- *In vitro* Study of Antioxidant, Anti-glycation and Anti-inflammatory Effects of Thai Medicinal Plants for Diabetic Patients 7504
Kanyanath Piumngam
- Antioxidant Properties, Total Phenolics and Flavonoids and the Inhibition of Cell Proliferation in Cholangiocarcinoma from Thai Herbals 7519
Kittipat Sopitthummakhun
Worrawat Promden and
Panthip Rattanasinganchan
- The Comparison of Efficiency, Sensitivity, and Effect of Inhibitors on Commercial DNA Analysis Kits 7532
Phatcharin Mahawong
Supakit Khacha-ananda and
Yutti Amornlertwatana
- Comparison of Urine Dipstick and Urine Culture in Diagnosis of Urinary Tract Infection 7549
Putza Chonsawat
Benjamaporn Wongphan
Jantawan Satayarak and
Asrinda Abdulkanan



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

วัตถุประสงค์

1. เป็นสื่อกลางเผยแพร่ความก้าวหน้าทางวิชาการ และผลงานวิจัยด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์สาขาต่างๆ
2. ส่งเสริมการวิจัยจากงานประจำ การค้นคว้าทดลองหาองค์ความรู้ใหม่ และการวิจัยทางการศึกษา เพื่อพัฒนาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์
3. เป็นสื่อเชื่อมโยงแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ด้านวิชาชีพระหว่างนักเทคนิคการแพทย์กับบุคลากรทางการแพทย์

Objectives

1. To serve as a medium for propagating advanced knowledge and researches in medical technology and other related medical sciences.
2. To promote research from routine, original research and educational research for enhancing the profession of medical technology.
3. To serve as a medium for interactions and exchanges of academic and professional experiences among medical technologists and other medical professions.

เจ้าของ

สมาคมเทคนิคการแพทย์
แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์
พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี
พระวรราชทินนิตมาตุ

Owner

The Association of Medical Technologist
of Thailand under the Royal Patronage
of HRH Princess Soamsawali

สำนักงานวารสาร

เลขที่ 6 ซอยรามอินทรา 52/1
ถนนรามอินทรา
แขวง/เขต คันนายาว
กรุงเทพมหานคร 10230
โทร. 0-2948-5757-9
โทรสาร 0-2948-5758
อีเมล: jmt.amtt2016@gmail.com
เว็บไซต์: www.jmt-amtt.com

The journal office

6 Soi Ramintra 52/1, Ramintra Road,
Khannayao District, Bangkok 10230,
Thailand.
Tel. 66-2948-5757-9
Fax 66-2948-5758
E-mail: jmt.amtt2016@gmail.com
Website: www.jmt-amtt.com

กำหนดการออก

ปีละ 3 ฉบับ
ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-เมษายน
ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม
ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน-ธันวาคม

Publication

Three issues per year
No. 1 January-April
No. 2 May-August
No. 3 September-December

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
99 หมู่ 18 ตำบลคลองหนึ่ง
อำเภอคลองหลวง
จังหวัดปทุมธานี 12121
โทร. 0-2564-3104-6
โทรสาร 0-2564-3119

Printed at

Printing House of Thammasat
University 99 Moo 18
Klongnueng, Klongluang,
Pathum Thani 12121, Thailand
Tel. 66-2564-3104-6 Fax 66-2564-3119



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

ที่ปรึกษา

รศ. ดร.รัชนา	ศานติยานนท์	ศ. ดร.วีระพงศ์	ปรัชญาสิทธิกุล
ศ. ดร.เวคิน	นพนิตย์	ศ. ดร.วันเพ็ญ	ชัยคำภา
ศ. ดร.วิฑูรย์	ไวยนันท์	ศ. นพ.ยง	ภูววรรณ
ศ. ดร.ประมวญ	เทพชัยศรี	ผศ. เลอสรวง	ชวณิชย์
นายสมชัย	เจตเสริมอนันต์	ดร. สลักจิต	ชุดิพงษ์วิเวท

อดีตนายกสมาคม

ศ. ดร.พรทิพย์	โล่ห์เลขา	รศ. กุลนารี	สิริสาดี
รศ. ดร.ปราณี	ลิ้นจี่ชัย	น.ส. ทศนีย์	สกุลดำรงค์พานิช
รศ. ดร.กำพล	รุจิวิเศษ		

บรรณาธิการ

รศ. สมชาย	วิริยะยุทธกร	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
-----------	--------------	-----------------------

รองบรรณาธิการ

รศ. ดร.ไพโรจน์	ศิริพฤกษ์พงษ์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.นริสา	เก่งตรง บดีรัฐ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.อรุณี	อิงคกุล	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ. ดร.สว่าง	เพชรวิเศษ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.เอนก	ภูทอง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
นายบุญช่วย	เอี่ยมโกศลภ	กรมควบคุมโรค

คณะบรรณาธิการ

ศ. ดร.ศรีสินี คุสมิทธิ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.วัชร กสิณฤกษ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.สมพนธ์ วรรณวิมลรักษ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา	มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะบรรณาธิการ

ศ. พลตรีหญิง ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศ. ดร.วันชัย มาลีวงษ์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.สาคร พรประเสริฐ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.สุพรรณ ฟู่เจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
รศ. พรรณี พิเดช	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. พญ.จิราพร สิทธิถาวร	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
รศ. ดร.สุดา ลุยศิริโรจนกุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. ดร.จินตนา จิรถาวร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. อิสยา จันทรวีทยานุชิต	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
รศ. ดร.กาญจนา สุริยะพรหม	มหาวิทยาลัยรังสิต
รศ. ดร.เกรียงไกร กิจเจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ศิริพร ปรุณวิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. พิศิษฐ์ นามจันทรา	มหาวิทยาลัยรังสิต
ผศ. ดร.ปาลนี อัมรานนท์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.สุดาวดี คงขำ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.ไฉ่มกด์ ช่างศรี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อ. ทศนีย์ สกุดดำรงพานิช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. ดร.พิริยาภรณ์ จงตระกูล	มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้จัดการ

นางรณพร ประสงค์สุข



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

Advisors

Assoc. Prof. Dr. Rachana Santiyanont
Prof. Dr. Waykin Nopanitaya
Prof. Dr. Vithoon Viyanant
Prof. Dr. Pramuan Tapchaisri Asst.
Mr. Somchai Jeadsermanant

Prof. Dr. Virapong Prachayasittikul
Prof. Dr. Wanpen Chaicumpa
Prof. Dr. Yong Poovorawan
Prof. Lersuang Chavanich
Dr. Salakchit Chutipongvivate

Former Editors

Prof. Dr. Porntip Lolekha
Assoc. Prof. Dr. Pranee Leechanachai
Assoc. Prof. Dr. Kampol Ruchiwit

Assoc. Prof. Kulnaree Sirisalee
Miss Tasanee Sakuldamrongpanich

Editor

Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn

Thammasat University

Associate Editor

Assoc. Prof. Dr. Pilaiwan Siripurkpong
Asst. Prof. Dr. Narisa Kengtrong Bordeerat
Asst. Prof. Dr. Arunee Engkagul
Dr. Sawang Petvises
Asst. Prof. Dr. Anek Pootong
Mr. Boonchuay Eampokalap

Thammasat University
Thammasat University
Kasetsart University
Thammasat University
Thammasat University
Department of Diseases Control

Editorial Board

Prof. Dr. Srisin Khusmith
Prof. Dr. Watchara Kasinrerak
Prof. Dr. Pa-thai Yenchitsomanus
Prof. Dr. Sompon Wanwimolruk
Prof. Dr. Chartchalerm Isarankura Na Ayadhya

Mahidol University
Chiang Mai University
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University

Editorial Board

Prof. Maj Gen Dr. Oytip Na Thalang	Thammasat University
Prof. Dr. Wanchai Maleewong	Khon Kaen University
Prof. Dr. Sakorn Pornprasert	Chiang Mai University
Prof. Dr. Supan Fucharoen	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
Assoc. Prof. Phannee Pidetcha	Mahidol University
Assoc. Prof. Dr. Jiraporn Sitithavorn	Maharakham University
Assoc. Prof. Dr. Suda Louisirirochanakul	Mahidol University
Assoc. Prof. Dr. Parvapan Bhattarakosol	Chulalongkorn University
Assoc. Prof. Dr. Chintana Chirathaworn	Chulalongkorn University
Assoc. Prof. Dr. Pitak Santanirand	Mahidol University
Assoc. Prof. Isaya Janwithayanuchit	Huachiew Chalermprakiet University
Assoc. Prof. Dr. Kanjana Suriyaprom	Rangsit University
Assoc. Prof. Dr. Kriengkrai Kitcharoen	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Siriporn Proungvitaya	Khon Kaen University
Asst. Prof. Pisit Namjuntra	Rangsit University
Asst. Prof. Dr. Palanee Ammaranond	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Tewin Tencomnao	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Viroj Boonyaratanakornkit	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Kanyanat Piumngam	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Dujdao Songthammawat	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Sudawadee Kongkham	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Khaimuk Changsri	Thammasat University
Lecturer Tasanee Sakuldamrongpanich	Chulalongkorn University
Dr. Piriaporn Chongtrakool	Mahidol University

Manager

Mrs. Ranaporn Prasongsook

Editorial Statement:

The statements and opinions made in the articles in this journal are the personal views of the authors and are the sole responsibilities of the authors and not of the Editorial Board of the Journal of the Medical Technologist Association of Thailand and the Association of Medical Technologist of Thailand



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

คณะกรรมการบริหารสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย พ.ศ. ๒๕๖๑-๒๕๖๔

EXECUTIVE BOARD OF AMTT 2018-2021

นายกสมาคม	ดร.ทนพญ.สลักจิต ชุตติพงษ์วิเวท	Dr. Salakchit Chutipongvivate	President
ที่ปรึกษา	รศ.ทนพ.สมชาย วิริยะยุทธกร	Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn	Consultants
และบรรณาธิการ			and Editor
ที่ปรึกษา	ศ.ดร.เพพาย เย็นจิตโสมนัส	Prof Dr. Pa-thai Yenchitsomanus	Consultants
ที่ปรึกษา	ทนพญ.สุจิตรา มานะกุล	Sujitra Manakul	Consultants
ที่ปรึกษา	ทนพ.ภาคภูมิ เดชหัสดิน	Parkphum Dejhsutsadin	Consultants
อุปนายกคนที่ ๑	รศ.ทนพญ.พรรณี พิเดช	Assoc. Prof. Phannee Pidetcha	Vice-president
อุปนายกคนที่ ๒	ทนพญ.จริยา ผดุงพัฒน์	Jariya Phadungpattanodom	Vice-president
และเหรัญญิก			and Treasurer
เลขาธิการ	ทนพญ.สุธาทิพย์ อนันต์	Suthatip Anun	Secretary general
วิชาการ	ศ.ดร.ทนพ.สุพรรณ ฟุเจริญ	Prof. Dr. Supan Fucharoen	Scientific chairman
การเงินและบัญชี	ทนพญ.อุมาพร ทรัพย์เจริญ	Umaporn Subcharoen	Finance and Accounting
วิเทศสัมพันธ์	ทนพญ.กัลยาณี ศรีสุวรรณ	Kallayanee Treesuwan	International Affairs
นายทะเบียน	ทนพญ.เทียมจันทร์ เกี่ยวการค้า	Tiemjan Keowkarnkah	Registrar
สวัสดิการ	ดร.ทนพ.มณี เดชวิริยะ	Dr. Manee Tachaviriya	Social welfare
ประชาสัมพันธ์	ดร.ทนพ.ชนสาร ศิริรัตน์	Dr. Thanasan Sirirat	Public relations
กรรมการกลาง	พล.ต.หญิง ทนพญ.อัครมนต์ บุณสมภพ	Pol Maj Gen Ucharamont Buranasompop	Committee
กรรมการกลาง	ทนพ.สุรศักดิ์ มาพฤกษา	Surasak Mapuksa	Committee
กรรมการกลาง	ทนพญ.จุไรรัตน์ รัตนเลิศนาวิ	Jurairat Rattanalertnavee	Committee
กรรมการกลาง	ทนพ.นิตินันท์ น้อยจันต์	Nitat Noichanad	Committee
กรรมการกลาง	ดร.ทนพ.ทรงราชย์ ไชยญาติ	Dr. Songrach Chaiyad	Committee

สมาชิกท่านใด ย้ายที่อยู่ หรือไม่ได้รับเอกสาร กรุณาติดต่อ

สำนักงานสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

โทร. 0-2948-5757-9 โทรสาร. 0-2948-5758

Email: ranaporn.pra@gmail.com



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

หนังสือสัญญาลงแจ้งความโฆษณา

วันที่

ข้าพเจ้า (นาย/นาง/นางสาว)

ในนามของ (ห้างหุ้นส่วน/บริษัท)

ตั้งอยู่บ้านเลขที่ ตรอก/ซอย ถนน

ตำบล/แขวง อำเภอ/เขต จังหวัด

โทรศัพท์..... โทรสารโทรศัพท์มือถือ

อีเมล.....

มีความประสงค์จะลงแจ้งความโฆษณาใน “วารสารเทคนิคการแพทย์” เป็นระยะเวลา 1 ปี จำนวน 3 ฉบับ โดยลงแจ้งความโฆษณาประเภท

○ ปกหลังด้านนอกสี	อัตรา 18,000 บาท/ฉบับ	รวม 54,000 บาท/ปี
○ ปกหน้าด้านในสี	อัตรา 12,000 บาท/ฉบับ	รวม 36,000 บาท/ปี
○ ปกหลังด้านในสี	อัตรา 12,000 บาท/ฉบับ	รวม 36,000 บาท/ปี
○ เติมน้ำด้านในสี	อัตรา 9,000 บาท/ฉบับ	รวม 27,000 บาท/ปี

ตั้งแต่ฉบับที่ ปี

รวมทั้งสิ้นเป็นเงิน บาท ตัวอักษร (.....)

จำนวนพิมพ์ครั้งละ 500 ฉบับ

(ลงนาม)

(.....)

(ตำแหน่ง)

หมายเหตุ การชำระค่าโฆษณาให้จ่ายเป็นเช็คในนาม “สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย”

วารสารเทคนิคการแพทย์

ฝ่ายบรรณาธิการ รศ.สมชาย วิริยะยุทธกร สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

เลขที่ 6 ซอยรามอินทรา 52/1 ถนนรามอินทรา แขวง/เขตคันนายาว กรุงเทพฯ 10230

โทร. 0-2948-5757 โทรสาร 0-2948-5758 โทรศัพท์มือถือ 08-1919-2312, 08-8681-1581

อีเมล: jmt.amtt2016@gmail.com

School-age Children Obesity: Causes and Prevention

Suwit Klongthalay^{1*}, Kanjana Suriyaprom¹, and Chutima Sirikulchayanonta²

¹*Faculty of Medical Technology, Rangsit University, Pathum Thani Province, Thailand*

²*College of Medicine, Rangsit University, Bangkok, Thailand*

Abstract

This article aimed to discuss the basics of obesity in school-age children and the policies for preventing obesity in Thailand and other countries. The tendency of prevalence in childhood obesity is rising worldwide. For example, the prevalence in United States of America in 2015 - 2016 was 18.4% whereas Thailand in 2014 was 13.9%. School-age children with obesity are more likely to become obese adults with increasing chances of developing adverse psychological, social, and health consequences such as cardiovascular disease, dyslipidemia, diabetes, hypertension and low self-esteem. Obesity is caused by multiple factors, including genetics, behavior, and environmental factors. Previous studies have assessed the relationship between obesity and various circulating adipokines secreted by adipocytes to serve as biomarker of obesity. However, the prevention of obesity will be easier than treating obesity after it has already developed. The preventive policies for obesity including sugary drink tax and front of package labelling currently used in some countries, have not been definitely evaluated. Hence, the comprehensive prevention and management of obesity with the incorporation of all sectors, including children, parents, and government agencies may sustain a reduction in the prevalence of obesity especially in childhood.

Keywords: Obesity, School-age children, Prevention

*Corresponding author E-mail address: suwit.k@rsu.ac.th

โรคอ้วนในเด็กวัยเรียน: สาเหตุและการป้องกัน

สุวิทย์ คล่องทะเล^{1*} กาญจนา สุริยะพรหม¹ และ ชุตินา ศิริกุลชยานนท์²

¹คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี

²วิทยาลัยแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

บทความนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่ออธิบายถึงพื้นฐานของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน และนโยบายการป้องกันโรคอ้วนในประเทศไทยและประเทศต่าง ๆ ปัจจุบัน ความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนมีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วโลก เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา มีความชุกในปี พ.ศ. 2558 - 2559 เท่ากับร้อยละ 18.4 ส่วนประเทศไทยมีความชุกในปี พ.ศ. 2557 เท่ากับร้อยละ 13.9 เด็กวัยเรียนที่เป็นโรคอ้วนมีแนวโน้มที่จะเป็นผู้ใหญ่ที่เป็นโรคอ้วน รวมทั้งเพิ่มโอกาสทำให้เกิดผลเสียที่ตามมาทั้งทางด้านจิตใจ สังคมและสุขภาพ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด ไขมันในเลือดผิดปกติ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคอ้วนมีสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกันทั้งด้านพันธุกรรม พฤติกรรมและสภาพแวดล้อม ปัจจุบันได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโรคอ้วนกับระดับอะดิโปไคน์หลายชนิด ซึ่งหลังจากเซลล์ไขมัน เพื่อจะนำมาใช้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคอ้วน อย่างไรก็ตาม การป้องกันโรคอ้วนจะสามารถทำได้ง่ายกว่าการรักษาหลังจากที่พัฒนาจนเกิดเป็นโรคอ้วนแล้ว นโยบายการป้องกันโรคอ้วนที่มีการดำเนินการในปัจจุบัน เช่น การเก็บภาษีความหวาน การแสดงฉลากโภชนาการด้านน้ำตาลบรรจุภัณฑ์ที่มีการใช้ในบางประเทศ ยังขาดการประเมินผลที่ชัดเจน ดังนั้น การป้องกันโรคอ้วนอย่างครอบคลุมด้วยการร่วมมืออย่างมีประสิทธิภาพของทุกภาคส่วน รวมถึงเด็ก ผู้ปกครองและหน่วยงานของรัฐ อาจสามารถทำให้ความชุกของโรคอ้วนโดยเฉพาะในเด็กวัยเรียนมีการลดลงอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: โรคอ้วน เด็กวัยเรียน การป้องกัน

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: suwit.k@rsu.ac.th

รับบทความ: 1 ตุลาคม 2563

แก้ไขบทความ: 24 พฤศจิกายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 21 ธันวาคม 2563

1. บทนำ

เด็กวัยเรียนหมายถึงเด็กที่มีอายุในช่วง 6-12 ปี ซึ่งมีความสามารถในการเรียนรู้ทุกด้าน ปัญหาทางสุขภาพอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสังคมและวิถีการดำเนินชีวิต อาจส่งผลกระทบต่อพัฒนาการการเรียนรู้ของเด็กได้ โดยโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทยและประเทศอื่นทั่วโลก เนื่องจากความชุกของโรคอ้วนมีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วโลก⁽¹⁾ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ตั้งเป้าหมายให้ปี พ.ศ. 2568 จะต้องไม่มีการเพิ่มขึ้นของภาวะน้ำหนักเกินในเด็ก⁽²⁾ ซึ่งภาวะน้ำหนักเกินและโรคอ้วนในเด็กสามารถวินิจฉัยได้จากน้ำหนักตามเกณฑ์ส่วนสูง (weight for height) หากน้ำหนักตัวของเด็กสูงกว่าค่ามัธยฐานของน้ำหนักตามเกณฑ์ส่วนสูงเกิน 2 เท่าถึง 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ถือว่ามีภาวะน้ำหนักเกิน แต่หากมีน้ำหนักสูงเกิน 3 เท่า จะถือว่าเป็นโรคอ้วน⁽³⁾ โรคอ้วนมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยร่วมกันทั้งปัจจัยจากพันธุกรรม พฤติกรรมและสภาพแวดล้อม ปัจจุบันพบว่าระดับของสารอะดิโปไคน์มีความเกี่ยวข้องกับโรคอ้วน การตรวจวัดระดับของสารอะดิโปไคน์จึงสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคอ้วนได้ เด็กที่เป็นโรคอ้วน มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นที่จะเป็นโรคอ้วนในวัยผู้ใหญ่ เมื่อเทียบกับเด็กที่มีน้ำหนักปกติ⁽⁴⁾ โรคอ้วนทำให้เกิดปัญหากับเด็กในวัยเรียนได้ทั้งด้านสุขภาพร่างกาย สังคมและจิตใจ⁽⁵⁾ ในด้านสุขภาพร่างกาย โรคอ้วนมีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ เช่น โรคไขมันพอกตับ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคหอบหืด โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคไขมันในเลือดผิดปกติ โรคความดันโลหิตสูง โรคนิ่วในถุงน้ำดี⁽⁴⁻⁶⁾ ส่วนด้านสังคมและจิตใจ ทำให้เด็กขาดความเชื่อมั่นในตนเอง มีความพึงพอใจในตนเองต่ำ อาจทำให้เกิดโรคซึมเศร้าและการใช้สารเสพติดได้⁽⁷⁾ การตระหนักถึงความ

สำคัญของโรคอ้วนและจัดหาวิธีการป้องกัน จึงเป็นเรื่องสำคัญเร่งด่วนที่ต้องดำเนินการ เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาในอนาคต อันจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของเด็กและผลกระทบต่อสังคมโดยรวม

2. ความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน

2.1 ความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนในต่างประเทศ

ปัจจุบันความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนมีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วโลก เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2558 - 2559 มีความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน (อายุ 6-11 ปี) เท่ากับร้อยละ 18.4 ซึ่งสูงขึ้นจากปี พ.ศ. 2542 - 2543 ที่มีความชุกเท่ากับร้อยละ 15.3⁽⁸⁾ การศึกษาในเด็กวัยเรียนชาวปาเลสไตน์ในปี พ.ศ. 2560 พบความชุกของโรคอ้วนร้อยละ 15.7 ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจาก พ.ศ. 2547 ที่มีความชุกร้อยละ 3.2⁽⁹⁾ ส่วนประเทศญี่ปุ่นมีแนวโน้มความชุกลดลง เมื่อเทียบกับประเทศอื่นที่อยู่ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาและประเทศพัฒนาแล้ว⁽¹⁰⁾ โดยใน พ.ศ. 2559 มีความชุกของโรคอ้วนในเด็กอายุ 5 - 9 ปี เท่ากับร้อยละ 5.0⁽¹¹⁾ สำหรับความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนในประเทศต่างๆ แสดงใน Table 1 ดังนั้นจึงพออนุมานได้ว่า ความชุกของโรคอ้วนแตกต่างกันไปตามแต่ละสัญชาติ เชื้อชาติและสถานะทางเศรษฐกิจและสังคม คนผิวดำและฮิสพานิก (Hispanics) มีความชุกของโรคอ้วนมากกว่าคนผิวขาว (non-Hispanic white)⁽¹²⁾ ขณะที่ประชากรที่มีรายได้ต่ำมีแนวโน้มความชุกของโรคอ้วนมากกว่ากลุ่มที่มีรายได้สูงหรือปานกลาง ความชุกของโรคอ้วนยังลดลงในผู้ที่มีการศึกษาสูงอีกด้วย⁽¹³⁾ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการที่ประชากรที่มีรายได้ต่ำมีโอกาสเลือกซื้อและบริโภคอาหารที่ดีต่อสุขภาพได้น้อย

Table 1 Worldwide prevalence of school-age children obesity

Continent/Country	Age (years)	Prevalence (%)	Year
North America			
United states of America	6 - 11	18.4	2015 - 2016 ⁽¹⁴⁾
Mexico	5 - 9	17.5	2016 ⁽¹¹⁾
Canada	5 - 9	14.2	2016 ⁽¹¹⁾
South America			
Brazil	5 - 9	15.1	2016 ⁽¹¹⁾
Chile	5 - 9	18.7	2016 ⁽¹¹⁾
Argentina	5 - 9	21.7	2016 ⁽¹¹⁾
Europe			
England	10 - 11	20.2	2018 - 2019 ⁽¹⁵⁾
Russia	5 - 9	10.9	2016 ⁽¹¹⁾
Germany	5 - 9	11.4	2016 ⁽¹¹⁾
Africa			
Egypt	5 - 9	21.8	2016 ⁽¹¹⁾
Algeria	5 - 9	16.5	2016 ⁽¹¹⁾
South Africa	5 - 9	11.4	2016 ⁽¹¹⁾
Oceania			
Australia	5 - 17	8.1	2017 - 2018 ⁽¹⁶⁾
New Zealand	5 - 9	18.7	2016 ⁽¹¹⁾
Asia			
Singapore	5 - 9	9.5	2016 ⁽¹¹⁾
China	5 - 9	17.5	2016 ⁽¹¹⁾
Saudi Arabia	5 - 9	18.5	2016 ⁽¹¹⁾

2.2 ความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทย ภาวะน้ำหนักเกินและโรคอ้วนในวัยเรียนเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยผลการสำรวจสุขภาพประชาชนไทยโดยการตรวจร่างกาย ครั้งที่ 5 เมื่อ พ.ศ. 2557 พบว่า ภาวะน้ำหนักเกินและอ้วนของเด็กในวัยเรียน (อายุ 6 - 14 ปี) คิดเป็นร้อยละ 13.9 โดยเฉพาะเด็กที่อยู่ในเขตเทศบาลมีความชุกสูงถึงร้อยละ 16.6⁽¹⁷⁾ ขณะที่การสำรวจสุขภาพประชาชนไทยโดยการตรวจร่างกาย ครั้งที่ 4 ในปี พ.ศ. 2551 - 2552 พบว่า เด็กในวัยเรียนมีภาวะน้ำหนักเกินและอ้วนร้อยละ 9.7⁽¹⁸⁾ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปัญหาโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทั้งกับตัวเด็ก ครอบครัว และสังคมโดยรวมต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ จากรายงานการวิจัยที่ศึกษาความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน (อายุ 6 - 18 ปี) ที่อาศัยในจังหวัดจะเชิงเตราและจังหวัดสระแก้วในปี พ.ศ. 2559 พบว่า มีค่าเท่ากับร้อยละ 7.26⁽¹⁹⁾ ส่วนในปี พ.ศ. 2561 ความชุกของโรคอ้วนในเด็กนักเรียนชั้นประถมศึกษาของโรงเรียนในกรุงเทพมหานคร สังกัดสำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน (สพฐ.) ที่เข้าร่วมโครงการเด็กไทยคู่ดี มีพลานามัย มีค่าเท่ากับร้อยละ 15.1 ส่วนในโรงเรียนเอกชนมีความชุกเท่ากับร้อยละ 16.2 เป็นที่น่าสนใจว่าความชุกของโรคอ้วนในเด็กนักเรียนระดับมัธยมศึกษา มีแนวโน้มสูงกว่าในระดับประถมศึกษาทั้งโรงเรียนในสังกัด สพฐ. และเอกชน โดยเฉพาะโรงเรียนเอกชนที่มีความชุกสูงถึงร้อยละ 27.0⁽²⁰⁾

3. พยาธิสรีรวิทยาของโรคอ้วน

โรคอ้วนเกิดจากความไม่สมดุลของการได้รับพลังงานกับการใช้พลังงาน ทำให้มีพลังงานเหลือมากกว่าที่ต้องใช้ในการดำรงชีวิตตามปกติ^(4, 21) ส่งผลให้

มีการสะสมของไขมันตามอวัยวะต่างๆ มากกว่าปกติ โรคอ้วนในเด็กวัยเรียนมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยจากพันธุกรรม ปัจจัยจากพฤติกรรม และปัจจัยจากสภาพแวดล้อม⁽⁴⁾

3.1 ปัจจัยจากพันธุกรรม

เด็กที่เป็นโรคทางพันธุกรรมมักมีอาการของโรคอ้วนตั้งแต่แรก และมีลักษณะเฉพาะของความผิดปกตินั้นๆ เช่น ตัวสั้น ใบหน้าผิดปกติ การเจริญเติบโตช้า ภาวะพร่องทางสติปัญญา⁽²²⁾ กลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลี (Prader-Willi syndrome) เป็นความผิดปกติที่ทำให้เกิดโรคอ้วนได้บ่อยและเกี่ยวข้องกับหลายระบบ อาการที่ปรากฏ เช่น ตัวอ่อนปวกเปียก (hypotonia) มีความผิดปกติของฮอร์โมนหลายระบบ รับประทานอาหารลำบาก (feeding difficulties) ตั้งแต่วัยทารก จนมีอาการรับประทานอาหารมากกว่าปกติ ขาดความรู้สึกอิ่ม และพัฒนาจนกลายเป็นโรคอ้วน⁽²³⁾ ปัจจุบัน มีการรายงานว่าความผิดปกติชนิดอื่นเดียวที่ทำให้เกิดโรคอ้วนได้บ่อย คือ การกลายพันธุ์ของตัวรับเมลานอคอร์ติน 4 (melanocortin 4 receptor)⁽²²⁾ ซึ่งเป็นตัวรับที่อยู่ในไฮโปทาลามัสและระบบประสาทส่วนกลาง มีบทบาทควบคุมความอยากอาหารและสมดุลของพลังงาน⁽²⁴⁾ ภาวะผิดปกติของตัวรับนี้ จะส่งผลให้มีความอยากอาหารมากขึ้น ระดับอินซูลินในเลือดสูงและเป็นโรคอ้วน^(24, 25) นอกจากนี้ ยังมียีนอื่นที่ผิดปกติ เช่น เลปติน (leptin), ตัวรับเลปติน (leptin receptor) และโปรพีโอเมลานอคอร์ติน (propiomelanocortin)^(22, 26)

3.2 ปัจจัยจากพฤติกรรม

ปัจจัยจากพฤติกรรม ได้แก่ การดื่มและรับประทานอาหารที่มีพลังงานและความหวานสูง เช่น อาหารฟาสต์ฟู้ด ขนมกรุบกรอบ เครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ การมีพฤติกรรมเนือยนิ่ง (sedentary lifestyle) หรือใช้เวลาว่างไปกับเทคโนโลยี

เช่น คอมพิวเตอร์ เกม โทรศัพท์มือถือ โทรทัศน์ รวมทั้งขาดการออกกำลังกาย เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคอ้วนได้^(4, 27)

3.3 ปัจจัยจากสภาพแวดล้อม

เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยจากสภาพแวดล้อม สังคมโดยรอบของเด็ก ได้แก่ ครอบครัว โรงเรียน ชุมชน ล้วนส่งผลต่อการเกิดโรคอ้วนในเด็ก⁽⁴⁾ การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า เด็กที่มีบ้านอยู่ใกล้กับสถานที่นันทนาการสาธารณะ (public recreation) ในระยะ 500 เมตร มีแนวโน้ม BMI z score ต่ำกว่าเด็กที่อยู่ไกลกว่า⁽²⁸⁾ นอกจากนี้ การอยู่ใกล้กับร้านอาหารจานด่วน มีผลทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะน้ำหนักเกินและโรคอ้วน^(29, 30) จึงเห็นได้ว่าปัจจัยจากสภาพแวดล้อมเป็นตัวกำหนดพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่เป็นประโยชน์และโอกาสในการออกกำลังกายของเด็ก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วน

4. ความสัมพันธ์ของสารอะดิพอไคน์ในเลือดกับโรคอ้วน

สารอะดิพอไคน์ในเลือดมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วน โดยทั่วไปเซลล์ไขมันนอกจากจะทำหน้าที่ในการสะสมพลังงานส่วนเกินโดยจะเก็บไว้ในรูปของไขมันไตรกลีเซอไรด์แล้ว เซลล์ไขมันยังสามารถหลั่งสารอะดิพอไคน์ (adipokines) ชนิดต่างๆ เช่น อะดิพอนεκติน (adiponectin) รีซิสติน (resistin) และเลปติน (leptin) โดยสารอะดิพอไคน์ที่หลั่งมาจากเซลล์ไขมันนี้ จะทำหน้าที่ควบคุมสมดุลพลังงานภายในร่างกายให้อยู่ในสภาวะปกติ อย่างไรก็ตาม เซลล์ไขมันเป็นเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงขนาดได้ ดังนั้นการที่เซลล์ไขมันสามารถเพิ่มจำนวนและขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้นได้ จะส่งผลให้การรักษามวลต่างๆ ของเซลล์ และรูปแบบของการหลั่งสารชนิดต่างๆ เปลี่ยนแปลงไป เมื่อเทียบกับเซลล์ไขมันที่มีขนาดปกติ⁽³¹⁾ ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพ

ต่างๆ ตามมาได้ ดังนั้น การตรวจวัดระดับสารอะดิพอไคน์จึงมีประโยชน์ในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอีกชนิดหนึ่งในการประเมินประสิทธิภาพการรักษาโรคอ้วน⁽³²⁾ บทความนี้จะอธิบายถึงความสัมพันธ์ของโรคอ้วนกับระดับสารอะดิพอไคน์ในเลือด 2 ชนิดคือ อะดิพอนεκตินและเลปติน

4.1 อะดิพอนεκติน

อะดิพอนεκตินสร้างจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 3q27 มีขนาด 17 กิโลเบส ประกอบด้วย 3 เอ็กซอน โดยอะดิพอนεκติน จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาลและไขมันในเซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อลาย และเซลล์ไขมัน อะดิพอนεκตินเป็นสารที่มีสมบัติช่วยทำให้ร่างกายเพิ่มความไวต่ออินซูลิน (insulin-sensitizing agent) ลดการผลิตกลูโคส และช่วยกระตุ้นการทำงานของอินซูลินที่ตับ⁽³³⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลในหลอดทดลองที่สนับสนุนว่าเมื่อเติมสารอะดิพอนεκตินลงในเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ตับจะช่วยกระตุ้นกระบวนการนำกลูโคสเข้าเซลล์ได้เพิ่มขึ้น ลดกระบวนการสร้างกลูโคสจากสารที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตในกระบวนการกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ที่ตับ และลดการสะสมไขมันไตรกลีเซอไรด์ที่กล้ามเนื้อลายและตับ ส่งผลให้เซลล์มีความไวต่ออินซูลินเพิ่มขึ้น อันเนื่องมาจากการกระตุ้นกระบวนการบีตาออกซิเดชัน (β -oxidation) เพิ่มขึ้น และอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ของอะดิพอนεκตินผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ 5-AMP-activated protein kinase (AMPK)⁽³⁴⁾ นอกจากนี้ อะดิพอนεκตินยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการบีตาออกซิเดชัน ในการสลายกรดไขมันและการใช้พลังงานผ่านทางกระตุ้น PPAR- α ซึ่งนำไปสู่การลดลงของปริมาณไขมันไตรกลีเซอไรด์ที่สะสมอยู่ในเซลล์ตับและกล้ามเนื้อลาย จากผลดังกล่าวจึงเป็นการส่งเสริมให้เซลล์ต่างๆ มีความไวต่ออินซูลินเพิ่มขึ้น⁽³⁵⁾ (Fig. 1) ดังนั้นการทำงานของ

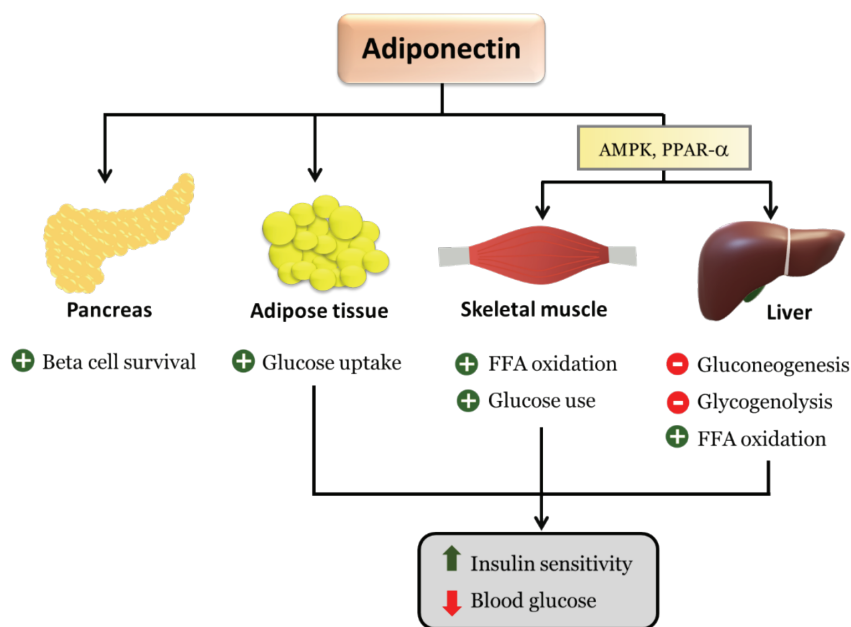


Fig. 1 Metabolic pathway of adiponectin (Modified from Balsan GA, *et al.*, Rev Assoc Med Bras 2015 and Yanai H, *et al.*, Int J Mol Sci 2019)^(40, 41) FFA, free fatty acid; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; PPAR- α , peroxisome proliferator-activated receptor- α .

อะดิโปเนคตินที่มีต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมันและน้ำตาลจะผ่านทาง AMPK และ PPAR- α การศึกษาในคนพบว่าระดับอะดิโปเนคตินมีความแตกต่างกันระหว่างเพศหญิงและเพศชาย โดยเพศหญิงจะมีระดับอะดิโปเนคตินในกระแสเลือดสูงกว่าเพศชาย ประมาณร้อยละ 40 ทั้งนี้ เนื่องมาจากผลของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในชาย⁽³⁶⁾ ในคนที่มีสุขภาพดีสามารถพบระดับอะดิโปเนคตินในพลาสมาประมาณ 5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการศึกษาในเด็กอ้วนชาวอียิปต์⁽³⁷⁾ และชาวโรมาเนีย⁽³⁸⁾ ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกันคือระดับอะดิโปเนคตินจะต่ำในเด็กอ้วน เมื่อเปรียบเทียบกับเด็กที่มีน้ำหนักตัวปกติ รวมทั้งระดับอะดิโปเนคตินยังมีความสัมพันธ์ไปในทางตรงกันข้ามกับเส้นรอบเอว ความดันโลหิต ไขมันไตรกลีเซอไรด์ และระดับน้ำตาลในเลือด แต่มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับระดับเอชดีแอล

คอเลสเตอรอล (HDL-C) ดังนั้นในคนอ้วนจะมีระดับอะดิโปเนคตินต่ำถึงแม้ว่ามีมวลของเนื้อเยื่อไขมันที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในชาวไทย⁽³⁹⁾ ที่แสดงให้เห็นว่าผู้ใหญ่ที่มีน้ำหนักเกินและอ้วนจะมีระดับอะดิโปเนคตินต่ำกว่าผู้ที่มิสุขภาพดีน้ำหนักปกติ โดยการลดลงของระดับอะดิโปเนคตินในคนอ้วนอาจมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไขมัน และค่าดัชนีมวลกายและระดับน้ำตาลสามารถนำมาใช้เป็นตัวทำนายระดับอะดิโปเนคตินที่ดีในผู้ที่เป็โรคอ้วน โดยภาพรวมอะดิโปเนคตินมีความสัมพันธ์กับภาวะอ้วน และการลดลงของระดับอะดิโปเนคตินจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการนำไปสู่ภาวะดื้อต่ออินซูลิน ดังนั้นผู้ที่มิภาวะอ้วนควรได้รับการส่งเสริมให้ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในการดำเนินชีวิตเพื่อให้มีสุขภาพที่ดี และลดน้ำหนักตัวลง

4.2 เลปติน

เลปตินสร้างมาจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 7 ตำแหน่งที่ q31.3 โดยยีนมีความยาวประมาณ 20 กิโลเบส ประกอบด้วย 3 เอ็กซอนและ 2 อินทรอน⁽⁴²⁾ เลปตินมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยับยั้งความอยากอาหาร การควบคุมสมดุลพลังงานของร่างกาย ซึ่งจะส่งผลเสริมกระบวนการบีตาออกซิเดชันของกรด

ไขมัน รวมทั้งลดการสะสมไขมันในเซลล์กล้ามเนื้อต่าง ๆ จึงช่วยให้เซลล์มีความไวต่ออินซูลินเพิ่มมากขึ้น⁽⁴³⁾ นอกจากนี้เลปตินยังมีบทบาทในการช่วยลดการสร้างน้ำตาลจากตับ ช่วยให้ร่างกายเพิ่มความไวต่ออินซูลิน (insulin sensitivity) และช่วยลดระดับกลูคากอน⁽⁴⁴⁾ (Fig. 2) อย่างไรก็ตามการหลั่งเลปตินในแต่ละช่วงวันจะไม่เท่ากัน (diurnal variation) โดย

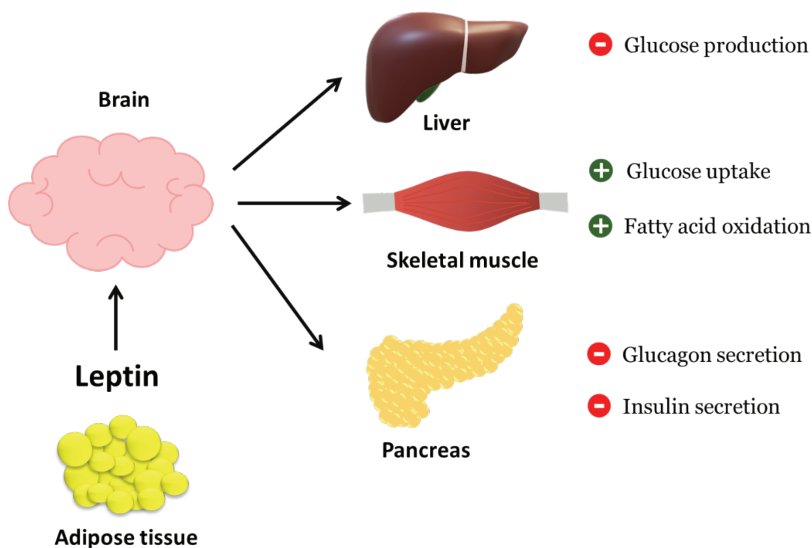


Fig. 2 Metabolic pathway of leptin (Modified from Park H, *et al.*, Metabolism 2015)⁽⁵⁷⁾

มีระดับสูงในช่วงเวลาเย็นและเช้า⁽⁴⁵⁾ จากการศึกษาพบว่า ระดับเลปตินในเพศหญิงและเพศชายมีค่าแตกต่างกัน โดยเพศหญิงมีค่าสูงกว่าเพศชายทั้งวัยเด็กและวัยผู้ใหญ่⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ การศึกษาในคนอ้วนก่อนหน้านี้ พบว่าถึงแม้คนอ้วนจะมีระดับเลปตินสูงในเลือด แต่อาจเกิดภาวะดื้อต่อเลปตินจึงทำให้การทำงานของเลปตินในการกระตุ้นกระบวนการบีตาออกซิเดชันบกพร่อง⁽⁴⁹⁾ ซึ่งภาวะดื้อต่อเลปตินนี้อาจเป็นปัจจัยเริ่มต้นที่ส่งผลให้มีการสะสมไขมันภายในกล้ามเนื้อ และทำให้พัฒนาไปสู่ภาวะดื้อต่ออินซูลินตามมา เพราะมากกว่าร้อยละ 80 ที่กล้ามเนื้อลายจะมีการกระตุ้นการนำเข้าน้ำตาลโดยอาศัยอินซูลิน

(insulin-stimulated glucose uptake) ถ้ามีความผิดปกติในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดไขมันหรือมีการสะสมไขมันในกล้ามเนื้อลายมาก จะทำให้ความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลินและการนำน้ำตาลเข้าเซลล์ตามมา ส่วนผลการศึกษาในเด็กและวัยรุ่นชาวไทยได้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อภาวะน้ำหนักเกิน (มีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันของดัชนีมวลกายตามอายุมากกว่า 85 ถึง 95) และกลุ่มที่มีน้ำหนักเกิน (มีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันของดัชนีมวลกายตามอายุมากกว่า 95) มีระดับเลปติน ไขมันคอเลสเตอรอลรวม และไขมันไตรกลีเซอไรด์สูง ขณะที่ระดับตัวรับเลปติน และไขมันเฮชดีแอล คอเลสเตอรอลต่ำกว่ากลุ่มที่มี

น้ำหนักตัวปกติ และการมีค่าดัชนีมวลกายเพิ่มขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเลปตินในเลือดสูง โดยในเพศหญิงจะมีความเสี่ยงของการเกิดภาวะเลปตินในเลือดสูงมากกว่าในเพศชาย⁽⁵⁰⁾ ซึ่งผลของความแตกต่างทางเพศต่อระดับเลปติน อาจเกิดจากความแตกต่างทางส่วนประกอบของร่างกายและการกระจายตัวของไขมันหรือผลของฮอร์โมนเพศต่อการผลิตเลปติน เช่น โปรเจสเตอโรน เอสโตรเจน และแอนโดรเจน⁽⁵¹⁾ จากผลการศึกษาระดับเลปตินในเด็กอ้วนชาวฝรั่งเศส⁽⁵²⁾ และชาวบราซิล⁽⁵³⁾ พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับเด็กชาวไทย นอกจากนี้ผลการศึกษาของ Considine ที่เกี่ยวกับการลดน้ำหนักได้แสดงให้เห็นว่าถ้ามีการลดน้ำหนักตัวลงไปร้อยละ 10 จะมีผลทำให้ลดการผลิตเลปตินลงไปร้อยละ 50 แต่เมื่อมีการรักษาระดับของการลดน้ำหนักตัวให้คงที่ไว้ได้ จะสามารถช่วยลดระดับเลปตินลงได้ถึงร้อยละ 70 อย่างไรก็ตามผลที่ตามมาคือ ผู้ลดน้ำหนักจะมีความอยากอาหารเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการลดน้ำหนัก ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตเลปตินน้อยลงจากการลดน้ำหนัก และอาจเป็นผลที่สะท้อนมาจากการลดปริมาณเนื้อเยื่อไขมัน⁽⁵⁴⁾ จากหลักฐานการศึกษาพบการบริโภคอาหารโดยเฉพาะในกลุ่มที่ให้พลังงานจะช่วยกระตุ้นการหลั่งเลปติน ผ่านทางการทำหน้าที่โดยตรงของอินซูลินต่อเซลล์ไขมัน⁽⁵⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านอาหารกับระดับเลปตินในเด็กนักเรียนชาวไทย พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับเลปตินกับการบริโภคสารอาหารที่ให้พลังงาน แต่ในกลุ่มเด็กอ้วนจะมีระดับเลปติน ไขมันและการบริโภคสารอาหารที่ให้พลังงานสูงกว่าในกลุ่มเด็กที่มีน้ำหนักตัวปกติ⁽⁵⁶⁾ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของระดับเลปตินในคนอ้วนอาจบ่งชี้ถึงการเกิดภาวะดื้อต่อเลปตินและทำให้ความสามารถในการควบคุมน้ำหนักตัวลดลง โดยสาเหตุของการเกิดภาวะ

ดื้อต่อเลปตินในคนอ้วนบางคนอาจเนื่องมาจากปัจจัยด้านพันธุกรรม เช่น การเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของยีนตัวรับเลปติน (LEPR) ทำให้เกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณระหว่างเลปตินและตัวรับเลปติน⁽⁵⁰⁾

5. นโยบายการป้องกันโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน

การป้องกันโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนมีแนวทางดำเนินการได้หลายระดับ ได้แก่ ระดับปฐมภูมิ เป็นการป้องกันในวงกว้าง มีเป้าหมายเพื่อไม่ให้เกิดโรคอ้วน ระดับทุติยภูมิ เป็นการป้องกันเด็กกลุ่มเสี่ยงไม่ให้เกิดโรคอ้วนร่วมกับความผิดปกติอื่น และระดับตติยภูมิ เป็นการควบคุมน้ำหนักของเด็กอ้วนและลดปัญหาจากโรคร่วม⁽⁵⁸⁾ ปี พ.ศ. 2559 องค์การอนามัยโลกได้ให้ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับนโยบายป้องกันโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน เช่น⁽⁵⁹⁾ ส่งเสริมให้เด็กและวัยรุ่นได้บริโภคอาหารที่ดีต่อสุขภาพและลดการบริโภคอาหารที่ไม่ดีต่อสุขภาพและเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (sugar-sweetened beverages) ส่งเสริมให้ออกกำลังกายและลดพฤติกรรมไม่ออกกำลังกาย บุรณาการและให้แนวทางสำหรับการป้องกันโรคในกลุ่มไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable diseases) ด้วยแนวทางปัจจุบันสำหรับการดูแลก่อนตั้งครรภ์ (preconception care) และก่อนคลอด (antenatal care) เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคอ้วนในเด็ก ให้แนวทางและสนับสนุนการบริโภคอาหารสุขภาพ การนอนหลับ และการออกกำลังกายในเด็กปฐมวัยเพื่อให้เด็กเจริญเติบโตอย่างเหมาะสมและมีพัฒนาการทางพฤติกรรมสุขภาพที่ดี (healthy habits) รวมทั้งส่งเสริมให้โรงเรียนมีสภาพแวดล้อมที่ดีต่อสุขภาพ รู้สุขภาพและโภชนาการ (health and nutrition literacy) และการออกกำลังกายในเด็กวัยเรียนและวัยรุ่น

5.1 ตัวอย่างนโยบายป้องกันโรคอ้วนในต่างประเทศ

5.1.1 การกำหนดภาษีความหวาน

การกำหนดภาษีความหวานเป็นมาตรการลดการดื่มเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ มีหลายเมืองและประเทศที่ใช้มาตรการนี้ เช่น ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศเม็กซิโกได้กำหนดภาษีความหวานในเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ส่งผลให้ราคาของน้ำอัดลม เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 11 และยังส่งผลให้อัตราการซื้อเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบลดลงร้อยละ 12 ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 ในทางกลับกัน เครื่องดื่มที่ไม่ถูกเก็บภาษีความหวาน มีอัตราการซื้อเพิ่มขึ้นร้อยละ 4⁽⁶⁰⁾ Falbe และคณะ ได้สำรวจโดยใช้แบบสอบถามถึงผลของการออกกฎหมายภาษีความหวานของเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในเมืองเบิร์กลีย์ (Berkeley) รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งผ่านกฎหมายฉบับนี้ในปี พ.ศ. 2557 เปรียบเทียบกับเมืองที่ยังไม่ผ่านกฎหมายภาษีความหวาน ได้แก่ เมืองโอ๊กแลนด์ (Oakland) และซานฟรานซิสโก รัฐแคลิฟอร์เนีย พบว่า ในเมืองเบิร์กลีย์มีอัตราการบริโภคเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบลดลงร้อยละ 21 แต่เมืองอื่นที่เปรียบเทียบกลับเพิ่มขึ้นร้อยละ 4 ขณะที่อัตราการบริโภคน้ำเปล่าสูงขึ้นถึงร้อยละ 63 ส่วนเมืองอื่นที่นำมาเปรียบเทียบเพิ่มขึ้นร้อยละ 19⁽⁶¹⁾ ในปี พ.ศ. 2558 ประเทศบาร์เบโดส (Barbados) ได้ขึ้นภาษีความหวานร้อยละ 10 ในเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ส่งผลให้ราคาสูงขึ้นประมาณร้อยละ 5.9 ขณะที่ราคาของเครื่องดื่มชนิดอื่นยังคงเท่าเดิม ทำให้อัตราการขายเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบต่อสัปดาห์ลดลงร้อยละ 4.3 ขณะที่เครื่องดื่มชนิดอื่นเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.2⁽⁶²⁾

แม้จะยังไม่มีการศึกษาถึงผลโดยตรงของการขึ้นภาษีความหวานต่อการลดโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน แต่จากการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective

cohort study) ในผู้ชายจำนวน 6,537 คนและผู้หญิงจำนวน 5,324 คนในประเทศสหรัฐอเมริกาที่เข้าร่วมโครงการ Monitoring the Future Surveys (พ.ศ. 2535 - 2546) พบว่า การเพิ่มราคาขึ้น 1 ดอลลาร์สหรัฐอเมริกาของเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบขนาด 2 ลิตรมีความสัมพันธ์กับการลดความน่าจะเป็นโรคอ้วนในผู้ชายร้อยละ 10.8 และผู้หญิงร้อยละ 28.1⁽⁶³⁾ Kristensen และคณะ ได้สร้างแบบจำลอง (Markov microsimulation model) เพื่อศึกษาผลของการใช้นโยบายในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นระยะเวลา 20 ปีต่อการลดโรคอ้วนในเด็ก โดยได้เลือก 3 นโยบายได้แก่ โปรแกรมการออกกำลังกายหลังเลิกเรียน (afterschool physical activity programs) การขึ้นภาษีความหวานในเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 0.01 ดอลลาร์สหรัฐต่อออนซ์ และการห้ามโฆษณาอาหารฟาสต์ฟู้ดทางช่องทีวีสำหรับเด็ก (child-directed fast food TV advertising) ผลการศึกษาพบว่า การขึ้นภาษีความหวานช่วยลดโรคอ้วนในเด็กและวัยรุ่นได้ร้อยละ 1.6 และ 2.4 ตามลำดับ การออกกำลังกายหลังเลิกเรียนช่วยลดโรคอ้วนในเด็กและวัยรุ่นได้ร้อยละ 1.8 และ 1.9 ตามลำดับ และการห้ามโฆษณาอาหารฟาสต์ฟู้ด ช่วยลดโรคอ้วนในเด็กและวัยรุ่นได้เกือบร้อยละ 1 ทั้ง 3 นโยบายล้วนมีผลลดความชุกของโรคอ้วน โดยเฉพาะในคนผิวดำและฮิสพานิก ซึ่งมีความชุกของโรคอ้วนสูง⁽⁶⁴⁾ การศึกษาของ Schwendicke และ Stolpe โดยใช้แบบจำลองเพื่อศึกษาผลของการขึ้นภาษีความหวานในอัตราร้อยละ 20 ในเครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในประชากรชาวเยอรมันอายุ 15 - 79 ปี ผลจากการศึกษาพบว่า การขึ้นภาษีความหวานช่วยลดดัชนีมวลกายในกลุ่มประชากรอายุน้อย โดยเฉพาะในช่วงอายุ 20-29 ปี ในภาพรวม การขึ้นภาษีความหวานมีผลช่วยลดภาวะน้ำหนักเกินและโรคอ้วนได้ร้อยละ 3 และ 4 ตามลำดับ⁽⁶⁵⁾ ทั้งนี้ การขึ้นภาษีความหวาน

มีกลไกที่ทำให้ลดโรคอ้วน ได้แก่ การลดการบริโภค เครื่องดื่มที่ขึ้นภาษี ผู้บริโภคมีความตระหนักมากขึ้น และเครื่องดื่มมีการเปลี่ยนสูตรไปจากเดิม (reformulation) ส่งผลให้ผู้บริโภคเลือกบริโภคเครื่องดื่มที่ดีต่อสุขภาพมากขึ้น จึงได้รับพลังงานน้อยลงและลดความชุกโรคอ้วนในที่สุด นอกจากนี้ เงินจากภาษีความหวานยังสามารถนำมาใช้เป็นกองทุนเพื่อส่งเสริมสุขภาพได้อีกด้วย⁽⁶⁰⁾

5.1.2 การติดฉลากโภชนาการด้านหน้าของบรรจุภัณฑ์

การติดฉลากโภชนาการด้านหน้าของบรรจุภัณฑ์ (Front-of-Pack; FOP) เป็นอีกข้อแนะนำที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดไว้ เพื่อให้ผู้บริโภคเข้าใจเกี่ยวกับข้อมูลทางโภชนาการของอาหาร ในปี

พ.ศ. 2558 มีการศึกษาเกี่ยวกับฉลากโภชนาการด้านหน้าของบรรจุภัณฑ์ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยสอบถามความคิดเห็นของอาสาสมัครจำนวน 125 คน พบว่า การติดฉลากแบบ FOP มีความน่าสนใจกว่าการติดฉลากโภชนาการ (Nutrition Facts Panel; NFP) (Fig. 3) ที่ต้องแสดงตามกฎหมาย เนื่องจาก FOP แสดงที่หน้าบรรจุภัณฑ์และมีการออกแบบที่น่าสนใจ⁽⁶⁶⁾ ในปี พ.ศ. 2559 ประเทศชิลี ได้ออกกฎหมายเกี่ยวกับการติดฉลากอาหารและการโฆษณา โดยกำหนดให้อาหารและเครื่องดื่มที่มีน้ำตาล โซเดียม และไขมันอิ่มตัวเกินกว่าที่กำหนดต้องมีการแสดงฉลาก FOP แบบแจ้งเตือน (front-of-package warning labelling) ห้ามโฆษณาให้แก่เด็กอายุต่ำกว่า 14 ปีและห้ามการจำหน่ายในโรงเรียน^(67,68) ส่งผลให้อัตราการซื้อเครื่องดื่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁶⁸⁾

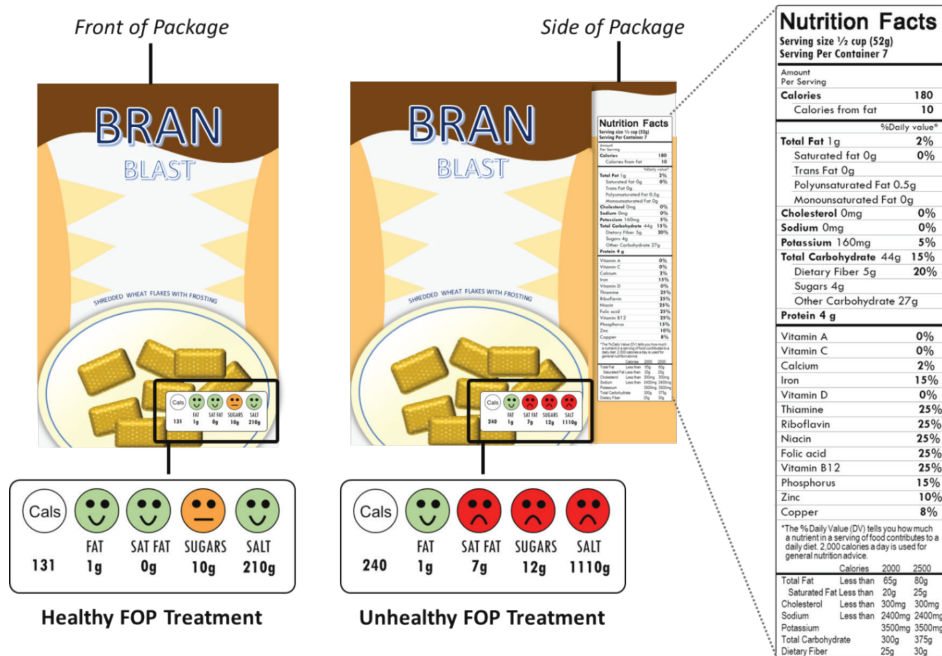


Fig. 3 Front of pack (FOP) labelling and nutrition fact panel (NFP). (Modified from Bix L, *et al.*, PLoS One 2015)⁽⁶⁹⁾

5.1.3 การจัดโปรแกรมอาหารกลางวัน ในโรงเรียน

ในประเทศญี่ปุ่น ได้จัดให้มีโปรแกรมอาหารกลางวันในโรงเรียน (school lunch program) โดยเริ่มมีพระราชบัญญัติอาหารกลางวันมาตั้งแต่ พ.ศ. 2497 เพื่อบริหารจัดการอาหารกลางวันให้แก่เด็กนักเรียนชั้นประถมศึกษาและมัธยมศึกษาตอนต้น⁽¹⁰⁾ นักโภชนาการประจำโรงเรียนจะทำหน้าที่ควบคุมดูแลอาหารกลางวันให้เป็นไปตามหลักโภชนาการ เด็กนักเรียนทุกคนจะได้รับประทานอาหารในรายการอาหารที่เหมือนกัน ได้แก่ อาหารหลักที่คนส่วนใหญ่บริโภค (staple food) อาหารจานหลัก อาหารเครื่องเคียง เครื่องดื่มและของหวาน⁽⁷⁰⁾ ผลจากโปรแกรมอาหารกลางวันนี้ มีผลทำให้ความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนในประเทศญี่ปุ่นมีแนวโน้มลดลง⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2496 ประเทศญี่ปุ่นได้ส่งเสริมให้เด็กนักเรียนเดินไปโรงเรียนเพื่อให้เกิดการออกกำลังกาย มาตรการนี้สอดคล้องกับแนวทางการออกกำลังกายของสมาคมกีฬาแห่งประเทศไทย (Japan Sports Association)⁽⁷¹⁾

ในประเทศอังกฤษ ได้ตั้งเป้าหมายให้อัตราโรคอ้วนในเด็กลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 10 ปี ข้างหน้า (ราวปี พ.ศ. 2569) โดยมีแผนนโยบายต่าง ๆ เช่น การจัดเก็บภาษีสำหรับน้ำตาล การลดปริมาณน้ำตาลในอาหารและเครื่องดื่มสำหรับเด็กลงอย่างน้อยร้อยละ 20 การสร้างสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อสุขภาพ ในหน่วยงานภาครัฐ การส่งเสริมให้เด็กนักเรียนได้ออกกำลังกายอย่างน้อย 60 นาที โดยอย่างน้อย 30 นาที ออกกำลังกายในโรงเรียน ส่วนอีก 30 นาทีออกกำลังกายภายนอกโรงเรียน การติดตาม FOP เพื่อให้ผู้ปกครองเข้าใจข้อมูลด้านโภชนาการได้อย่างชัดเจน⁽⁷²⁾

5.2 นโยบายป้องกันโรคอ้วนในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทย ได้มีการดำเนินนโยบาย

เพื่อช่วยลดโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนหลายมาตรการ เช่น โครงการเด็กไทยดูดี มีพละนามัยที่ได้ดำเนินโครงการกับเด็กนักเรียนระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนในพื้นที่กรุงเทพมหานครตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 จนถึงปัจจุบัน โดยมีวัตถุประสงค์ให้เด็กมีวินัย มีความรู้ด้านอาหารและโภชนาการ เลือกซื้อของที่มีประโยชน์ รวมทั้งรักการออกกำลังกายผ่านการพัฒนารูปแบบการส่งเสริมสุขภาพแบบบูรณาการ⁽⁷³⁾ ผลการดำเนินโครงการพบว่า การขาดวินัยในตนเองของเด็กนักเรียนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เสี่ยงต่อโรคอ้วน โดยเฉพาะการขาดวินัยในการจัดการด้านค่าใช้จ่ายทำให้เสี่ยงต่อโรคอ้วน 3.1 เท่า⁽⁷⁴⁾ เมื่อดำเนินการฝึกอบรมแบบมีส่วนร่วมให้สอดคล้องกันทั้งนักเรียน ครูและผู้ปกครอง ทำให้ความชุกของโรคอ้วนในเด็กลดลงจากร้อยละ 19.3 เป็นร้อยละ 16.8⁽⁷⁵⁾ รวมทั้งการใช้โปรแกรมวิถีสุขภาพแบบหลายองค์ประกอบโดยเน้นให้เด็กมีพฤติกรรมบริโภคอาหารสุขภาพและหมั่นออกกำลังกาย พบว่า เด็กที่เข้าร่วมโปรแกรมมีพฤติกรรมด้านสุขภาพโดยรวม พฤติกรรมการบริโภคอาหาร และระดับเอชดีแอล-โคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุม ขณะที่โคเลสเตอรอลรวมต่ำกว่ากลุ่มควบคุม⁽⁷⁶⁾ โครงการเด็กไทยแกล้มใส่ที่เน้นให้โรงเรียนที่เข้าร่วมโครงการสามารถบริหารจัดการด้านอาหาร โภชนาการ และสุขภาพได้อย่างยั่งยืน⁽⁷⁷⁾ ในปี พ.ศ. 2558 กรมอนามัย มีนโยบายผลักดันให้มีนักโภชนาการประจำตำบล เพื่อให้มีการจัดการด้านอาหารและโภชนาการอย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁷⁸⁾ นอกจากนี้ ในปี พ.ศ. 2560 รัฐบาลได้มีมาตรการทางภาษีเพื่อจัดเก็บภาษีความหวาน เนื่องจากอัตราการบริโภคน้ำตาลในประเทศไทยมีปริมาณมากกว่าที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ ร่วมกับความชุกของโรคอ้วนมีแนวโน้มสูงขึ้น⁽⁷⁹⁾ ผลจากการดำเนินมาตรการนี้ส่งผลให้เครื่องดื่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมีราคาสูงขึ้น ผู้ผลิตปรับสูตรเครื่องดื่มให้น้ำตาลน้อยลง และยังทำให้คน

ไทยบริโภคน้ำตาลลดลงด้วย⁽⁸⁰⁾ จึงคาดหวังว่าความชุกของโรคอ้วนในเด็กวัยเรียนของประเทศไทยจะมีแนวโน้มที่ลดลง เพื่อให้เด็กไทยห่างไกลจากโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง

บทสรุป

โรคอ้วนในเด็กวัยเรียนเป็นปัญหาที่สำคัญและมีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วโลก ส่งผลให้เด็กมีปัญหาทั้งทางด้านสุขภาพและสังคมและจิตใจ ปัจจุบันมีการกำหนดมาตรการออกมาในแต่ละประเทศ เช่น การกำหนดภาษีความหวานในเครื่องดื่ม การติดฉลากโภชนาการ ซึ่งจะส่งผลทำให้ความชุกของโรคอ้วนมีแนวโน้มลดลง ดังนั้น การวางนโยบายเพื่อป้องกันปัญหาโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน จึงเป็นสิ่งสำคัญเร่งด่วน และควรมีการบูรณาการร่วมมือกันของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ร่วมกับโรงเรียนและผู้ปกครอง นักเรียน เพื่อให้เกิดผลสัมฤทธิ์ที่ชัดเจนตามมา โดยในเบื้องต้นควรเริ่มตั้งแต่เด็กวัยเรียนชั้นประถมศึกษา ซึ่งต้องใช้ความร่วมมือกันระหว่างสถาบันครอบครัว และโรงเรียน โดยผู้ปกครองและครูมีบทบาทสำคัญ ร่วมกันในการสร้างความตระหนักให้เด็กมีวินัย มีความรู้ด้านอาหารและโภชนาการ เลือกซื้อของที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และส่งเสริมให้เด็กหมั่นออกกำลังกายเป็นประจำ รวมทั้งให้ความรู้แก่เด็ก เพื่อชี้ให้เห็นถึงความสำคัญและผลกระทบที่เกิดจากโรคอ้วน นอกจากนี้ โรงเรียนควรมีการควบคุมดูแลจัดให้มีโปรแกรมอาหารกลางวันที่เป็นไปตามหลักโภชนาการ อย่างไรก็ตาม หน่วยงานภาครัฐที่ดูแลด้านสาธารณสุขนับว่ามีบทบาทสำคัญในการผลักดันและกำหนดนโยบายต่างๆ สำหรับการป้องกันโรคอ้วนโดยเฉพาะในเด็กวัยเรียนของประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยรังสิต และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างสุขภาพ (สสส.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการค้นคว้าข้อมูลด้านโรคอ้วนในเด็กวัยเรียน

เอกสารอ้างอิง

1. Inoue Y, Qin B, Poti J, Sokol R, Gordon-Larsen P. Epidemiology of Obesity in Adults: Latest Trends. *Curr Obes Rep* 2018; 7: 276-88.
2. World Health Organization. Comprehensive implementation plan on maternal, infant and young child nutrition. 2014 [cited 2020 Apr 28]. Available from: https://www.who.int/nutrition/publications/CIP_document/en/.
3. Society of Pediatric Nutrition of Thailand, The Royal College of Pediatricians of Thailand. Clinical practice guideline for prevention and treatment of childhood obesity 2014. 2014 [cited 2020 Nov 27]. Available from: <http://www.thaipediatrics.org/Media/media-20161208151655.pdf>. (in Thai)
4. Xu S, Xue Y. Pediatric obesity: Causes, symptoms, prevention and treatment. *Exp Ther Med* 2016; 11: 15-20.
5. Sahoo K, Sahoo B, Choudhury AK, Sofi NY, Kumar R, Bhadoria AS. Childhood obesity: causes and consequences. *J Family Med Prim Care* 2015; 4: 187-92.

6. Sukhonthachit P, Aekplakorn W, Hudthagosol C, Sirikulchayanonta C. The association between obesity and blood pressure in Thai public school children. *BMC Public Health* 2014; 14: 729.
7. Strauss RS. Childhood obesity and self-esteem. *Pediatrics* 2000; 105: e15.
8. Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA* 2002; 288: 1728-32.
9. Al-Lahham S, Jaradat N, Altamimi M, *et al.* Prevalence of underweight, overweight and obesity among Palestinian school-age children and the associated risk factors: a cross sectional study. *BMC Pediatr* 2019; 19: 483.
10. Miyawaki A, Lee JS, Kobayashi Y. Impact of the school lunch program on overweight and obesity among junior high school students: a nationwide study in Japan. *J Public Health (Oxf)* 2019; 41: 362-70.
11. World Health Organization. Prevalence of obesity among children and adolescents, BMI>+2 standard deviation above the median, crude Estimates by country, among children aged 5-9 years. 2017 [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.BMIPLUS2C05-09v?lang=en>.
12. Hales Cm Fau - Carroll MD, Carroll Md Fau - Fryar CD, Fryar Cd Fau - Ogden CL, Ogden CL. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015-2016. (1941-4927 (Electronic)).
13. Centers for Disease Control and Prevention. Childhood obesity facts: prevalence of childhood obesity in the United States. 2019 [cited 2020 May 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/obesity/data/childhood.html>.
14. Hales CM, Fryar CD, Carroll MD, Freedman DS, Ogden CL. Trends in obesity and severe obesity prevalence in US youth and adults by sex and age, 2007-2008 to 2015-2016. *JAMA* 2018; 319: 1723-5.
15. NHS Digital. Statistics on obesity, Physical activity and diet, England, 2020: Part 4: Childhood overweight and obesity. 2020 [cited 2020 Jun 5]. Available from: <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/statistics-on-obesity-physical-activity-and-diet/england-2020/part-4-childhood-obesity-copy>.
16. Australian Bureau of Statistics. National Health Survey: First Results, 2017-18. 2018 [cited 2020 Jun 10]. Available from: <https://www.abs.gov.au/ausstats/abs@.nsf/mf/4364.0.55.001>.
17. Aekplakorn W, Mohsuwan L, Ruengdarakarnon N, Channarong P, Satiennopakow W, Puckcharern H. 5th Survey of Thai health using a physical exam, 2014 (Child Health). Nonthaburi: Health Systems Research Institute; 2014. (in Thai)
18. Mohsuwan L, Aekplakorn W, Ruengdarakarnon N, *et al.* 4th Survey of Thai health using a physical exam, 2008-9 (Child Health). Nonthaburi: Health Systems Research Institute; 2011. (in Thai)

19. Nonboonyawat T, Pusanasuwanasri W, Chanrat N, *et al.* Prevalence and associates of obesity and overweight among school-age children in a rural community of Thailand. *Korean J Pediatr* 2019; 62: 179-86.
20. Sirikulchayanonta C. Report of an open gate for bright Thai kid to community project. 2018 [cited 2020 Apr 29]. Available from: <https://www.rsu.ac.th/qa/public/upload/files/filework/16/20181126184950HHKFB.pdf>. (in Thai)
21. Shivpuri A, Shivpuri A, Sharma S. Childhood obesity: Review of a growing problem. *Int J Clin Pediatr Dent* 2012; 5: 237-41.
22. Kumar S, Kelly AS. Review of childhood obesity: From epidemiology, etiology, and comorbidities to clinical assessment and treatment. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 251-65.
23. Crino A, Fintini D, Bocchini S, Grugni G. Obesity management in Prader-Willi syndrome: current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2018; 11: 579-93.
24. Almeida SM, Furtado JM, Mascarenhas P, *et al.* Association between LEPR, FTO, MC4R, and PPARG-2 polymorphisms with obesity traits and metabolic phenotypes in school-aged children. *Endocrine* 2018; 60: 466-78.
25. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003; 348: 1085-95.
26. Kongmacheep P, Sirikulchayanonta C, Tungtrongchitr R, Hancharoen K. Identification of leptin gene variants in school children with early onset obesity. *J Med Assoc Thai* 2009; 92 Suppl 7: S108-14.
27. Schmidt M, Affenito SG, Striegel-Moore R, *et al.* Fast-food intake and diet quality in black and white girls: the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005; 159: 626-31.
28. Gilliland JA, Rangel CY, Healy MA, *et al.* Linking childhood obesity to the built environment: A Multi-level analysis of home and school neighbourhood factors associated with Body mass index. *Can J Public Health* 2012; 103: S15-21.
29. Zhang X, van der Lans I, Dagevos H. Impacts of fast food and the food retail environment on overweight and obesity in China: a multilevel latent class cluster approach. *Public Health Nutrition* 2011; 15: 88-96.
30. Rahman T, Cushing RA, Jackson RJ. Contributions of built environment to childhood obesity. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* 2011; 78: 49-57.
31. Blüher M, Michael MD, Peroni OD, *et al.* Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Developmental Cell* 2002; 3: 25-38.

32. Cambuli VM, Musiu MC, Incani M, *et al.* Assessment of adiponectin and leptin as biomarkers of positive metabolic outcomes after lifestyle intervention in overweight and obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3051-7.
33. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7: 947-53.
34. Zhou H, Song X, Briggs M, *et al.* Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 793-9.
35. Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2006; 188: 231-44.
36. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, *et al.* Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002; 51: 2734-41.
37. Atwa H, Mesbah B, Sad A. Adiponectin could be a comprehensive marker of metabolic syndrome in obese children. *South Afr J Clin Nutr* 2016; 25: 53-6.
38. Gherlan I, Vladoiu S, Alexiu F, *et al.* Adipocytokine profile and insulin resistance in childhood obesity. *Maedica (Buchar)* 2012; 7: 205-13.
39. Tungtrongchitr R, Sricharoen P, Pongpaew P, *et al.* Adiponectin/ACP30, a collagen-like plasma protein in relation to anthropometric measurement in Thai overweight and obese subjects. *Int J Food Sci Nutr* 2005; 56: 193-201.
40. Balsan GA, Vieira JL, Oliveira AM, Portal VL. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev Assoc Med Bras* 2015; 61: 72-80.
41. Yanai H, Yoshida H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
42. Green ED, Maffei M, Braden VV, *et al.* The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 1995; 5: 5-12.
43. Venner AA, Lyon ME, Doyle-Baker PK. Leptin: a potential biomarker for childhood obesity? *Clin Biochem* 2006; 39: 1047-56.
44. Paz-Filho G, Mastronardi C, Wong ML, Licinio J. Leptin therapy, insulin sensitivity, and glucose homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; 16 (Suppl 3): S549-55.
45. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, *et al.* Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* 1997; 3: 575-9.

46. Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2849-55.
47. Gijon-Conde T, Graciani A, Guallar-Castillon P, Aguilera MT, Rodriguez-Artalejo F, Banegas JR. Leptin Reference values and cutoffs for identifying cardiometabolic abnormalities in the Spanish population. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2015; 68: 672-9.
48. Lausten-Thomsen U, Christiansen M, Louise Hedley P, *et al.* Reference values for serum leptin in healthy non-obese children and adolescents. *Scand J Clin Lab Invest* 2016; 76: 561-7.
49. Tungtrongchitr R, Pongpaew P, Phonrat B, *et al.* Serum leptin and lipid profiles in Thai obese and overweight subjects. *Int J Vitam Nutr Res* 2001; 71: 74-81.
50. Popruk S, Tungtrongchitr R, Petmitr S, *et al.* Leptin, soluble leptin receptor, lipid profiles, and LEPR gene polymorphisms in Thai children and adolescents. *Int J Vitam Nutr Res* 2008; 78: 9-15.
51. Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and reproduction. *Steroids* 2002; 67: 95-104.
52. Lahlou N, Landais P, De Boissieu D, Bougneres PF. Circulating leptin in normal children and during the dynamic phase of juvenile obesity: relation to body fatness, energy metabolism, caloric intake, and sexual dimorphism. *Diabetes* 1997; 46: 989-93.
53. Madeira I, Bordallo MA, Rodrigues NC, *et al.* Leptin as a predictor of metabolic syndrome in prepubertal children. *Arch Endocrinol Metab* 2017; 61: 7-13.
54. Considine RV. Weight regulation, leptin and growth hormone. *Horm Res* 1997; 48 Suppl 5: 116-21.
55. Harris RB. Leptin--much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 45-75.
56. Yamborisut U, Riabroy N, Phonrat B, Tungtrongchitr R. Serum leptin levels and body composition in obese Thai children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40: 544-52.
57. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism* 2015; 64: 24-34.
58. Weihrauch-Blüher S, Kromeyer-Hauschild K, Graf C, *et al.* Current guidelines for obesity prevention in childhood and adolescence. *Obes Facts* 2018; 11: 263-76.

59. World Health Organization. Report of the commission on ending childhood obesity. Geneva: WHO; 2016 [cited 2020 Apr 29]. Available from: <https://www.who.int/end-childhood-obesity/publications/echo-report/en/>.
60. Fernandez MA, Raine KD. Insights on the influence of sugar taxes on obesity prevention efforts. *Curr Nutr Rep* 2019; 8: 333-9.
61. Falbe J, Thompson HR, Becker CM, Rojas N, McCulloch CE, Madsen KA. Impact of the Berkeley excise tax on sugar-sweetened beverage consumption. *Am J Public Health* 2016; 106: 1865-71.
62. Alvarado M, Unwin N, Sharp SJ, *et al.* Assessing the impact of the Barbados sugar-sweetened beverage tax on beverage sales: an observational study. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2019; 16: 13.
63. Han E, Powell LM. Effect of food prices on the prevalence of obesity among young adults. *Public Health* 2011; 125: 129-35.
64. Kristensen AH, Flottemesch TJ, Maciosek MV, *et al.* Reducing childhood obesity through U.S. federal policy: a microsimulation analysis. *Am J Prev Med* 2014; 47: 604-12.
65. Schwendicke F, Stolpe M. Taxing sugar-sweetened beverages: impact on overweight and obesity in Germany. *BMC Public Health* 2017; 17: 88.
66. Becker MW, Bello NM, Sundar RP, Peltier C, Bix L. Front of pack labels enhance attention to nutrition information in novel & commercial brands. *Food Policy* 2015; 56: 76-86.
67. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) PAHOP. Approval of a new food act in Chile: process summary. In: Entry into force: June 2016. Santiago de Chile 2017.
68. Taillie LS, Reyes M, Colchero MA, Popkin B, Corvalan C. An evaluation of Chile's law of food labeling and advertising on sugar-sweetened beverage purchases from 2015 to 2017: A before-and-after study. *PLoS Med* 2020; 17: e1003015.
69. Bix L, Sundar RP, Bello NM, Peltier C, Weatherspoon LJ, Becker MW. To See or Not to See: Do Front of pack nutrition labels affect attention to overall nutrition information? *PLoS One* 2015; 10: e0139732.
70. Asakura K, Sasaki S. School lunches in Japan: their contribution to healthier nutrient intake among elementary-school and junior high-school children. *Public Health Nutr* 2017; 20: 1523-33.
71. Mori N, Armada F, Willcox DC. Walking to school in Japan and childhood obesity prevention: new lessons from an old policy. *Am J Public Health* 2012; 102: 2068-73.

72. Government Digital Service, Government of the United Kingdom. Guidance Childhood obesity: a plan for action. 2017 [cited 2020 Jun 26]. Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/childhood-obesity-a-plan-for-action/childhood-obesity-a-plan-for-action>.
73. Bright and healthy Thai kid project. bright and healthy Thai kid project. nd. [cited 2020 May 25]. Available from: <http://www.dekthaidoodee.com/history/โครงการเด็กไทยดูดี-มีพลานามัย.aspx>. (in Thai)
74. Sirikulchayanonta C, Ratanopas W, Temcharoen P, Srisorrachatr S. Self discipline and obesity in Bangkok school children. BMC Public Health 2011; 11: 158.
75. Sirikulchayanonta C, Pavadhgul P, Chongsuwat R, Klaewkla J. Participatory action project in reducing childhood obesity in Thai primary schools. Asia Pac J Public Health 2011; 23: 917-27.
76. Chawla N, Panza A, Sirikulchayanonta C, Kumar R, Taneepanichskul S. Effectiveness of A School-based multicomponent intervention on nutritional status among primary school children in Bangkok, Thailand. J Ayub Med Coll abbotabad 2017; 29: 13-20.
77. Dekthaikamsai Learning Center. Dekthaikamsai Project. 2015 [cited 2020 May 17]. Available from: <https://dekthaikamsai.com/upload/forum/ThefootprintPrincedietitianThailandscheekclearproject.pdf>. (in Thai)
78. Thai Health Promotion Foundation. Sub-district nutritionist created a quality person. 2015 [cited 2020 May 12]. Available from: <https://www.thaihealth.or.th/Content/27414-นักโภชนาการประจำตำบลสร้างคนคุณภาพ.html>. (in Thai)
79. Urwannachotima N, Hanvoravongchai P, Ansah JP, Prasertsom P, Koh VRY. Impact of sugar-sweetened beverage tax on dental caries: a simulation analysis. BMC Oral Health 2020; 20: 76.
80. Bangkok Biz News. The effect of sugar tax cause Thais eating sugar decreasingly 4 teaspoons per person. 2019 [cited 2020 May 18]. Available from: https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/849071?utm_source=tein&utm_medium=internal_referral. (in Thai)

การประเมินผลการตรวจค่าฮีโมโกลบินจากปลายนิ้วในผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธีตรวจสอบความถ่วงจำเพาะด้วยน้ำยาคอปเปอร์ซัลเฟตและเครื่องวัดฮีโมโกลบินแบบพกพา

สิทธิพร สุวรรณมิตร^{1, 2*} ณิชากรณ์ ปัญญา¹ ธนภรณ์ แสงมุข¹ และ นรินทร์ พงศ์ทัศนเหม³

¹แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกและวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

²หน่วยความเป็นเลิศด้านโรคติดเชื้อ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

³ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลพะเยา จังหวัดพะเยา

บทคัดย่อ

การตรวจคัดกรองฮีโมโกลบินก่อนการบริจาคโลหิตถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าผู้บริจาคโลหิตจะมีความปลอดภัยและเพื่อให้ได้โลหิตบริจาคที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีวิธีการตรวจคัดกรองฮีโมโกลบินหลากหลาย แต่ยังไม่พบวิธีที่เหมาะสมสำหรับหน่วยรับบริจาคโลหิตเคลื่อนที่ การศึกษานี้จึงต้องการประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบินและราคาของวิธีตรวจคัดกรองฮีโมโกลบินจากเลือดที่เจาะจากบริเวณปลายนิ้วของทั้งสามวิธี โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบกับเครื่องตรวจวิเคราะห์โลหิตอัตโนมัติ โดยผู้บริจาคโลหิตจำนวน 311 ราย ได้รับการเจาะเลือดบริเวณปลายนิ้วเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบินด้วยวิธีน้ำยาคอปเปอร์ซัลเฟตและเครื่องตรวจฮีโมโกลบินแบบพกพา 2 บริษัท ได้แก่ HemoCue[®] Hb 301 และ Hemocroma PLUS และยังได้รับการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์โลหิตอัตโนมัติ Sysmex KX-21NTM เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิง ซึ่งผลการทดลองพบว่า วิธีน้ำยาคอปเปอร์ซัลเฟต HemoCue[®] Hb 301 และ Hemocroma PLUS มีความไวร้อยละ 100.0, 99.0 และ 97.6 มีความจำเพาะร้อยละ 38.9, 11.1 และ 55.5 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 96.4, 94.7 และ 97.3 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100.0, 40.0 และ 58.8 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับค่าฮีโมโกลบินโดยเฉลี่ยที่ได้จากเครื่อง HemoCue[®] Hb 301 มีค่าสูงกว่าค่าฮีโมโกลบินโดยเฉลี่ยที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์โลหิตอัตโนมัติ อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ค่าฮีโมโกลบินโดยเฉลี่ยที่ได้จากเครื่อง Hemocroma PLUS มีค่าใกล้เคียงกับค่าฮีโมโกลบินโดยเฉลี่ยที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์โลหิตอัตโนมัติ และจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าฮีโมโกลบินโดยเฉลี่ยของแต่ละวิธีด้วยวิธี Bland Altman plot พบว่า ค่าความแตกต่างโดยเฉลี่ยของค่าฮีโมโกลบินที่ได้จากเครื่อง HemoCue[®] Hb 301 กับ Sysmex KX-21NTM เท่ากับ 0.60 ± 0.50 กรัมต่อเดซิลิตร และค่าความแตกต่างโดยเฉลี่ยของค่าฮีโมโกลบินที่ได้จากเครื่อง Hemocroma PLUS กับ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sittiporn.su@up.ac.th

รับบทความ: 16 กรกฎาคม 2563

แก้ไขบทความ: 13 พฤศจิกายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 25 ธันวาคม 2563

Sysmex KX-21NTM เท่ากับ 0.58 ± 0.51 กรัมต่อเดซิลิตร และจากการวิเคราะห์ต้นทุนของแต่ละวิธี พบว่าวิธีน้ำยาออปเปอร์ซัลเฟตมีค่าใช้จ่ายต่อการทดสอบหนึ่งครั้งน้อยที่สุด คือ 2.2 บาท ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HemoCue[®] Hb 301 และ Hemocroma PLUS มีค่าใช้จ่ายเท่ากับ 50.0 และ 40.0 บาท ตามลำดับ ถึงแม้ว่าผลการศึกษารั้วนี้จะแสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจคัดกรองฮีโมโกลบินทั้งสามวิธีให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับเครื่องตรวจวิเคราะห์โลหิตอัตโนมัติ แต่ค่าฮีโมโกลบินที่ได้จากแต่ละวิธียังมีความแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของตัวผู้บริจาค การเลือกวิธีการตรวจคัดกรองฮีโมโกลบินที่จะนำมาประยุกต์ใช้จำเป็นต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมของวิธีต่อหน่วยงานและหาแนวทางที่สามารถลดข้อผิดพลาดที่เกิดจากความแตกต่างของค่าฮีโมโกลบินที่ได้จากแต่ละวิธี

คำสำคัญ: การบริจาคโลหิต การตรวจวัดค่าฮีโมโกลบิน การคัดกรองผู้บริจาคโลหิต เครื่องวัดฮีโมโกลบินแบบพกพา ฮีโมโกลบิน

Evaluation of Capillary Hemoglobin Estimation in Blood Donors by Using Specific Gravity (CuSO_4) and Portable Hemoglobin Photometer

Sittiporn Suwannamit^{1, 2*}, Nichaporn Punya¹, Thanaphorn Saengmuk¹
and Narin Pongtussanaham³

¹*Division of Clinical Immunology and Transfusion Sciences, Department of Medical Technology,
School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province, Thailand*

²*Unit of Excellnt in Infectious Disease, School of Allied Health Sciences, University of Phayao,
Phayao Province, Thailand*

³*Laboratory of Medical Technology, Phayao Hospital, Phayao Province, Thailand*

Abstract

The hemoglobin screening test is the most important part prior to blood donation to guarantee donor safety and blood product quality. Even though several hemoglobin measurements are available, no single screening method is most suitable for mobile donation setting. The purpose of the study was to evaluate the performance and cost of three screening methods for capillary hemoglobin estimation by using automated hematology analyzer as a reference method. The prospective study was performed on 311 voluntary blood donors. Capillary blood samples were tested by CuSO_4 method, HemoCue[®] Hb 301 and Hemocroma PLUS and venous blood samples were also tested by Sysmex KX-21NTM. The result showed that the sensitivity and specificity of the test were 100.0% and 38.9% for CuSO_4 method, 99.0% and 11.1% for HemoCue[®] Hb 301 and 97.6% and 55.5% for Hemocroma PLUS. The positive predictive values (PPV) were 96.4%, 94.7% and 97.3% and their negative predictive values (NPV) were 100.0%, 40.0% and 58.8%, respectively. Hemoglobin level (mean $\pm$ SD) of capillary-HemoCue[®] Hb 301 was 14.99 ± 1.32 g/dL which was significantly higher than that of the venous-hematology analyzer whereas capillary-hemoglobin level of Hemocroma PLUS (14.63 ± 1.27 g/dL) was quite similar to that of the venous-hematology analyzer. Bland-Altman plot analysis demonstrated that the mean difference (95% CI) between HemoCue[®] Hb 301 and Sysmex KX-21NTM was 0.60 ± 0.50 g/dL and between Hemocroma PLUS and Sysmex KX-21NTM was 0.58 ± 0.51 g/dL. Cost

*Corresponding author E-mail address: sittiporn.su@up.ac.th

analysis showed that CuSO_4 method was the most affordable method for using in screening procedure with a cost of 2.2 baht per test, while the cost of HemoCue[®] Hb 301 and Hemocroma PLUS were 50.0 and 40.0 baht per test, respectively. Our results suggested that the hemoglobin level given by all three hemoglobin screening tests showed almost perfect agreement with venous hematology analyzer, however, the variation of those values between tests was observed. To protect donor safety, consideration of implementation of the appropriate screening method and establishment of the best way to minimize this error should be done before the test is performed.

Keywords: Blood donation, Hemoglobin estimation, Donor screening, Hemoglobin photometer, Hemoglobin

Introduction

Blood transfusion is one of the potentially life-saving medical therapy in both routine and emergency situations. Researchers have worked intensively for developing alternative substitutes however there is yet no proper replacement for human blood available. Thus blood donation is still necessary because the demand for blood transfusion is continuous. To make donation safe for donor, many safety measurements are undertaken and the most important is the assessment of Hemoglobin concentration in blood donor before donation⁽¹⁾.

The assessment of hemoglobin concentration prior to blood donation is not only to protect donor from becoming anemia but also to ensure that collected blood unit reach the required standard of hemoglobin contents⁽²⁾. The reference method for hemoglobin level determination is the cyanmethemoglobin assay performed in a venous blood sample by automatic hematology analyzer⁽³⁾. Unfortunately, this technique is available only at the blood center and could not be used in mobile donation setting. Moreover, it also requires an invasive sample collection and is impractical in nonclinical setting. As it is inexpensive, rapid, easy to perform and accepted by the standard of the American Association of Blood Banks (AABB), semi quantitative copper sulphate gravimetric method (CuSO_4 method) has now been used to determine hemoglobin level in blood donor⁽⁴⁾. Although with many advantages, some

limitations of the method have been concerned such as the lack of quantitative result and a standardized quality control⁽⁵⁻⁸⁾. Additionally, CuSO_4 is also considered a hazard solution.

In order to overcome the limitation of CuSO_4 method, the portable hemoglobinometers such as HemoCue[®] Hb 301 and DiaSpect Tm were introduced to blood donation protocol and has been used for these purposes. They not only offer rapid and reliable procedure, but also provide quantitative results. In addition, there are several studies about accuracy of hemoglobin photometers, most of which reported a good correlation with the reference method⁽⁹⁻¹¹⁾. In Thailand, HemoCue[®] Hb 301 has been widely used for several years and has been accepted to be a reliable method but there are still conflicting reports regarding its accuracy such as a significantly high hemoglobin concentration^(6-7, 11).

At present, a newly-released portable hemoglobinometer, Hemocroma PLUS, claims to yield better storage capacity and needs only three seconds for measurement. However, only a few studies assessing the performance of the Hemocroma PLUS with regard to pre-donation screening has been reported⁽¹²⁻¹⁴⁾. Moreover, comparability of the cost of Hemocroma PLUS with other screening methods has not been reported.

In this study we compared the performance of the classical copper sulphate test, with capillary blood sample measurement by HemoCue[®] Hb 301 and a novel portable

photometer, Hemocroma PLUS, using an automated laboratory hematology analyzer as a gold standard method. The operation cost of each method has also been validated throughout the study.

Materials and methods

Study design

This prospective cross-sectional study was conducted on the blood donors attended the blood donation center in Phayao hospital from August to December 2017.

Study population

Random non-remunerated blood donors who accepted the invitation to be a participant after were fully informed the purpose and procedures of this study were included in the experiments. All volunteer blood donors were screened in accordance to the National Blood Centre, the Thai Red Cross Society (TRCS) criteria. The protocol used in this study was approved by the Human Ethics Committee of Phayao University, Thailand (reference number 2/181/60). Written informed consents were obtained from individual participants before any study related procedures were done.

Sample collection and analysis

The capillary and venous blood samples were collected from the volunteer blood donors within the same day. For capillary blood, samples were collected by finger stick method

where donors were seated on a chair with the arm on top of the table. After skin disinfection of the middle or ring finger of the left hand with ethanol, deep finger prick was done at any lateral site of the tip of the finger using a disposable lancet. The first drop of blood was discarded and the later drops were filled in heparinized hematocrit tube for measurement of hemoglobin concentration by CuSO_4 method, HemoCue[®] Hb 301 and Hemocroma PLUS. Only the donor who has hemoglobin level more than 12.5 g/dL in women and 13.0 g/dL in men by HemoCue[®] Hb 301 were accepted for blood collection. Three milliliters of venous blood samples were collected from a diversion pouch and kept in EDTA tube. For any unacceptable donors who wanted to participate in this study, three milliliters of venous blood samples were collected via venipuncture and kept in EDTA tube. The venous blood samples were performed by the automated laboratory hematology analyzer, Sysmex KX-21NTM for using as the standard reference technique for measurement of hemoglobin concentration. Blood smears were stained using Wright-Giemsa stain and examined under the light microscope with the $\times 1000$ magnification for morphologic analysis of red blood cells.

All of blood sample collection and hemoglobin estimation were performed by a single well-trained laboratory staff within one hour to minimize subjective bias.

Data analysis

The statistical analysis was performed using SPSS (version 26.0, Chicago, USA). Blood donor hemoglobin concentration of each method were shown as mean $\pm$ SD. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of each method were calculated as percentage. A Student's t-test was used to compare the difference of hemoglobin detection between HemoCue[®] Hb 301, Hemocroma PLUS and Sysmex KX-21NTM.

The interclass correlation coefficient (ICC) analysis was used to determine correlation between hemoglobin concentration by the two hemoglobin photometer methods and the gold standard method, automated laboratory hematology analyzer. Agreement was considered

excellent reliability for ICC values greater than 0.90, good reliability for values between 0.75 and 0.90, fair reliability for values between 0.50 and 0.75, and poor reliability for ICC values less than 0.50⁽¹⁵⁾. A p-value of < 0.05 was considered significant.

The Bland—Altman plots were used to show the differences between hemoglobin concentration obtained using both techniques against the reference method with the 95% CI.

Results

A total of 311 donors were recruited to this study (306 acceptable donors and 5 unacceptable donors by HemoCue[®] Hb 301). The gender distribution among voluntary blood donor predominantly consisted of male (75.9%) with comparatively fewer female (24.1%)

Table 1 Performance characteristics of three different methods namely CuSO₄ method, HemoCue[®] Hb 301, and Hemocroma PLUS compared with Sysmex KX-21NTM, the reference for hemoglobin estimation of blood donors (n = 311)

Parameter	CuSO ₄	HemoCue [®] Hb 301	Hemocroma PLUS
True positive	293	290	286
True negative	7	2	10
False positive	11	16	8
False negative	0	3	7
Sensitivity (%)	100.0	99.0	97.6
Specificity (%)	38.9	11.1	55.5
Positive likelihood ratio	1.64	1.1	2.2
Positive predictive value	96.4	94.7	97.3
Negative predictive value	100.0	40.0	58.8

participants. Performance characteristics of different methods used in this study compared with reference automated hematology analyzer are represented in Table 1. According to performance characteristics comparison, Hemocroma PLUS was found to be the most efficient method with 97.6% sensitivity, 55.5% specificity, PPV of 97.3% and NPV of 58.8%. CuSO_4 method also provided high sensitivity (100.0%), but the specificity of this method was lower with only 38.9% with a PPV of 96.4% and an NPV of 100.0%. HemoCue[®] Hb 301 was found to be the least specific method with 11.1% specificity despite the fact that its sensitivity was 99.0%, PPV of 94.7% and NPV of 40%. Sixteen samples were false positive using HemoCue[®] Hb 301 compared to the eleven cases by CuSO_4 method and eight

cases by Hemocroma PLUS when comparing with Sysmex KX-21NTM used as reference procedure. All parameters were statistically significant with p value of 0.01.

The mean of capillary and venous hemoglobin levels using HemoCue[®] Hb 301, Hemocroma PLUS and Sysmex KX-21NTM are summarized in Table 2. The mean hemoglobin level of capillary blood using HemoCue[®] Hb 301 was 15.01 ± 1.30 g/dL which was slightly higher than that of the venous blood using the Sysmex KX-21NTM with the mean difference of 0.60 ± 0.50 g/dL. The mean hemoglobin value of capillary blood using Hemocroma PLUS and venous blood using the reference method showed similar trend (14.63 ± 1.27 and 14.69 ± 1.33 g/dL) (data shown in Table 2).

Table 2 Hemoglobin concentration of capillary and venous blood sample analyzed by three different methods, n = 311

Method	Hemoglobin Mean $\pm$ SD (g/dL)	Min-Max (g/dL)	Mean difference from Sysmex KX-21N TM (g/dL)	p-value
HemoCue [®] Hb 301	15.01 ± 1.30	12.5 - 19.1	0.60 ± 0.50	(p < 0.001)
Hemocroma PLUS	14.63 ± 1.27	11.5 - 18.3	0.58 ± 0.51	(p = 0.172)
Sysmex KX-21N TM	14.69 ± 1.33	11.2 - 19.3	n/a	n/a

n/a = not applicable

When subjects were categorized by gender, the mean of hemoglobin values analyzed by HemoCue[®] Hb 301 in females was 13.60 ± 0.80 g/dL, by Hemocroma PLUS was 13.33 ± 0.97 g/L and by the reference method was

13.30 ± 0.91 g/dL. These values determined in male by HemoCue[®] Hb 301 was 15.46 ± 1.10 g/dL, by Hemocroma PLUS was 15.04 ± 1.07 g/dL and by the reference method was 15.13 ± 1.13 g/dL (data shown in Table 3).

Table 3 Hemoglobin concentration of capillary and venous blood sample in 311 volunteers analyzed by three different methods

Method	Hemoglobin Mean $\pm$ SD (g/dL)		
	Male (N = 236)	Female (N = 75)	Total (N = 311)
HemoCue® Hb 301	15.46 $\pm$ 1.10	13.60 $\pm$ 0.80	15.01 $\pm$ 1.30
Hemocroma PLUS	15.04 $\pm$ 1.07	13.33 $\pm$ 0.97	14.63 $\pm$ 1.27
Sysmex KX-21N™	15.13 $\pm$ 1.13	13.30 $\pm$ 0.91	14.69 $\pm$ 1.33

Intraclass correlation coefficient analysis between the HemoCue® Hb 301 and the reference method was 0.922 for the total samples (n = 311) (Table 4) while the ICC between the Hemocroma PLUS and the reference method was 0.902. Bland–Altman plot analysis showed that mean bias of

difference of hemoglobin estimation between HemoCue® Hb 301 and Sysmex KX-21N™ was 0.31 g/dL with limits of agreement from -1.09 to 1.70 g/dL while average bias between Hemocroma PLUS and Sysmex KX-21N™ was -0.06 g/dL with limits of agreement varying from -1.58 to 1.46 g/dL.

Table 4 Intraclass correlation coefficient (ICC) analysis between HemoCue® Hb 301, Hemocroma PLUS and the reference method of hemoglobin estimation in total blood donor

Method	ICC	95% Confidence Interval		Bias	Limit of agreements
		Lower Bound	Upper Bound		
HemoCue® Hb 301 vs. Sysmex KX-21N™	0.922	0.903	0.938	0.31	-1.09 to 1.70
Hemocroma PLUS vs. Sysmex KX-21N™	0.902	0.877	0.921	-0.06	-1.58 to 1.46
HemoCue® Hb 301 vs. Hemocroma PLUS	0.912	0.890	0.930	0.37	-1.46 to 1.58

*Two-way mixed effect model was used where subject effect was random and other effect was fixed.

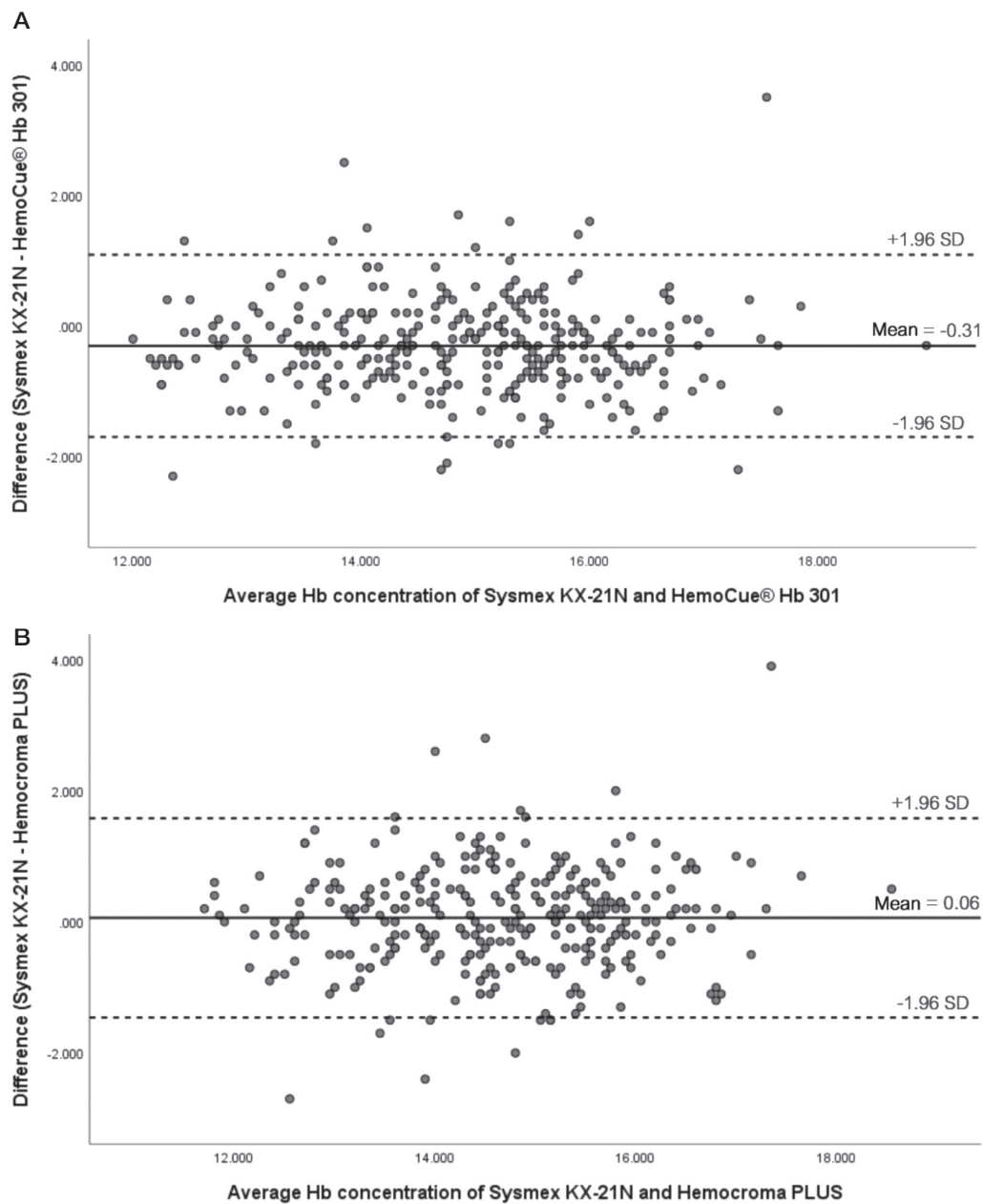


Fig. 1 Bland-Altman plot of the difference of venous hemoglobin concentration using Sysmex KX-21NTM and capillary hemoglobin concentration using two hemoglobin photometers. A) Sysmex KX-21NTM and HemoCue® Hb 301 B) Sysmex KX-21NTM and Hemocroma PLUS

The cost analysis estimated for 1000 tests showed 2.2 baht per test in CuSO_4 method, 50 baht per test in HemoCue[®] Hb 301 and 40 baht per test in Hemocroma PLUS. When a number of 1,700 donors attending per month in our blood donation center was calculated, the running cost of HemoCue[®] Hb 301 was 85,000 baht per month while Hemocroma PLUS and CuSO_4 method were 68,000 and 3,740 baht, respectively.

Discussion

Accurate hemoglobin estimation in pre donation process is important for both donor safety and blood product quality⁽¹⁶⁾. However, venous hemoglobin concentration using automated hematology analyzer which is the reference method, is not applicable in mobile donation settlement. In this study we have performed comparisons between the performance characteristics of CuSO_4 method with two portable hemoglobin photometers, HemoCue[®] Hb 301 and Hemocroma PLUS against the gold standard method.

Comparing the performance characteristic of the three methods for hemoglobin estimation, the results showed that all three methods provided high sensitivity but with rather low specificity. In this study, specificity (38.9%) and positive predictive value (96.4%) of CuSO_4 method were higher than those of HemoCue[®] Hb 301, which was contradictory to the study of Gupta *et al.*⁽¹⁷⁾, which indicated HemoCue[®] Hb 301 had higher in both

specificity and positive predictive values. Considering the false positive rate, HemoCue[®] Hb 301 had the highest rate of all three methods. Our finding was in line with the other studies including that conducted by Ganesh *et al.*⁽¹⁸⁾ in which a false positive rate of CuSO_4 method was 19.29% while that for HemoCue[®] Hb 301 was 40.35%. Interestingly, several studies demonstrated that HemoCue[®] Hb 301 is appropriate for blood donor hemoglobin screening^(10, 17, 19). However, in this study we found that CuSO_4 method was more efficient than HemoCue[®] Hb 301 for identifying of suitable donor. The overestimation of hemoglobin values (sixteen blood donors in HemoCue[®] Hb 301 compared to the reference method) might have been due to small air bubbles in the cuvette or finger prints smeared on the cuvette surface during handling or high humidity⁽²⁰⁾. In addition, the lack of complete manual method for standardization of the CuSO_4 method could be a reason for the discrepancies among measurements⁽²¹⁾. Interestingly, false positivity rate is higher when hemoglobin concentration is as high as 12.5 g/dL. Although false negative was zero for CuSO_4 method, falsely elevated hemoglobin estimation was also found in CuSO_4 method. This finding could be due to an effect of high plasma protein concentration. A previous study indicated that hemoglobin concentration and plasma protein content were directly proportional, i.e. for every extra 1-gram increment in protein concentration, hemoglobin concentration could

increase up to 0.70 g/dL⁽²²⁾. Moreover, the high white blood cell count could also be a reason for false positive value. According to performance characteristics of the three screening methods, CuSO_4 method was considered superior to the two portable hematology photometers. However, to guarantee a correct result, strict technical precautions and quality control validation are needed. Moreover, this method did not provide quantitative result of hemoglobin concentration so there was a possibility to accept very high hemoglobin level donor for donation (>18.0 g/dL) which was contradictory to the National Blood Centre, the Thai Red Cross Society (TRCS) criteria. Consequently, selecting only CuSO_4 test as the hemoglobin screening method may not be an appropriate option.

Portable hemoglobinometer may be a good alternative to the CuSO_4 method with the significant benefits of providing a quantitative hemoglobin concentration although the validation of Hemocroma PLUS was still limited. Here, we had evaluated the performance characteristics of two portable hemoglobinometers, HemoCue[®] Hb 301, and the novel device Hemocroma PLUS for capillary hemoglobin levels in blood donor screenings. Even though, the order of which the drops of blood were filled in the cuvette was not influenced by hemoglobin determination^(11, 23), we attempted to minimize effects of differences between an order the drop (first, second, or third drop) of capillary blood sample was used, blood samples

were filled in hematocrit tube and well mixed before filling in the cuvette and then tested by hemoglobin photometer. Our investigation showed that hemoglobin values against the reference, by HemoCue[®] Hb 301 were higher while by Hemocroma PLUS was slightly lower than their peer methods. This observation which was similar to that of Raithatha *et al.*⁽¹²⁾ but was contradictory to that reported by Anukul *et al.*⁽¹³⁾ which demonstrated that hemoglobin value by HemoCue[®] Hb 301 and Hemocroma PLUS were higher than that of the reference method. This study also showed that the average hemoglobin value from HemoCue[®] Hb 301 was 0.3 g/dL higher than that of the reference method while the mean hemoglobin concentration by Hemocroma PLUS was 0.06 g/dL lower than the actual value. The difference of hemoglobin values between HemoCue[®] Hb 301 and Hemocroma PLUS could be explained by the fact that the two devices used different detection wavelengths^(12, 14). However, the ICC analysis indicated that HemoCue[®] Hb 301 and Hemocroma PLUS had a good agreement with the gold standard method. Several studies reported that the hemoglobin values of capillary blood are higher than the venous hemoglobin concentration. This is manifestly owing to the effect of variation of blood components and the different position during blood samplings^(6, 24-26).

Moreover, blood smear analysis showed that six unacceptable blood donors by

automated hematology analyzer who were then later accepted by portable hemoglobinometer were microcytic hypochromic red blood cell. This finding suggested that microcytic hypochromic red blood cell may be one reason of hemoglobin value discrepancies. Further study on the effects of microcytic hypochromic red blood cell in hemoglobin screening by hemoglobinometer is necessary.

Bland-Altman plot analysis revealed that the limits of agreement upon hemoglobin determination between HemoCue[®] Hb 301 and Sysmex KX-21NTM, and between Hemocroma PLUS and Sysmex KX-21NTM were <2.0 g/dL. In addition to this observation, it was found that preponderance of data points was distributed randomly around the mean bias for both methods and a few points fell outside 2 standard deviations. In spite of this, Bland-Altman plot also showed that hemoglobin level in the capillary blood sample was over-estimated.

According to the results, blood transfusion services should find out the best way to minimize errors related to hemoglobin determination. The adjustment of the acceptable hemoglobin value of capillary blood sample was the alternative way to compensate for the variation of hemoglobin measurements. Hence, raising the baseline in HemoCue[®] Hb 301 for 0.5 g/dL, could cause higher rates of acceptance in the hemoglobin screening test despite having low hemoglobin concentration below the acceptable hemoglobin criteria

level, would be significant reduced (from 6% to 0%).

In the present experiment, we attempted to eliminate the human error by using single well-trained staff to conduct the experiment, pooling and mixing capillary blood prior to measurement. In spite of these efforts, sampling bias has been accessed. Since all the participants were voluntary blood donor, the range of hemoglobin concentration was too narrow to make a correct measurement. Moreover, the number of samples who had lower hemoglobin value than donor eligibility criteria were too small to show the noticeably hemoglobin measurement differences among the three screening methods.

Comparing the cost estimation per test, CuSO₄ method was the most economical with 2.2 baht per test while HemoCue[®] Hb 301 was at 50 baht per test and Hemocroma PLUS was at 40 baht per test. Of the average expenditure for 1,000-1,700 donor registration in our blood donation center per month, the initial capital investment of portable hemoglobinometer was approximately 68,000-85,000 baht, whereas the cost of CuSO₄ test could be considered as inexpensive or negligible.

Conclusion

Regarding the appropriate differentiation of eligible and ineligible blood donors, this study shows that none of the pre-donation hemoglobin screening methods is obviously superior to the others. There was variation of

accuracy according to types of hemoglobin estimation methods and the accuracy in donor classification would most likely rely on strict validation and appropriateness of phlebotomist's skill. Hence, prior to use, complete validation should be done. Selection of blood donor screening method should be considered an economical and reliable method which can also be used as a point of care testing in blood donor setting.

Acknowledgment

We are sincerely grateful to all blood donor volunteers who participated in this study. We also extend our sincere acknowledgement to all staff members of the blood donation center in Phayao hospital for their technical support. This research was financially supported from University of Phayao.

References

1. Bejrachandra S. Significance of hemoglobin determination in blood donor. *J Hematol and Transfus Med* 2013; 23: 3-5.
2. Cable RG. Hemoglobin determination in blood donors. *Transfus Med Rev* 1995; 9: 131-44.
3. Zwart A, van Assendelft OW, Bull BS, England JM, Lewis SM, Zijlstra WG. ICSH Recommendations for reference method for hemoglobinometry in human blood (ICSH standards 1995) and specifications for international hemoglobincyanamide standard. *J Clin Pathol* 1996; 49: 271-4.
4. Philipps RA, VanSlyke DD, Hamilton PB, Dole VP. Measurement of specific gravities of whole blood and plasma by standard copper sulphate solutions. *J Biol Chem* 1950; 183: 305-30.
5. Mendrone AJ, Sabino EC, Sampaio L, *et al.* Anemia screening in potential female blood donors: comparison of two different quantitative methods. *Transfusion* 2009; 49: 662-8.
6. James V, Jones KF, Turner EM, Sokol RJ. Statistical analysis of inappropriate results from current Hb screening methods for blood donors. *Transfusion* 2003; 43: 400-4.
7. Sawant RB, Bharucha ZS, Rajadhyaksha SB. Evaluation of hemoglobin of blood donors deferred by the copper sulphate method for hemoglobin estimation. *Transfus Apher Sci* 2007; 36: 143-8.
8. Morris LD, Osei-Bimpong A, McKeown D, Roper D, Lewis SM. Evaluation of the utility of the HemoCue 301 haemoglobinometer for blood donor screening. *Vox Sang* 2007; 93: 64-9.
9. Batkun K, Loavanichkul P, Sriwanitchrak P, Jeumjanya N, Nathalang O. Evaluation of portable hemoglobinometers for hemoglobin screening in Thai blood donors. *J Hematol Transfus Med* 2013; 23: 7-13.

10. Tondon R, Verma A, Pandey P, Chaudhary R. Quality evaluation of four hemoglobin screening methods in a blood donor setting along with their comparative cost analysis in an Indian scenario. *Asian J Transfus Sci* 2009; 3: 66-9.
11. Gomez-Simon A, Navarro-Nunez L, Perez-Ceballos E, *et al.* Evaluation of four rapid methods for hemoglobin screening of whole blood donors in mobile collection settings. *Transf Apher Sci* 2007; 36: 235-42.
12. Shyamsundar JR, Mustafa FR, Simmy L, Chandrashekhar NB, Ajay GP. Validation of Hemochroma PLUS: a point of care testing device for haemoglobin estimation. *J Clin Diagn Res* 2019; 13: 7-9.
13. Anukul N, Sombatmai R, Leetrakool N, Prakai S. Evaluation of capillary hemoglobin measurement from portable hemoglobinometers in blood donor screening. *J Hematol Transfus Med* 2018; 28: 121-9.
14. Wanyama FM, Sekadde-Kigundu C, Maturi P. Analytical evaluation of hemochroma POC haemoglobin reader. *J Med Diagn Meth* 2016; 5: 219.
15. Terry KK, Mae YL. Guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med* 2016; 15: 155-63.
16. Giancarlo L, Francesco B, Angela L, Pierluigi P, Gina R. Recommendations for the transfusion of red blood cells. *Blood Transfus* 2009; 7: 49-64.
17. Seema G, Ruhi M, Atul J, Ujwala M. Comparative study of haemoglobin estimation of blood donors by specific gravity (CuSO_4), Hemocue & automated cell counter methods. *Int J Recent Sci Res* 2015; 6: 5608-11.
18. Ganesh M, Ramesh B, Sudha SP, Tom T. Comparison of pre donation hemoglobin screening methods-implications of quality and cost. *Int J Contemp Med Res* 2016; 3: 2454-9.
19. Fabian SG, José CB, Helios PG, Giuseppe B, Giuseppe L. Hemoglobin point-of-care testing: The HemoCue System. *J Lab Autom* 2013; 18: 198-205.
20. Rippmann CE, Nett PC, Popovic D, Seifert B, Pasch T, Spahn DR. Hemocue, an accurate bedside method of hemoglobin measurement? *J Clin Monit* 1997; 13: 373-7.
21. Mathur A, Shah R, Shah P, Harimoorthy V, Choudhury N. Deferral pattern in voluntary blood donors on basis of low hemoglobin and effect of application of digital hemoglobinometer on this pattern. *Asian J Transfus Sci* 2012; 6: 179-81.
22. Mannarino AD, Macpherson CR. Copper sulfate screening of blood donors. *Transfusion* 1963; 3: 398-400.

23. Ralph DWJr, Ming Z, Maya RS, *et al.* Effects of preanalytical factors on hemoglobin measurement: A comparison of two HemoCue[®] point-of-care analyzers. Clin Biochem 2017; 50: 513-20.
24. Shalini B, Sonal J, Manju L. Estimation of hemoglobin in blood donors: A comparative study using Hemocue and cell counter. Transfus Apher Sci 2010; 43: 155-7.
25. Schalk E, Heim MU, Koenigsmann M, Jentsch-Ullrich K. Use of capillary blood count parameters in adults. Vox Sang 2007; 93: 348-53.
26. Kittisares K, Permpikul P, Kittivorapart J, *et al.* Evaluation of hemoglobin screening methods in prospective blood donors by using hemoglobin photometers. J Hematol Transfus Med 2015; 25: 307-12.

A Study of Reference Interval for Platelet Aggregation Test Using Light Transmission Aggregometry in Thai Population

Pawadee Chinudomwong, Karan Paisooksantivatana and Narin Khongjaroensakun*

*Hematology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital,
Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Light transmission platelet aggregometry (LTA) is one of the most well-known techniques for platelet function testing. LTA reference value is affected by several variables, for instance, ethnicity and difference of protocol among laboratories. To date, no study has been carried out to determine the reference value of LTA in Thai population. This study then aimed to analyze the reference value of LTA prospectively performed at Haematology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University. Data were collected from January 2018 to December 2019. The results revealed that the percentages of maximum aggregation which is the principal interpretative parameter of various studied agonists were the followings: 64.79 to 103.30% for 5 µg/mL collagen; 53.76 to 104.56% and 59.94 to 100.70% for 5 and 10 µmol/L epinephrine, respectively; 57.68 to 97.06% and 62.79 to 100.51% for 5 and 10 µmol/L ADP, respectively; 62.63 to 93.99% for 1.2 mg/mL ristocetin, and 63.32 to 99.12% for 1.2 mmol/L arachidonic acid. These revealed the contrast of results according to a previous study due to ethnicity and experimental protocol differences. Therefore, it is highly recommended that each laboratory establishes its own LTA reference value.

Keywords: Reference value, Platelet aggregation test, Thai population, Normal range, Light transmission platelet aggregometry

*Corresponding author E-mail address: narin.kho@mahidol.edu

การหาค่าอ้างอิงของการทดสอบ Platelet Aggregation Test ด้วยหลักการ Light Transmission Aggregometry ในประชากรไทย

ภาวดี ชินอุดมวงศ์ การ์นต์ ไผ่สุขสานติวัฒนา และ นรินทร์ คงเจริญสกุล*

ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวินิจฉัยการ ทำหน้าที่ผิดปกติของเกล็ดเลือด แต่กระนั้น ค่าอ้างอิงของการทดสอบได้รับผลกระทบจากตัวแปรหลาย ชนิด อาทิ เชื้อชาติ และความแตกต่างในขั้นตอนการวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ เนื่องจากยังไม่เคย มีการรายงานค่าอ้างอิงของการทดสอบดังกล่าวในประชากรไทยมาก่อน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ หาค่าอ้างอิงของการทดสอบซึ่งอาศัยหลักการ light transmission aggregometry ในการตรวจวิเคราะห์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า โดยเก็บข้อมูลในห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2562 ผลการศึกษาพบว่า ค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลัก ที่ใช้ในการแปลผลการวิเคราะห์จำแนกตามชนิดและความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดเป็นดังนี้ คอลลาเจนที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 64.79 ถึง 103.30 สำหรับ epinephrine ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 53.76 ถึง 104.56 และ 59.94 ถึง 100.70 ตามลำดับ ADP ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 57.68 ถึง 97.06 และ 62.79 ถึง 100.51 ตามลำดับ ristocetin ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 62.63 ถึง 93.99 และ arachidonic acid ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 63.32 ถึง 99.12 ซึ่งแตกต่าง จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากกลุ่มประชากรที่ศึกษาและขั้นตอนในการวิเคราะห์มีความ แตกต่างกัน ดังนั้น จึงแนะนำให้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งหาค่าอ้างอิงของการทดสอบนี้ขึ้นเอง

คำสำคัญ: ค่าอ้างอิง การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ค่าปกติ ประชากรไทย การวัดการเกาะกลุ่มจากการส่งผ่าน ของแสง

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: narin.kho@mahidol.edu

รับบทความ: 22 พฤษภาคม 2563

แก้ไขบทความ: 1 กรกฎาคม 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 23 พฤศจิกายน 2563

บทนำ

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นการทดสอบเพื่อประเมินความสามารถในการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือด (platelet function testing) สามารถทำการทดสอบได้หลายหลักการ เช่น impedance, single platelet counting และการตรวจการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากการส่งผ่านของแสง (light transmission aggregometry; LTA) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด⁽¹⁾

หลักการของ LTA คือ เมื่อเติมสารที่มีสมบัติเป็นตัวกระตุ้นเกล็ดเลือด (platelet agonist) เช่น คอลลาเจน epinephrine และ adenosine diphosphate (ADP) ลงไปในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก (platelet rich plasma; PRP) เกล็ดเลือดในพลาสมาจะถูกกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่ม ทำให้พลาสมาใสขึ้น เครื่องวิเคราะห์จะวัดการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ส่งผ่านจากหลอดทดลอง แล้วแปลงเป็นกราฟแสดงความสามารถในการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด พารามิเตอร์ที่ใช้ในการแปลผล ได้แก่ ค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุด (percentage of maximum aggregation) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลัก เวลาที่เกิดการเกาะกลุ่มสูงสุด (time to maximum aggregation; T_{max}) และความชันของกราฟ นอกจากนี้ ตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดบางชนิดยังมีพารามิเตอร์ที่สามารถใช้ประกอบการแปลผลเพิ่มเติม เช่น lag phase กรณีตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิดคอลลาเจน ซึ่งเกิดจากระยะเวลาตั้งแต่เริ่มเติมตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดลงในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากจนกระทั่งเริ่มเกิดการเกาะกลุ่มหรือรูปร่างกราฟแสดงความสามารถในการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่แบ่งเป็นสองช่วง (biphasic aggregation) กรณีตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิด epinephrine และ ADP เป็นต้น ซึ่งกราฟในช่วงแรกเกิดจาก

การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่เติมลงในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก จากนั้นเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะหลั่งตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่อยู่ภายในเกล็ดเลือดออกมาเพื่อกระตุ้นเกล็ดเลือดที่อยู่บริเวณใกล้เคียงให้เกิดการเกาะกลุ่มทำให้เกิดกราฟช่วงที่สอง^(2, 3) ดังตัวอย่างแสดงใน Fig. 1 หากพารามิเตอร์ใดมีค่าผิดปกติ จะถือว่าเกล็ดเลือดมีความผิดปกติของการทำงานผ่านกลไกที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดนั้นๆ ในการแปลผลการทดสอบ ต้องพิจารณาผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดหลายชนิดประกอบกัน เนื่องจากความผิดปกติของการทำงาน of เกล็ดเลือดแต่ละโรคมีรูปแบบความผิดปกติของการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ต่างกันออกไป อาทิ ผู้ป่วยโรค Glanzmann thrombasthenia ซึ่งมีความผิดปกติของตัวรับสัญญาณไกลโคโปรตีนชนิด IIb/IIIa (glycoprotein IIb/IIIa receptor; GPIIb/IIIa) หรือผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของตัวรับสัญญาณดังกล่าว เช่น ยา abciximab, eptifibatide หรือ tirofiban จะมีค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดทุกชนิด ยกเว้น ristocetin ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าอ้างอิง เนื่องจาก ristocetin เป็นตัวกระตุ้นที่ไม่ได้ใช้ GPIIb/IIIa ในการกระตุ้นเกล็ดเลือด ในขณะที่ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือด แอสไพริน ควรจะมีค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิดคอลลาเจน และ arachidonic acid ต่ำกว่าค่าอ้างอิง เนื่องจาก แอสไพริน มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส (cyclooxygenase; COX) ทำให้เกล็ดเลือดไม่สามารถเปลี่ยน arachidonic acid เป็น Thromboxane A_2 ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด ดังนั้น แพทย์จึงใช้การทดสอบนี้ช่วยในการวินิจฉัยโรค

เลือดออกหยุดยากที่เกิดจากความผิดปกติของระบบการห้ามเลือดปฐมภูมิ (primary haemostasis) รวมถึงใช้ในการติดตามการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือดได้⁽⁴⁻⁶⁾

อย่างไรก็ตาม มีตัวแปรหลายชนิดที่สามารถส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ด้วยหลักการ LTA เช่น เชื้อชาติ การสูบบุหรี่ ยาที่รับประทาน การรับประทานยาที่มีไขมันสูงก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด ความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้และวิธีการเตรียมพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก^(1, 2, 7-10) ดังนั้น ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจึงควรหาค่าอ้างอิงของการวิเคราะห์เอง^(4, 11, 12) ทั้งนี้ เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานค่าอ้างอิงของการวิเคราะห์นี้ในประเทศไทยมาก่อน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่าอ้างอิงของการทดสอบนี้ที่ทำโดยหลักการ LTA ในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ ประชากรที่ศึกษา

งานวิจัยนี้มีลักษณะเป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า โดยเก็บข้อมูลจากอาสาสมัครอายุระหว่าง 18-50 ปีที่ผ่านเกณฑ์การคัดเข้าครบทุกข้อดังนี้ 1) ปฏิเสธประวัติโรคเลือดออกง่ายหยุดยากทั้งของตนเองและครอบครัว 2) ปฏิเสธประวัติการรับประทานยาใดๆ ในช่วง 14 วันก่อนเก็บตัวอย่างเลือด และ 3) ปฏิเสธประวัติสูบบุหรี่ อาสาสมัครที่มีคุณสมบัติตรงกับเกณฑ์คัดออกอย่างน้อย 1 ข้อ ได้แก่ 1) พบปัญหาจากการเก็บตัวอย่างเลือด เช่น มีก้อนเลือดในหลอดเลือด ปริมาตรเลือดไม่ได้สัดส่วนกับสารกันเลือดแข็งในหลอดเลือด 2) สีของพลาสมาผิดปกติ เช่น ขุ่นหรือมี hemolysis จนสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และ 3) ระดับเกล็ดเลือดในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากมีค่าน้อยกว่า 100,000/ μ L จะถูกคัดออกจากงานวิจัยโดยพารามิเตอร์ที่ศึกษา ได้แก่ ค่าอัตราร้อยละของการ

เกาะกลุ่มสูงสุด เวลาที่เกิดการเกาะกลุ่มสูงสุด (time to maximum aggregation; T_{max}) lag phase และความชันของกราฟ ซึ่งมีนิยามดังแสดงใน Fig. 1 การเก็บข้อมูลดังกล่าวรวบรวมจากฐานข้อมูลที่บันทึกในเครื่องวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (รหัสโครงการ MURA2020/299 Ref.106)

การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

อาสาสมัครแต่ละราย ได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดเลือดที่บรรจุโซเดียมซิเตรตเป็นสารกันเลือดแข็งโดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 3.2 ปริมาตร 5 มิลลิตร จำนวน 2 หลอด โดยขั้นตอนของการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดกระทำตามข้อกำหนดขององค์กร Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) รหัสเอกสาร H21-A5 และ H58-A เพื่อลดการกระตุ้นเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง (*in vitro* platelet activation)^(1, 13) จากนั้น หลอดเลือดทุกหลอดจะถูกนำไปปั่นที่ความเร็ว 180 g นาน 10 นาทีเพื่อให้ได้พลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก แบ่งพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากที่ได้ออกมาส่วนหนึ่งใส่หลอดพลาสติกเปล่าชนิดโพลีโพรพิลีน และนำเลือดส่วนที่เหลือไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 1,928 g นาน 10 นาทีเพื่อให้ได้พลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อย (platelet poor plasma; PPP) ตรวจระดับเกล็ดเลือดของพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter รุ่น DxH 800 ตัวอย่างที่มีระดับเกล็ดเลือดสูงกว่า 250,000/ μ L ต้องเจือจางด้วยพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อยของอาสาสมัครรายนั้น

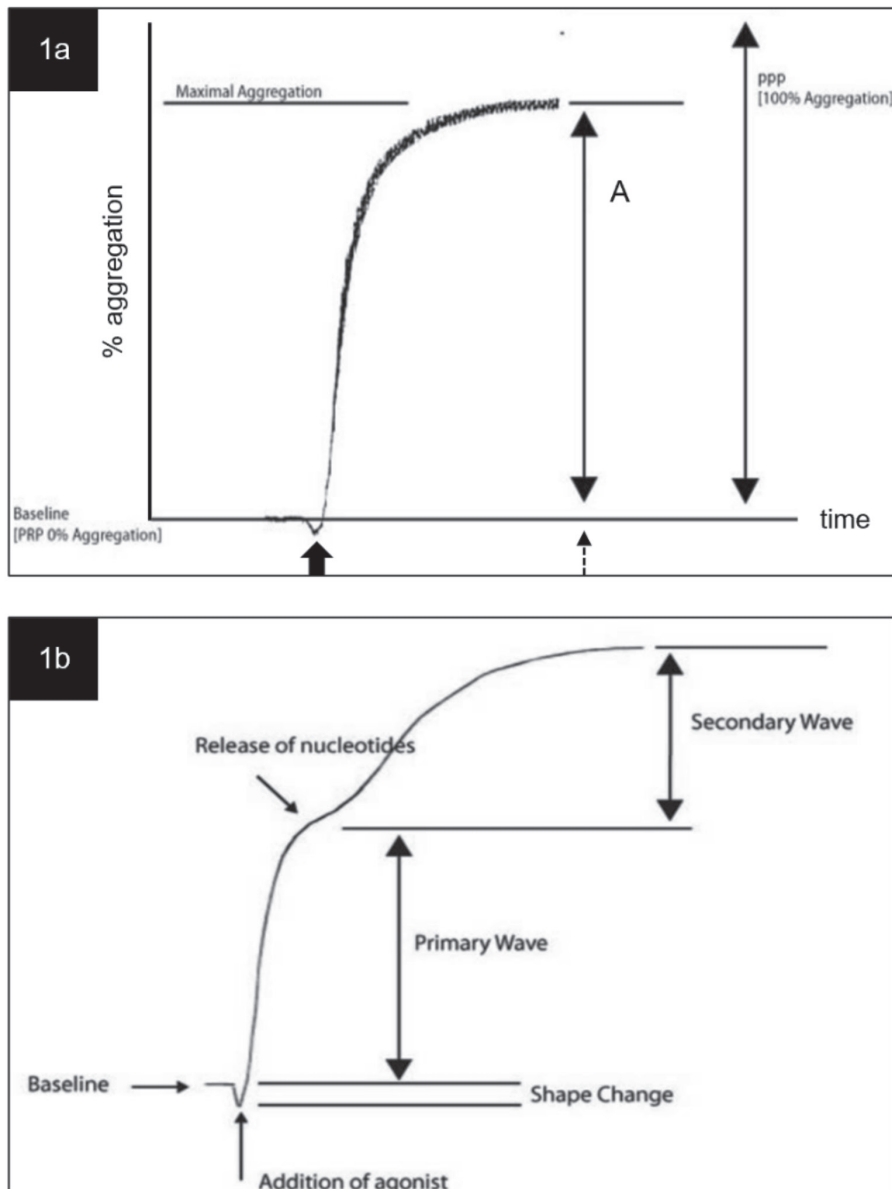


Fig. 1 An aggregation trace represents general (1a) and biphasic aggregation pattern (1b).

Baseline and 100% aggregation values were calculated from the O.D. of PRP and PPP, respectively. Percentage of maximum aggregation was calculated from the difference of O.D. between maximal aggregation point and baseline. In Fig. 1a, the thick and dash arrows demonstrate lag phase and T_{max} , respectively. Slope was calculated from the height of aggregation trace (double-headed arrow "A") divided by the reaction time. This figure was adapted from the original by Perry DJ.⁽¹⁹⁾

(autologous PPP) เพื่อปรับให้มีระดับเกล็ดเลือดเท่ากับ 250,000/ μ L ก่อน ตัวอย่างที่เตรียมไว้จะต้องนำไปตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมงนับตั้งแต่เวลาที่เจาะเก็บตัวอย่าง

เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้

งานวิจัยนี้ใช้เครื่องวิเคราะห์ Helena AggRAM (Helena Laboratories, Texas, USA) ก่อนการทดสอบทุกครั้งจะต้องปรับค่า optical density (O.D.) ของเครื่องให้เป็นศูนย์ (blank adjustment) โดยวัดค่า O.D. ของพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อยของอาสาสมัครรายที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเริ่มทดสอบโดยการเติมตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก ปริมาตร 225 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด วิเคราะห์ภายใต้อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการคน (stir speed) 600 รอบต่อนาที และระยะเวลาสูงสุดในการทดสอบไม่เกิน 600 วินาที

ความเข้มข้นหลังเติมลงในพลาสมา (final concentration) ของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นไปตามคำแนะนำของ North American Specialized Coagulation Laboratory Association (NASCOLA)⁽⁴⁾ ได้แก่ คอลลาเจน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร epinephrine 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร ADP 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร ristocetin 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ arachidonic acid 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งทั้งหมดนี้เตรียมขึ้นจากน้ำยาสำเร็จรูป RevohemTM (HYPHEN BioMed, Neuville-sur-Oise, France) โดยเตรียมและเก็บรักษาน้ำยาตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (internal quality control; IQC) ของการทดสอบนี้จะกระทำทุกครั้งก่อนเริ่มทำการทดสอบในแต่ละวัน

ตามคำแนะนำของกลุ่มการใช้งานเครื่องวิเคราะห์ กล่าวคือ วัดค่า O.D. ของช่องวัดทุกช่องโดยใช้น้ำกลั่น กำหนดให้ค่า O.D. ของช่องวัดทุกช่องต้องอยู่ระหว่าง 0.145 ถึง 0.217 และความแตกต่างของค่า O.D. ในแต่ละช่องน้อยกว่าร้อยละ $10^{(14)}$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทุกพารามิเตอร์ได้รับการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลด้วยการทดสอบทางสถิติ Shapiro-Wilk test การรายงานค่าอ้างอิงของพารามิเตอร์ที่มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นปกติ ทำในรูปของ mean $\pm$ 2SD ขณะที่ค่าอ้างอิงของพารามิเตอร์ที่มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นปกติ รายงานในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ โดยกำหนดค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของค่าอ้างอิงในแต่ละพารามิเตอร์ที่เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 2.5 และเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 97.5 ตามลำดับ การศึกษาเชิงสหสัมพันธ์ (correlation studies) ระหว่างพารามิเตอร์ด้านภูมิประชากรศาสตร์ (demographic data) กับพารามิเตอร์ที่ศึกษาได้รับการวิเคราะห์ด้วยการคำนวณสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ P -value น้อยกว่า 0.05 การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดทำโดยโปรแกรม MedCalc[®] Statistical Software รุ่น 19.2.1 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium)

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีอาสาสมัครเข้าร่วมรวมทั้งสิ้น 45 ราย เป็นเพศชาย 10 ราย (ร้อยละ 22.22 ของจำนวนอาสาสมัครทั้งหมด) ค่ามัธยฐานของอายุอาสาสมัครคือ 34 ปี (ค่าพิสัยควอไทล์ 27-41 ปี) ระดับเกล็ดเลือดในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากได้รับการจำแนกตามชนิดและความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Demographic data in this study

Parameters	Results*
Male (%)	10/ 22 (45%)
Age (years)	34 (27-41)
Platelet count in PRP (μ L)	
- 5 μ g/mL collagen	285,000 (220,000-380,000)
- 5 μ mol/L epinephrine	290,000 (200,000-390,000)
- 10 μ mol/L epinephrine	314,000 (228,000-390,000)
- 5 μ mol/L ADP	292,500 (235,000-370,000)
- 10 μ mol/L ADP	296,500 (257,000-366,000)
- 1.2 mg/mL ristocetin	308,500 (262,000-385,000)
- 1.2 mmol/L arachidonic acid	314,000 (245,000-363,000)

*All results, except sex, were reported as median and interquartile range.

อนึ่ง จำนวนตัวอย่างที่ได้ทดสอบมากกว่าจำนวนอาสาสมัครในงานวิจัย เนื่องจากมีอาสาสมัครบางรายที่ได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดมากกว่าหนึ่งครั้ง นอกจากนี้ ตัวอย่างที่ได้รับการทดสอบด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดแต่ละชนิดมีจำนวนแตกต่างกัน เนื่องจากห้องปฏิบัติการจะทดสอบตัวอย่างจากอาสาสมัครด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดทุกชนิดและทุกความเข้มข้นเช่นเดียวกับที่ทดสอบกับผู้ป่วยด้วยเสมอ ตามข้อแนะนำของ Scientific and Standardization Committee (SSC/ISTH) และ NASCOLA^(4, 15) อีกทั้งห้องปฏิบัติการจำแนกการทดสอบนี้ออกเป็นหลายชุดตามวัตถุประสงค์ทางคลินิก การทดสอบแต่ละชุดจึงประกอบด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่มีชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 2

ข้อมูลค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดทุกชนิดและทุกความเข้มข้นยกเว้น ADP ที่ความเข้มข้น 5

ไมโครโมลต่อลิตร มีการกระจายตัวเป็นปกติ โดยผลของการศึกษาเป็นดังต่อไปนี้ ค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดของคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 64.79 ถึง 103.30 สำหรับ epinephrine ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 53.76 ถึง 104.56 และ 59.94 ถึง 100.70 ตามลำดับ ADP ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 57.68 ถึง 97.06 และ 62.79 ถึง 100.51 ตามลำดับ ristocetin ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 62.63 ถึง 93.99 และ arachidonic acid ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 63.32 ถึง 99.12

สำหรับข้อมูลของพารามิเตอร์อื่น ได้แก่ เวลาที่เกิดการเกาะกลุ่มสูงสุด lag phase และความชันของกราฟ ล้วนมีการกระจายตัวไม่เป็นแบบปกติ ผลการศึกษาดังแสดงใน Table 2 สำหรับการ

Table 2 The reference value of parameters in this study, categorized by type and concentration of platelet agonists

Platelet agonist & concentration	Number of tested samples	Parameters			
		MA (%)	Lag phase (secs)*	Slope*	Tmax (secs)*
5 µg/mL collagen	113	64.79 -103.30	0-20.31	107.32 - 233.56	138.65 - 384.5
5 µmol/L epinephrine	112	53.76 -104.56	n/a	19.22 - 122.86	155.60 - 548.70
10 µmol/L epinephrine	68	59.94 -100.70	n/a	30.24 - 113.26	152.20 - 424.80
5 µmol/L ADP	114	57.68 - 97.06*	n/a	51.35 - 174.20	100.90 - 425.60
10 µmol/L ADP	173	62.79 -100.51	n/a	86.75 - 180.38	110.25 - 329.45
1.2 mg/mL ristocetin	100	62.63 - 93.99	n/a	49.60 - 196.70	54.00 - 406.00
1.2 mmol/L arachidonic acid	109	63.32 - 99.12	n/a	82.69 - 251.38	93.00 - 277.38

Abbreviations: n/a, no data; MA, percentage of maximum aggregation; T_{max}, time to maximum aggregation; secs, seconds

*The results were reported as median and interquartile range.

ศึกษาเชิงสหสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ด้านภูมิประชากรศาสตร์กับพารามิเตอร์ที่ศึกษา ไม่พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างพารามิเตอร์ใดๆ (ไม่แสดงข้อมูล)

วิจารณ์ผลการทดลอง

แม้การตรวจการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากการส่งผ่านของแสงจะเป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด แต่เนื่องจากตัวแปรหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งความแตกต่างในขั้นตอนการวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้การทดสอบนี้มีความแปรปรวนสูง ดังนั้น จึงมีการจัดทำแนวปฏิบัติสำหรับการทดสอบเพื่อให้ขั้นตอนการวิเคราะห์ในแต่ละห้องปฏิบัติการเป็นไปในแนวทางเดียวกัน ส่งผลให้ความแปรปรวนของการทดสอบลดลง^(1, 16) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลัก

ที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Hayward CPM และคณะ⁽¹⁷⁾ พบว่ามีความแตกต่างกันดังแสดงใน Table 3 เนื่องจากความแตกต่างของหลายปัจจัย อาทิ เครื่องวิเคราะห์ที่ใช้ ยี่ห้อ ความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้ และขั้นตอนการเตรียมพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก่อนทำการทดสอบ ด้วยเหตุนี้ องค์การระดับนานาชาติ อาทิ SSC/ISTH และ NASCOLA จึงยังคงแนะนำให้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งตรวจวิเคราะห์หาค่าอ้างอิงของการทดสอบนี้เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการของตนเอง^(2, 4)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาในกลุ่มประชากรไทย ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน เชื่อว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เปิดให้บริการการทดสอบนี้ รวมถึงห้องปฏิบัติการที่วางแผนจะเปิดให้บริการการทดสอบนี้ต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตาม มีปัจจัยรบกวนหลายอย่างที่ยังไม่ได้รับการ

Table 3 Comparison of the percentage of maximum aggregation between this study and the study by Hayward CPM, *et al.**(17)

Platelet agonist	This study		Hayward CPM, <i>et al.</i>	
	Concentration	MA (%)	Concentration	MA (%)
collagen	5 µg/mL	64.79 - 103.30	5 µg/mL	85.00 - 104.00
epinephrine	5 µmol/L	53.76 - 104.56	6 µmol/L	9 - 100
epinephrine	10 µmol/L	59.94 - 100.70	10 µmol/L	n/a
ADP	5 µmol/L	57.68 - 97.06	5 µmol/L	43.00 - 97.00
ADP	10 µmol/L	62.79 - 100.51	10 µmol/L	n/a
ristocetin	1.2 mg/mL	62.63 - 93.99	1.25 mg/mL	75 - 100
arachidonic acid	1.2 mmol/L	63.32 - 99.12	1.6 mmol/L	77 - 99

Abbreviations: n/a, no data; MA, percentage of maximum aggregation

* Statistically significant difference cannot be analyzed due to the difference of data distribution.

ควบคุมที่ดีพอ เช่น การประเมินความผิดปกติของลิพลาสมาโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า หรือการควบคุมการบริโภคอาหารบางชนิดที่มีผลต่อการทำงานของเกล็ดเลือด เช่น กาแฟ ก่อนเก็บตัวอย่างเลือด^(9, 18) ดังนั้น ในการให้บริการการทดสอบนี้ ควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลกระทบต่อค่าอ้างอิงดังกล่าวข้างต้น

สรุป

ค่าอ้างอิงของการตรวจวิเคราะห์การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ได้จากงานวิจัยนี้แตกต่างจากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ เนื่องจากความแตกต่างของตัวแปรหลายชนิดที่สามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบ อาทิ เชื้อชาติ และความหลากหลายของขั้นตอนการวิเคราะห์ จึงแนะนำให้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งทดสอบหาค่าอ้างอิงของการวิเคราะห์นี้ขึ้นเอง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณอนุชา สร้อยสำโรง คุณอัญชลี ฤกษ์นันท์ คุณสรณรงค์ พูลสวัสดิ์ คุณธรรดา แก้วไธ คุณเกษมศรี เกื้อทาน คุณกังวาล คงบวรเกียรติ คุณศิริรัตน์ สถานสุข และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความช่วยเหลือในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Clinical Laboratory Institute (CLSI) . H58-A: platelet function testing by aggregometry; approved guideline. First edit. Vol. 28. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; 2008.

2. Cattaneo M, Hayward CPM, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 1029.
3. Lages B, Weiss HJ. Biphasic aggregation responses to ADP and epinephrine in some storage pool deficient platelets: relationship to the role of endogenous ADP in platelet aggregation and secretion. *Thromb Haemost* 1980; 43: 147-53.
4. Hayward CP, Moffat KA, Raby A, *et al*. Development of North American Consensus Guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2010 [cited 2018 Oct 2]; 134: 955-63. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCP9V3R-RVNZMKDS>
5. Bultas J. Antiplatelet therapy—A pharmacologist’s perspective. *Cor Vasa* [Internet]. 2013; 55: e86-94. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010865013000325>
6. Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 314-22.
7. Born GVR. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature* [Internet]. 1962; 194: 927-9. Available from: <https://doi.org/10.1038/194927b0>
8. O’Brien J. Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study. *J Clin Pathol* [Internet]. 1962; 15: 452-5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16810986>
9. Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 172-83.
10. Alessi M-C, Sié P, Payrastre B. Strengths and Weaknesses of Light Transmission Aggregometry in Diagnosing Hereditary Platelet Function Disorders. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Mar 12; 9: 763. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32178287>
11. Miller CH, Rice AS, Garrett K, Stein SF. Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *Br J Haematol* [Internet]. 2014; 165: 842-53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24617520>

12. Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Nichols WL, Hayward CPM. Variability in clinical laboratory practice in testing for disorders of platelet function: results of two surveys of the North American Specialized Coagulation Laboratory Association. *Thromb Haemost* 2005; 93: 549-53.
13. Clinical & Laboratory Standards Institute. H21-A5: collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline. Fifth Edit. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; 2008.
14. Helena Laboratories. AggRAM System: operator's manual. Texas: Helena Laboratories; p. 1-108.
15. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, *et al.* Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013, 11: 1183-9
16. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, Jurk K. Standardization of light transmission aggregometry for diagnosis of platelet disorders: an inter-laboratory external quality assessment. *Thromb Haemost* 2019; 119: 1154-61.
17. Hayward CPM, Moffat KA, Pai M, *et al.* An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission platelet aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thromb Haemost* 2008 Jul; 100: 134-45.
18. Natella F, Nardini M, Belelli F, *et al.* Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr* 2008 Dec; 100: 1276-82.
19. Perry DJ. Platelet function testing light transmission aggregometry [LTA] [Internet]. SANG Medicine. 2020 [cited 2020 Jul 4]. p. 7. Available from: https://practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html

Efficiency Improvement of The Workflow for Nucleated Red Blood Cell (NRBC) Enumeration by Beckman Coulter Unice1[®]DxH Hematology Analyzer

Pichaisiri Nualmanee, Nutdanai Chaothai, Benjarat Chatachote and
Karan Paisooksantivatana*

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Manual blood smear examination is a standard method for nucleated red blood cells (NRBC) reporting. However, it is a time-consuming, labor-intensive, and costly method. Modern hematology analyzers can automatically quantify NRBC but with some limitations. This study aimed to establish a workflow for NRBC reporting to maximize its accuracy as well as to enhance its efficiency. NRBC measurement of 241 blood samples was carried out using Beckman Coulter Unice1[®]DxH800. The results were compared against manual examination. The receiver operating characteristic (ROC) analysis and a decision tree model (Gini impurity) were conducted to construct workflows which incorporated NRBC (%) and related flags from the analyzer. The effectiveness of workflows was evaluated by sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predictive values (NPV) while efficiency was assessed by the rate of manual slide review. The strong agreement between the automated analyzer and the manual NRBC count was found ($r = 0.98$; $p < 0.0001$, bias -0.7). To reduce clinical errors by taking NPV into account, the findings were as followed. By using the cutoff at the limit of detection of the analyzer ($<0.1\%$) alone, 100% NPV could be achieved but the efficiency was compromised due to the high slide review rate (59.3%). On the other hand, the cut-off derived from the ROC analysis ($<0.4\%$ and $<1.8\%$) could drastically reduce the slide review rate (29.0% and 7.9% respectively) but the false-negative rate was escalated (7 and 32 samples) with compromised NPV (95.9% and 85.6%). Alternatively, 100% NPV could be achieved using a decision tree that incorporated both a numerical value and certain flags with acceptable efficiency (48.1% manual slide review rate). Reporting NRBC from the automated hematology analyzer improves the workflow and efficiency of the laboratory. However, due to the variation of analyzers and patient characteristics, an individual laboratory should construct and verify its own workflow before implementation to ensure acceptable accuracy and efficiency.

Keywords: Efficiency, Automated hematology analyzer, Nucleated red blood cell

*Corresponding author E-mail address: karan.pai@mahidol.ac.th

Received: 26 June 2020

Revised: 31 July 2020

Accepted: 16 September 2020

การเพิ่มประสิทธิภาพการรายงานผล Nucleated Red Blood Cell จากเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Beckman Coulter Unice1[®]DxH

พิชัยสิริ นวลมณี ญัฐคนัย ชาวไทย เบญจรัตน์ ชาศะโชติ และ การ์นต์ ไพสุขสานติวัฒนา*

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การตรวจสเมียร์เลือดเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการนับจำนวน nucleated red blood cell (NRBC) แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลา ใช้แรงงาน และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ปัจจุบันเครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติหลายรุ่นสามารถตรวจนับจำนวน NRBC พร้อมกับการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC) ได้ ซึ่งสะดวกและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดและปัจจัยรบกวนหลายอย่างที่อาจทำให้ผลตรวจโดยเครื่องอัตโนมัติผิดพลาด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องอัตโนมัติที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลรามาธิบดี เพื่อจัดทำแนวทางการรายงานผล NRBC ให้ถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุด การศึกษาใช้เลือด 241 ตัวอย่าง นับจำนวน NRBC โดยเครื่อง Beckman Coulter Unice1[®]DxH800 เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการตรวจสเมียร์เลือด จากนั้นได้ออกแบบแนวทางการรายงานผลโดยใช้การวิเคราะห์ receiver operating characteristic (ROC) และแผนภูมิทางเลือกตัดสินใจ (decision tree) ประเมินประสิทธิภาพของแต่ละแนวทางโดยใช้สถิติ ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก (PPV) ค่าทำนายผลลบ (NPV) และอัตรา การตรวจสเมียร์เลือด โดยให้ความสำคัญกับค่าทำนายผลลบและอัตราผลลบลงเป็นอันดับแรกเพื่อความถูกต้องของผลที่จะนำไปใช้วินิจฉัยผู้ป่วย และอัตราการตรวจสเมียร์เลือดที่จะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพ ผลการศึกษาพบความสัมพันธ์ของค่าที่ได้จากทั้งสองวิธีอยู่ในระดับที่ดี ($r = 0.98$; $p < 0.0001$, bias -0.7) และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพของแนวทางการรายงานผล พบว่า แผนภูมิทางเลือกตัดสินใจที่สร้างขึ้นโดยใช้ค่า NRBC และ flag จากเครื่องตรวจวิเคราะห์ร่วมกันให้ค่าทำนายผลลบที่สูงคือร้อยละ 100 ไม่มีผลลบลง และให้อัตราการตรวจสเมียร์เลือดต่ำกว่าการใช้เกณฑ์ตามขีดจำกัดของการระบุปริมาณ (limit of quantification; LOQ) ของเครื่องตรวจวิเคราะห์เพียงอย่างเดียว สรุปว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติสามารถใช้รายงานผล NRBC ได้ แต่ต้องหาเกณฑ์ หรือแนวทางการรายงานผลที่เหมาะสมสำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: ประสิทธิภาพ เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: karan.pai@mahidol.ac.th

รับบทความ: 26 มิถุนายน 2563

แก้ไขบทความ: 31 กรกฎาคม 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 16 กันยายน 2563

บทนำ

Nucleated red blood cells (NRBC) คือ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ยังมีนิวเคลียสอยู่⁽¹⁻³⁾ การตรวจพบ NRBC ในกระแสเลือดมีความสำคัญทางคลินิก เพราะช่วยบ่งชี้ภาวะผิดปกติ หรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก เช่น ภาวะขาดออกซิเจนอย่างรุนแรง ภาวะเลือดออกมาก และภาวะไขกระดูกเสียหาย⁽⁴⁻⁶⁾ นอกจากนี้มีรายงานว่า การพบ NRBC ในกระแสเลือดยังเป็นตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรคในหลายภาวะ⁽⁷⁻¹⁰⁾

การตรวจนับจำนวน NRBC ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปใช้วิธีตรวจสเมียร์เลือด (peripheral blood smear; PBS)⁽¹¹⁾ ซึ่งใช้เวลามาก ต้องอาศัยแรงงานคน เพิ่มค่าใช้จ่ายสำหรับห้องปฏิบัติการ ระยะเวลาการรอคอยผลนานและทำให้เจ้าหน้าที่มีเวลาตรวจสเมียร์เลือดน้อยลงในรายอื่นๆ ที่จำเป็นมากกว่า⁽¹²⁾ ปัจจุบันเครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดรุ่นใหม่ ๆ หลายรุ่นสามารถนับจำนวน NRBC ได้โดยอัตโนมัติ และสามารถรายงานผลได้พร้อมกับพารามิเตอร์อื่นๆ ของการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC) โดยสามารถตรวจพบ NRBC ได้แม้มีระดับต่ำ เช่น 0.1 NRBC/100 white blood cells (WBCs) ใช้เวลาตรวจวิเคราะห์น้อย รวมทั้งมี flags เตือนหากมีปัญหาเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ ทำให้สามารถนำมาใช้ช่วยลดภาระในการตรวจสเมียร์เลือดเพื่อบ่งชี้จำนวน NRBC ได้⁽¹³⁻¹⁴⁾ อย่างไรก็ตาม มีข้อมูลว่าการตรวจนับจำนวน NRBC โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อาจถูกรบกวนได้จากหลายสาเหตุ เช่น เก็ดเลือดขนาดใหญ่ การรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด ลิ้มโฟไซต์ขนาดเล็ก มาลาเรียและเม็ดเลือดแดงชนิดที่ทนต่อการไลซิส (lysis-resistant red blood cells)⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ สาเหตุเหล่านี้ทำให้เกิดผลบวกปลอมซึ่งนำไปสู่การตรวจสเมียร์เลือดที่ไม่จำเป็น แต่หากปล่อยผลไปจะเป็นการเพิ่ม

ภาระงานของแพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยในการสืบค้นหาสาเหตุโดยไม่จำเป็นได้เช่นกันหรือหากผลตรวจเป็นผลลบปลอมก็จะทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการดูแลวินิจฉัยที่ถูกต้อง

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาแนวทางปฏิบัติสำหรับการรายงานผล NRBC โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้มีความถูกต้องแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูงสุด

วัสดุและวิธีการ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบแบบตัดขวาง (cross-sectional comparative study) โดยได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (เลขที่ MURA2019/641) ใช้สิ่งส่งตรวจ K₂ EDTA blood ที่เหลือจากงานประจำจำนวน 241 ตัวอย่าง ที่ส่งมาตรวจในห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2562

การนับจำนวน NRBC โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ใช้เครื่องรุ่น Beckman Coulter UniceL[®]DxH800 ซึ่งใช้หลักการ (VCS) รายงานผลเป็นจำนวน NRBC/100WBCs⁽¹⁴⁾ โดยเก็บข้อมูล flag ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Low events: N, Abn NRBC Pattern, NRBC Inter, Cellular Inter, High Event Rate: D และ Low Events: D ส่วนการนับจำนวน NRBC ใช้การตรวจสเมียร์เลือดเพื่อบ่งชี้แยกชนิดเม็ดเลือดขาว 200 เซลล์⁽¹⁸⁾ โดยนักเทคนิคการแพทย์ 3 ท่าน และรายงานผลเป็นจำนวน NRBC/100WBCs

การรายงานผลมี 4 แนวทางที่ใช้เกณฑ์แตกต่างกันดังนี้ 1. ใช้เกณฑ์ตามขีดจำกัดของการระบุปริมาณ (limit of quantification; LOQ) ของเครื่องตรวจวิเคราะห์ UniceL[®]DxH800 ที่ค่า 0.1

NRBC/100WBCs ตามแนวทางของ International Council for Standardization in Haematology (ICSH)⁽¹⁹⁾ 2. ใช้เกณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ receiver operating characteristic (ROC) โดยไม่นำค่าความชุกและ estimated cost มาใช้ในการคำนวณ 3. ใช้เกณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ receiver operating characteristic (ROC) โดยนำค่าความชุกและ estimated cost มาใช้ในการคำนวณด้วย 4. ใช้แผนภูมิทางเลือกตัดสินใจ (decision tree) ซึ่งเป็นการเรียนรู้ของเครื่องมือ (machine learning) รูปแบบหนึ่งที่ใช้ปัจจัยเกี่ยวข้องหลายๆ ส่วน มาทำนายหรือจัดกลุ่มตัวแปรที่จะศึกษา⁽²⁰⁾ โดยใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ เช่น Gini impurity ในการเลือกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำนายตัวแปรที่ศึกษา⁽²¹⁾ การศึกษานี้ใช้ค่าจากเครื่องตรวจวิเคราะห์ร่วมกับ flag ที่เกี่ยวข้อง

การวิเคราะห์ผล ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel และ MedCalc Statistical Software version 19.1.6 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) ประเมินประสิทธิภาพของเครื่องตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือการตรวจสเมียร์เลือด โดยใช้สถิติ paired t-test ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น และการวิเคราะห์ Bland-Altman ส่วนการประเมินประสิทธิภาพของแนวทางการรายงานผลแบบต่างๆ ใช้สถิติ ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ผลบวกหลง (false-positive results) ผลลบหลง (false-negative results) และร้อยละอัตราการตรวจสเมียร์เลือด

ผลการวิจัย

ประสิทธิภาพของเครื่องตรวจวิเคราะห์ในการรายงานจำนวน NRBC เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลเปรียบเทียบค่า NRBC จากเครื่องตรวจวิเคราะห์และการตรวจสเมียร์เลือดพบค่าจากทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (paired t-test, $p = 0.024$) ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.98 ($p < 0.0001$) โดยได้สมการความสัมพันธ์คือ $y = 0.239 + 0.398x$ ส่วนการวิเคราะห์ Bland-Altman พบมีค่าความแตกต่างเฉลี่ย (mean bias) ที่ -0.7 NRBC/100 WBCs และ limit of agreement อยู่ในช่วง -10.8 ถึง +9.3 NRBC/100 WBCs (Fig. 1) และ flag ที่พบบ่อยสามอันดับแรก ได้แก่ Low events: N, Abn NRBC Pattern และ NRBC Inter (Table 1)

การประเมินประสิทธิภาพของแนวทางการรายงานผลแบบต่าง ๆ

ประสิทธิภาพของแนวทางการรายงานผล 4 แบบ (Table 2) สรุปได้ดังนี้ **แบบที่ 1** ใช้เกณฑ์ LOQ ของเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่ค่า NRBC $\geq 0.1/100\text{WBCs}$ ตามแนวทางของ ICSH⁽²³⁾ ไม่พบผลลบหลง และมีอัตราการตรวจสเมียร์เลือดร้อยละ 59.3 **แบบที่ 2** ใช้เกณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ ROC โดยไม่ใช้ความชุก และ cost คือ NRBC $> 0.4/100\text{WBCs}$ (เป็นจุดที่ให้ Youden index J สูงสุด = 0.72) พบผลลบหลง 7 ราย (ร้อยละ 2.9) และมีอัตราการตรวจสเมียร์เลือดร้อยละ 29.0 **แบบที่ 3** ใช้เกณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ ROC โดยใช้ความชุก และ estimated costs จากผลบวกหลงและผลลบหลงร่วมด้วย คือ NRBC $> 1.8/100\text{WBCs}$ พบ

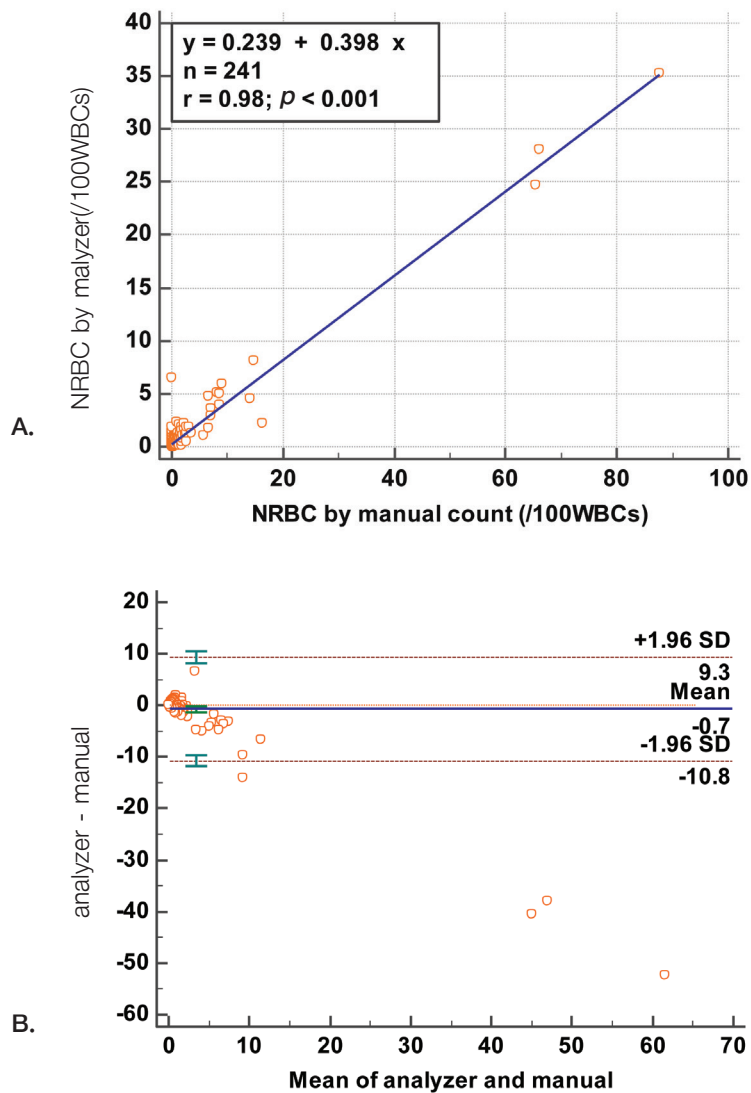


Fig. 1 Method comparison study of NRBC count between UniCel[®] DxH 800 Coulter[®] Cellular analysis system and manual NRBC count showed a correlation coefficient at 0.98 ($p < 0.001$) with an intercept at 0.239 and slope at 0.398 (A). The Bland-Altman analysis revealed a mean difference at -0.7 NRBC/100 WBCs (limit of agreement -10.8 to +9.3 NRBC/100 WBCs) (B)

Table 1 A frequency of related flags and diagnostic performance (n = 241)

Flag	Frequency (%)	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV
Low events: N	9/241 (3.7)	0	182	9	50	0.0	95.3	78.4	N/A
Abn NRBC Pattern	4/241 (1.7)	1	188	3	49	2.0	98.4	79.3	25.0
NRBC Inter	6/241 (2.5)	1	186	5	49	2.0	97.4	79.1	16.7
Cellular Inter	4/241 (1.7)	2	189	2	48	4.0	99.0	79.7	50.0
High Event Rate: D	18/241 (7.5)	9	182	9	41	18.0	95.3	81.6	50.0
Low Events: D	8/241 (3.3)	1	184	7	49	2.0	96.3	79.0	12.5
TP = true positive, TN = true negative, FP = false positive, FN = false negative, PPV = positive predictive value, NPV = negative predictive value, N/A = cannot be calculated									

Table 2 Effectiveness and efficiency of reporting workflows (n = 241)

Reporting workflow	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV	Manual slide review rate (%)
DXH < 0.1*	50	98	93	0	100.0	51.3	100.0	35.0	59.3
DXH < 0.4**	43	164	27	7	86.0	85.9	95.9	61.4	29.0
DXH < 1.8***	18	190	1	32	36.0	99.5	85.6	94.7	7.9
Decision tree****	79	98	64	0	100.0	60.5	100.0	55.2	48.1
* Limit of quantification (LOQ) of the analyzer ** Derived from receiver operating characteristic (ROC) analysis without using prevalence and estimated cost *** Derived from receiver operating characteristic (ROC) analysis using prevalence and estimated cost **** Derived from the decision tree (Fig. 3) TP = true positive, TN = true negative, FP = false positive, FN = false negative PPV = positive predictive value, NPV = negative predictive value									

ผลลบลง 32 ราย (ร้อยละ 13.28) และมีอัตราการตรวจสเมียร์เลือดร้อยละ 7.9 และ แบบที่ 4 ใช้แผนภูมิทางเลือกตัดสินใจโดยใช้ค่าจากเครื่องตรวจ

วิเคราะห์ร่วมกับ flag (Fig. 3) ไม่พบผลลบลง และมีอัตราการตรวจสเมียร์เลือดร้อยละ 48.1

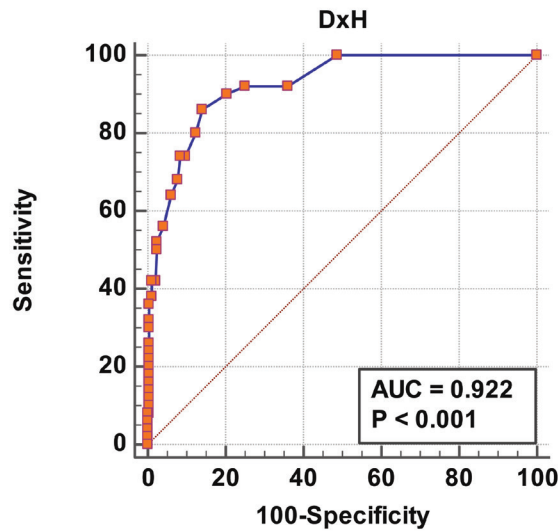


Fig. 2 ROC analysis using a manual NRBC count as a standard method gave an area under the curve at 0.922 ($p < 0.001$). Without using a prevalence and estimated cost, the maximum Youden index (0.72) was obtained at a level of NRBC >0.4 cells/100WBCs which resulted in sensitivity at 86.0%, specificity at 85.86%. When the prevalence and estimated cost were used, the cutoff at NRBC >1.8 was suggested with 36% sensitivity and 99.48% specificity

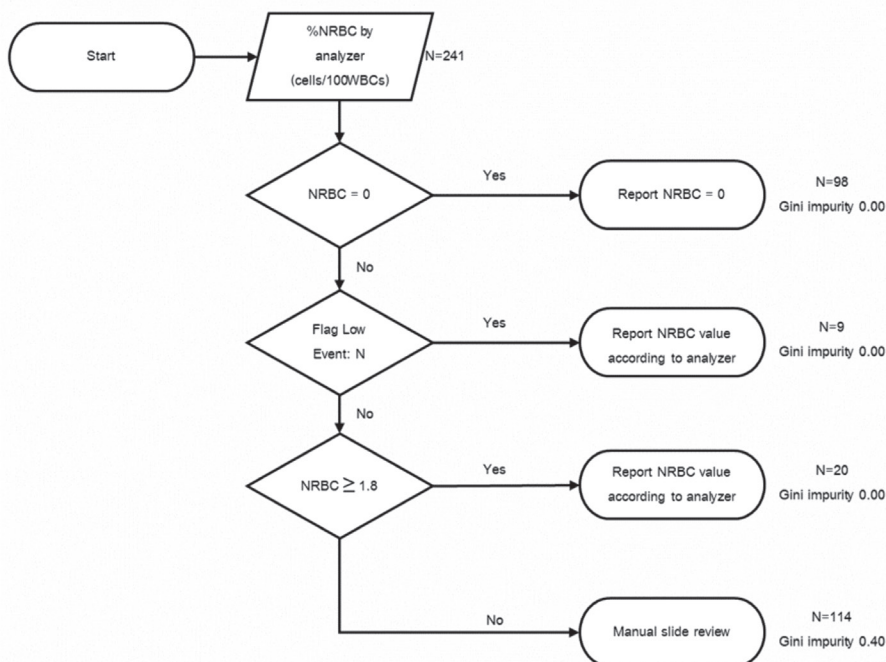


Fig. 3 Decision tree algorithm (Gini impurity) was designed using both NRBC count from the analyzer and related flags

วิจารณ์

การตรวจพบ NRBC ในกระแสเลือดเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญถึงความผิดปกติของการสร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก ดังนั้นความถูกต้องแม่นยำในการตรวจนับและการรายงานผลจำนวน NRBC จึงมีความสำคัญต่อการดูแลผู้ป่วย แต่การตรวจนับด้วยการตรวจสเมียร์เลือดเป็นงานที่ใช้เวลา เปลืองแรงงาน และค่าใช้จ่าย ปัจจุบันเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติสามารถนับจำนวนและรายงานผล NRBC พร้อมผลตรวจ CBC ได้ทันที ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามยังมีหลายปัจจัยที่รบกวนการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกสูงหรือผลลบสูงได้ การศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและพัฒนาแนวทางการรายงานผลเพื่อให้มีความถูกต้องแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยพิจารณาความปลอดภัยของผู้ป่วยเป็นปัจจัยสำคัญอันดับแรก คือ ต้องให้ค่าผลลบสูงต่ำที่สุดและให้ค่าทำนายผลลบที่สูงที่สุดเพื่อไม่ให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาดในผู้ป่วย ปัจจัยต่อมาคือผลบวกสูงควรจะต้องต่ำเพื่อลดภาระงานการตรวจสเมียร์เลือดโดยไม่จำเป็น ลดค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นจากการตรวจสเมียร์เลือด ตลอดจนลดระยะเวลาการรอคอยผล

จากผลประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัด NRBC ของเครื่องตรวจวิเคราะห์ Unicel[®] DxH800 เปรียบเทียบกับการตรวจสเมียร์เลือด พบจำนวน NRBC ที่วัดได้จากทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.98 ($p < 0.0001$) และแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (paired t-test, $p = 0.024$) โดยมีค่า bias เพียง -0.7 cells/100 WBCs ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของ ICSH⁽¹⁹⁾

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของแนวทางการรายงานผลแบบต่าง ๆ พบว่า การใช้เกณฑ์ LOQ ของ

เครื่องตรวจวิเคราะห์ที่ $\text{NRBC} \geq 0.1$ cells/100WBCs ให้ค่า NPV ที่ดีมาก (ร้อยละ 100) และไม่พบรายที่เป็นผลลบสูง แสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีและเชื่อถือได้ของเครื่องตรวจวิเคราะห์รุ่นนี้ แต่กลับพบว่ามีอัตราการเกิดผลบวกสูงทำให้ต้องตรวจสเมียร์เลือดจำนวนมาก (ร้อยละ 59.3 ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด) ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ที่พบบ่อยในงานประจำวัน ได้แก่ การรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregations) หรือมีเกล็ดเลือดขนาดใหญ่ (large/giant platelets) นอกจากนี้ในภาวะที่เม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติ เช่น ภาวะขาดธาตุเหล็ก หรือเป็นพาหะธาลัสซีเมีย ทำให้เม็ดเลือดแดงไม่ถูกทำลายโดยน้ำยาของเครื่อง (lysis-resistant red blood cells) และถูกนับรวมเป็น NRBC ได้⁽¹⁴⁻¹⁷⁾

ส่วนการใช้เกณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ ROC ที่ $\text{NRBC} > 0.4$ ให้ความไวร้อยละ 86.0 ความจำเพาะร้อยละ 85.86 และอัตราการตรวจสเมียร์เลือดร้อยละ 29 ส่วนที่ $\text{NRBC} > 1.8$ ให้ความจำเพาะที่สูงขึ้นคือร้อยละ 99.48 แต่ความไวต่ำลงเหลือเพียงร้อยละ 36 และอัตราการตรวจสเมียร์เลือดเหลือเพียงร้อยละ 7.9 ซึ่งแม้การใช้ cutoff ที่ได้จาก ROC analysis ทั้งสองแบบ (0.4 และ 1.8) จะให้อัตราการตรวจสเมียร์เลือดต่ำ แต่พบผลบวกสูงถึง 7 ราย และ 32 ราย ตามลำดับ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อการวินิจฉัยผู้ป่วย

M. J. Kwon และคณะ⁽²²⁾ ได้ศึกษาเปรียบเทียบค่า NRBC จากเครื่อง Unicel[®] DxH800 โดยใช้ cutoff ของเครื่อง (0.1 cells/100WBCs) กับการตรวจสเมียร์เลือดพบว่าให้ความไวร้อยละ 85.3 และความจำเพาะร้อยละ 96.1 โดยพบผลลบสูง 5 ราย จาก 34 ราย และจากการศึกษาของ Bren T. Tan และคณะ⁽²³⁾ พบว่า cutoff ที่เหมาะสมในการรายงานผลคือ 0.6 NRBC/100WBCs โดยให้ความไวร้อยละ 88.2 และความจำเพาะร้อยละ 92.2

แสดงว่า cutoff ที่เหมาะสมในแต่ละห้องปฏิบัติการ มีความแตกต่างกัน ให้ค่าความไว ความจำเพาะ อัตราผลลบลงและผลบวกลงแตกต่างกัน

ผลประเมินประสิทธิภาพการใช้แนวทางการรายงานผลแบบแผนภูมิทางเลือกตัดสินใจ (Fig. 3) ในการรายงานผล NRBC พบว่าไม่มีผลลบลง และให้ผลบวกลงต่ำ รวมทั้งอัตราการตรวจสเมียร์เลือดร้อยละ 48.1 ซึ่งต่ำกว่าการใช้ cutoff LOQ ของเครื่องตรวจวิเคราะห์เพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 59.3) ดังนั้น จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการใช้การรายงานผล NRBC และยังสามารถนำแนวทางนี้ไปใช้รายงานผลโดยระบบ autoverification ได้อีกด้วย

ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือเป็นการศึกษาในเครื่องตรวจวิเคราะห์เพียงรุ่นเดียว การนำผลการศึกษาไปใช้ในเครื่องรุ่นอื่นอาจให้ค่าความไว ความจำเพาะ อัตราผลบวกลงและผลลบลงที่ต่างกั น นอกจากนี้เกณฑ์และแนวทางการรายงานผลที่ได้จากการศึกษานี้ อาจให้ประสิทธิภาพต่างกันหากนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการอื่นแม้จะเป็นเครื่องตรวจวิเคราะห์รุ่นเดียวกัน⁽²²⁻²³⁾ เพราะยังมีปัจจัยที่อาจมีผลกระทบ เช่น ความชุกของสิ่งส่งตรวจที่มี NRBC แตกต่างกั น ดังนั้นหากจะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการอื่นอาจต้องมีการทวนสอบ (verification) ก่อนว่าเหมาะสมใช้ได้ อีกประการหนึ่งคือในแนวทางการรายงานผลโดยใช้แผนภูมิทางเลือกตัดสินใจ มีปัจจัยร่วมที่ใช้ในเกณฑ์คือ “systemic flags” ซึ่งมีเฉพาะในเครื่องตรวจวิเคราะห์รุ่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้เท่านั้น

สรุป

การใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติในการรายงานผล NRBC มีความสะดวกและให้ค่าที่เชื่อถือได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือการตรวจสเมียร์เลือด ทั้งยังลดระยะเวลาการรอคอยผล และลดภาระงานของเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ

ได้มาก แต่ควรมีการศึกษาหาเกณฑ์หรือแนวทางการรายงานผลที่มีประสิทธิภาพสำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการ เพื่อลดการเกิดผลลบลงและผลบวกลงให้ต่ำที่สุด ทำให้การรายงานผลมีความถูกต้อง เพิ่มความปลอดภัยสำหรับผู้ป่วย และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Hermansen MC. Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2001; 84: 211-5.
2. Das DK, Maiti AK, Chakraborty C. Automated identification of normoblast cell from human peripheral blood smear images. J Microsc 2018; 269: 310-20.
3. Sysmex Xtra Online. The clinical relevance of measuring NRBC in the XN-CBC. [Internet]. 2012 [cited 2020 April 1]. Available from: https://www.sysmex.dk/fileadmin/media/f100/Xtra/Xtra_article_The_clinical_relevance_of_measuring_NRBC_in_the_XN-CBC.pdf
4. Benie TC, Bessie C. Nucleated RBCs—Significance in the peripheral blood film. Lab Med 2000; 31: 223-9.
5. Akhtar S, Mahure S. Nuance of nucleated RBCs (normoblastemia) in peripheral blood film. Panacea J Med Sci 2015; 5: 7-13.
6. Dipankar B, Sankar D. A study of nucleated red blood cell count as a marker of severity of hypoxic ischemic encephalopathy. Int J Contemp Pediatr 2015; 2: 224-6.

7. Stachon A, Holland-Letz T, Krieg M. High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 933-8.
8. Menk M, Giebelhäuser L, Vorderwülbecke G, *et al.* Nucleated red blood cells as predictors of mortality in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): an observational study. *Ann Intensive Care* 2018; 8: 1-11.
9. Monteiro Júnior JG, Torres Dde O, da Silva MC, *et al.* Nucleated red blood cells as predictors of all-cause mortality in cardiac intensive care unit patients: a prospective cohort study. *PLoS One* 2015; 10: e0144259.
10. Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007; 11: R62.
11. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 104-16.
12. Pierre RV. Peripheral blood film review: the demise of the eye count leukocyte differential. *Clin Lab Med* 2002; 22: 279-97.
13. Da Rin G, Vidali M, Balboni F, Benegiamo A, Borin M, Ciardelli MG. Performance evaluation of the automated nucleated red blood cell count of five commercial hematological analyzers. *Int J Lab Hem* 2017; 39: 663-70.
14. Beckman Coulter, Inc. UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular analysis system instructions for use. PN 629743AC. 2008.
15. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 21-41.
16. Shin S, Park SH, Park J. Incidental identification of *Plasmodium vivax* during routine complete blood count analysis using the UniCel® DxH 800. *Ann Lab Med* 2018; 38: 165-8.
17. Timilsena S, Ardsiri S, Lerdwasana S, Krishna DM, Pattanapanyasat K, Noulstri E. Accuracy of lymphocyte counts from UniCel® DxH 800 in β -thalassemia/HbE patients having various numbers of nucleated red blood cells. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2019; 18: 1-6.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrument methods: approved standard. 2nd ed. Wayne, PA: CLSI; 2007. Document H20-A2.

19. Kingsford C, Salzberg SL. What are decision trees?. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1011-3.
20. Nembrini S, König IR, Wright MN. The revival of the Gini importance? *Bioinformatics* 2018; 34: 3711-8.
21. Briggs C, Culp N, Davis B, d'Onofrio G, Zini G, Machin SJ. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol* 2014; 36: 613-27.
22. Kwon MJ, Nam MH, Kim SH, *et al.* Evaluation of the nucleated red blood cell count in neonates using the Beckman Coulter UniCel® DxH 800 analyzer. *Int J Lab Hematol* 2011; 33: 620-8.
23. Brent TT, Armando J, Tracy I. Evaluation of the Beckman Coulter UniCel® DxH 800 and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire hematology analyzers on pediatric and neonatal specimens in a tertiary care hospital. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 929-38.

***In vitro* Study of Antioxidant, Anti-glycation and Anti-inflammatory Effects of Thai Medicinal Plants for Diabetic Patients**

Kanyanath Piumngam

*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Campus, Pathum thani Province, Thailand*

Abstract

This study aimed to determine total phenolic contents, antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of freeze-dried juices and 70% ethanol extract from 6 Thai anti-diabetes plants namely holy basil leaves (*Ocimum sanctum* L.), pandan leaves (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), ivy gourd leaves (*Coccinia grandis* (L.) Voigt), aloe jelly (*Aloe vera* Linn), bitter cucumber fruits (*Momordica charantia* Linn.) and wild pepper leaves (*Piper sarmentosum* Roxb.ex Hunter). The findings demonstrated that the ethanol extracts had higher antioxidant activity than that of the freeze-dried juices in accordance with the total amount of phenolic compounds. The ethanol extract of holy basil leaf had the highest antioxidant activity ($IC_{50} = 7.39 \pm 1.56 \mu\text{g/mL}$) which was higher than that of the standard butylatedhydroxytoluene (BHT, $IC_{50} = 78.56 \pm 8.34 \mu\text{g/mL}$). Only the ethanol extracts showed the anti-glycation activity. With the concentration of 0.1 mg/mL, ivy gourd leaf extract had the highest percentage of inhibition of glycation, 36.86 ± 2.19 , which was higher than that of the standard aminoguanidine (32.55 ± 1.56). For the anti-inflammatory activity, pandan leaf extract inhibited nitric oxide generation up to 88.6 ± 1.85 percent which was similar to that of the standard aminoguanidine (89 ± 4.36). For the inhibition of prostaglandin E_2 production, the ethanol extract of wild pepper leaf produced 81.7% inhibition compared to the standard indomethacin with 85.1% inhibition. The results could lead to further development in pharmacological studies and nutritional supplements for diabetes patients.

Keywords: Diabetes Antioxidant, Anti-glycation, Anti-inflammation, Thai medicinal plants

*Corresponding author E-mail address: mim9_p@yahoo.com, kanyanath.p@allied.tu.ac.th

Received: 5 November 2020

Revised: 4 December 2020

Accepted: 25 December 2020

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านปฏิกิริยาไกลเคชัน และด้านการอักเสบของสมุนไพรไทยสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน และฤทธิ์ด้านการอักเสบในสารสกัดจากพืชที่มีสรรพคุณรักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ ใบกะเพรา ใบเตย ใบตำลึง รุ่ยว่านหางจระเข้ ผลมะระขี้นก และใบชะพลู ที่เตรียม 2 วิธี คือ วิธีคั้นสดแล้วทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) และวิธีสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดน้ำคั้นสด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คือ สารสกัดเอทานอลจากใบกะเพรา ($IC_{50} = 7.39 \pm 1.56$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งออกฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน butylatedhydroxytoluene (BHT) ($IC_{50} = 78.56 \pm 8.34$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนฤทธิ์ต้านไกลเคชันพบเฉพาะในสารสกัดเอทานอลเท่านั้น โดยสารสกัดเอทานอลจากใบตำลึง (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีร้อยละความสามารถต้านไกลเคชันสูงสุด คือ 36.86 ± 2.19 ซึ่งสูงกว่าของสารมาตรฐาน aminoguanidine (32.55 ± 1.56) สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบ สารสกัดเอทานอลจากใบเตยหอมสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ถึงร้อยละ 88.6 ± 1.85 และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบดีเทียบเท่าสารมาตรฐาน aminoguanidine (89 ± 4.36) นอกจากนี้ผลทดสอบความสามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบชะพลูมีฤทธิ์ยับยั้งได้ร้อยละ 81.7 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งร้อยละ 85.1 ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการศึกษาทางยาและอาหารเสริมซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

คำสำคัญ: โรคเบาหวาน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน ฤทธิ์ด้านการอักเสบ สมุนไพรไทย

บทนำ

โรคเบาหวาน เป็นโรคที่ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเกินปกติ (hyperglycemia) แบบเรื้อรัง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะต่างๆทั่วร่างกายจากความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ จากโรคเบาหวานจึงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าอุบัติการณ์ของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา^(1,2) โดยร้อยละ 90 - 95 ของผู้ป่วยทั้งหมดเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งเกิดจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) (จากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม) ร่วมกับภาวะขาดอินซูลิน

จากการศึกษาพบว่าโรคอ้วนมีความสัมพันธ์กับระดับของภาวะ oxidative stress โดยกลไกที่สำคัญอาจเกิดจากความบกพร่องในการควบคุมการหลั่ง adipocytokine ได้แก่ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), resistin, leptin และ adiponectin ที่หลั่งจากเซลล์ไขมันซึ่งมีมากในคนอ้วนลงพุงที่มีการสะสมไขมันหน้าท้องปริมาณมาก ทำให้มีการหลั่ง PAI-1 และ TNF- α จากเซลล์ไขมันเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่มีการลดลงของ adiponectin ซึ่งทำหน้าที่เพิ่มความไวต่ออินซูลิน⁽³⁾ นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง resistin เพิ่มมากขึ้น โดยที่ระดับของ resistin มีความสัมพันธ์กับภาวะดื้อต่ออินซูลินและโรคเบาหวานชนิดที่ 2⁽⁴⁾ ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงในผู้ป่วยโรคเบาหวานอาจส่งผลต่อระดับการสร้างอนุมูลอิสระ และการเพิ่มขึ้นของระดับเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน รวมถึงกระทบต่อกลไกการต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย และน้ำตาลในเลือดจะสามารถจับกับโปรตีนได้โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ซึ่งเรียกว่าการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน ผลจากไกลเคชันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

การทำงานของโปรตีนให้เสื่อมหน้าที่ลง ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมาในผู้ป่วยโรคเบาหวาน⁽⁵⁾ การศึกษาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 โดยการให้กรดแอลฟา-ลิโพอิก วิตามินอี หรือซีลีเนียมนาน 12 สัปดาห์ พบว่าช่วยลดภาวะแทรกซ้อน และทำให้การเกิดออกซิเดชันของไขมันลดลงได้⁽⁶⁾

การอักเสบเป็นพยาธิสภาพรูปแบบหนึ่งที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้น เซลล์แมคโครฟาจจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เช่น ไนโตรออกไซด์ พรอสตาแกลนดิน E₂ และไซโตไคน์ ทำให้พบการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปหรือหลังเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง⁽⁷⁾ ซึ่งแม้ว่าการหลั่งสารเหล่านี้จะเกิดขึ้นเพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกราน แต่การหลั่งในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลให้มีการทำลายเนื้อเยื่อและหลอดเลือดในร่างกายได้ ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในอวัยวะต่างๆ

สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านไกลเคชัน และสารต้านการอักเสบ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาหรือลดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน โดยทั่วไปมนุษย์สามารถป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระโดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายเองได้⁽⁸⁾ แต่มีหลักฐานว่าการรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมากจะช่วยให้ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด ซึ่งจะช่วยป้องกันอันตรายจากโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ เช่น โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชราได้⁽⁹⁻¹⁴⁾

จากการติดตามรายงานการใช้พืชสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคเบาหวาน ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ของพืชพื้นบ้านและพืชสมุนไพรไทย 6 ชนิด ในกลุ่มที่มีสรรพคุณใช้รักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* L.)

ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) ใบตำลึง (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) ใ้วานหางจรเข้ (*Aloe vera* Linn) ผลมะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) และใบชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.ex Hunter) เนื่องจากเป็นพืชที่มีการรับประทานอย่างแพร่หลาย และหาซื้อได้ทุกฤดูกาล โดยศึกษาในสารสกัด 2 ชนิด คือ ชนิดน้ำคั้นสดและชนิดสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อเพื่อพัฒนาการนำพืชผักสมุนไพรไทยมาใช้ประโยชน์สำหรับการดูแลสุขภาพและลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพรไทย

พืชผักสมุนไพรไทย 6 ชนิดที่ศึกษา ได้แก่ เตยหอม ชะพลู มะระขี้นก ตำลึง กะเพรา และ ใ้วานหางจรเข้ ซื้อจากตลาดไท อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

เตรียมสารสกัดพืชผักสมุนไพรไทย 2 วิธีคือ วิธีคั้นสด โดยการคั้นน้ำและกรองแยกกาก ทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze Dryer, dry LABCONCO Freeze Dry System) และวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง บดเป็นผงละเอียด แล้วสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70

(น้ำหนักแห้ง 10 กรัม ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) กรองแยกกาก แล้วลดปริมาตรโดยการระเหย จัดบันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้ และเก็บให้พ้นแสง ที่ -80 องศาเซลเซียส

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay⁽¹⁵⁾

ทดสอบตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี DPPH⁽¹⁵⁾ โดยผสมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 กับ 0.1 มิลลาร์ DPPH ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 100 ทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ด้วย เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง และทำ sample blank ด้วยทุกครั้ง คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง DPPH (% DPPH inhibition) โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม (control) เพื่อหาค่า Ac และ เขียนกราฟ หาค่า IC₅₀ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน butylatedhydroxytoluene (BHT) ซึ่งเป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) รายงานผลเป็นค่า IC₅₀ โดยการคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้ความสัมพันธ์

$$\% \text{ DPPH inhibition} = \frac{(Ac - As) \times 100}{Ac}$$

เมื่อ Ac คือค่า absorbance ของหลอดควบคุม; As คือค่า absorbance ของหลอดตัวอย่าง

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

วิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสมุนไพรด้วย Folin-Ciocalteu

Reagent โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก⁽¹⁶⁾ ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงของกรดแกลลิกมาสร้างกราฟ

มาตรฐาน แล้วหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก ในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน แสดงผลเป็นค่า มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (mg gallic acid equivalent)

การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชันในหลอดทดลอง

ทดสอบปฏิกิริยาไกลเคชันโดยอาศัยเทคนิค albumin glycation⁽¹⁷⁾ ที่ใช้ BSA ที่ปราศจากกรดไขมัน (fatty acid-free bovine serum albumin) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาล ดี-กลูโคส แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยากับสารสกัดสมุนไพรเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านไกลเคชัน โดยการทดสอบใช้ BSA (bovine serum albumin) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำตาล ดี-กลูโคส เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย PBS (phosphate buffer saline), พีเอช 7.2-7.4 และใช้โซเดียมเฮไลด์เข้มข้นร้อยละ 0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากนั้นจึงนำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ ที่ excitation wavelength 370 นาโนเมตร และ emission wavelength 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน aminoguanidine ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) โดยใช้หลอดที่มีสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นหลอดควบคุมเพื่อหาค่า Ac

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100$$

เมื่อ Ac คือค่า absorbance (A_{440}) ของหลอดควบคุม และ As คือค่า absorbance (A_{440}) ของหลอดตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มีกลูโคส 25 มิลลิโมลต่อลิตร fetal bovine serum ร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน และสเตรปโตมัยซิน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี CO₂ ร้อยละ 5

การทดสอบ cell cytotoxicity ด้วย MTT assay

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นการหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้ 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งเป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ได้ผลิตผลเป็นฟอร์มazan (formazan) ซึ่งเป็นสารที่มีสีม่วง โดยปริมาณฟอร์มazanที่เกิดขึ้นสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด

เพาะเลี้ยงเซลล์ แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี fetal bovine serum ร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี CO₂ ร้อยละ 5 นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดย LPS (lipopolysaccharide) จะเป็นตัวกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบกับสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายผลึกฟอรัมาซานด้วย

dimethyl sulfoxide (DMSO) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร คำนวณความมีชีวิตของเซลล์ ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A}_{550}) \text{ ของหลุมเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A}_{550}) \text{ ของหลุมเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรท์ด้วย Griess assay

ความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นดัชนีบ่งบอกปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) เนื่องจากไนไตรท์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียรจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรท์โดยปฏิกิริยาของ Griess ใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี fetal bovine serum เข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-naphthyl) ethylene-diaminedihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric acid] ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) และคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแต่ละชนิด โดยเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว และเปรียบเทียบกับ aminoguanidine ที่เป็นสารควบคุมผลบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 นำเซลล์ RAW 264.7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร

เลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี fetal bovine serum เข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยชุดตรวจสอบที่อาศัยหลักการทาง immunoassay (PGE2 competitive enzyme immunoassay kit (R&D system, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และใช้สารมาตรฐาน indomethacin เป็นสารควบคุมผลบวกในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองได้จากอย่างน้อย 3 การทดลองที่แยกอิสระต่อกัน ผลที่ได้แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบทางสถิติด้วย Analysis of Variance, ANOVA และ t test โดยคำนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $p < 0.05$

ผลและวิจารณ์

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพียงวิธีเดียว เนื่องจากเป็นวิธีที่นิยม

มีความสะดวกและรวดเร็ว วิธี DPPH เป็นการตรวจกลไกต้านอนุมูลอิสระแบบ radical scavenging capacity โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารอนุมูลอิสระคือ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ ทำให้เกิดการออกซิเดชันของ DPPH และเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ติดตามปฏิกิริยาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด (Table 1) พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดน้ำคั้นสด แสดงว่าชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (หมู่ไฮดรอกซิล) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (หมู่แอลคิล) จึงถูกสกัดออกมาได้ดีในตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ แต่ละลายในน้ำได้น้อยกว่า เนื่องจากน้ำเป็นโมเลกุลที่มีขั้วสูงกว่า ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไปในการสกัดสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ยังขึ้นกับชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่เป็นองค์ประกอบในพืชแต่ละชนิดด้วย⁽¹⁸⁾

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดกับสารมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่า $IC_{50} = 78.56 \pm 8.34$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม พบว่าสารสกัดสมุนไพรจากใบกะเพรา ใบชะพลู ใบตำลึง และใบเตยหอม ที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และสารสกัดผลมะระขี้นกแบบน้ำคั้นสด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐาน BHT คิดเป็น 10, 9, 8, 5 และ 4 เท่า ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้ทั้งที่สกัดด้วยเอทานอลและแบบน้ำคั้นสด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ยังไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพรในการศึกษาครั้งนี้กับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าให้ผลที่ดีกว่า ดังนี้ ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของใบกะเพรา มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (0.00739 ± 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)

Table 1 Antioxidant activity by DPPH assay (IC_{50} values) and total phenolic contents of plant extracts

Plant extracts	IC_{50} (μ g/mL)		Total phenolic content (mgGAE / mg of plant extracts)	
	Freeze-dried juice extract	70% Ethanol extract	Freeze-dried juice extract	70% Ethanol extract
Holy basil leaves	31.59 ± 7.47	7.39 ± 1.56	130.50 ± 8.15	299.90 ± 6.11
Pandan leaves	38.93 ± 1.65	15.00 ± 1.94	175.14 ± 2.59	231.56 ± 8.05
Ivy gourd leaves	100.79 ± 21.74	9.64 ± 2.75	94.77 ± 5.91	279.45 ± 8.15
Aloe jelly	> 500	> 500	11.27 ± 0.35	6.72 ± 0.43
Bitter cucumber fruits	19.68 ± 0.80	119.29 ± 27.82	70.12 ± 1.16	121.80 ± 2.83
Wild pepper leaves	87.27 ± 15.01	8.55 ± 2.21	234.36 ± 13.77	405.44 ± 23.83
BHT	78.56 ± 8.34		-	-

เทียบกับ 0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่รายงานโดย Hakkim FL และคณะ (2007)⁽¹⁹⁾ ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากใบชะพลูมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.55 ± 2.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 80.19 ± 0.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดเมทานอลของใบชะพลู โดย พัชรินทร์ บุญหล้า (2014)⁽²⁰⁾ ในขณะที่ผลการศึกษาค้างนี้พบว่า BHT มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าถึง 9 เท่า ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของใบตำลึง พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.64 ± 2.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.00964 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่รายงานโดย M Umamaheswari และ TK Chatterjee (2008)⁽²¹⁾ ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของใบเตยหอมพบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.00 ± 1.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 0.810 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากรายงานของ Ampa Jimtaisong และ Panvipa Krisdaphong (2013)⁽²²⁾ ในขณะที่ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากง้วน่านทางจระเข้ ตามรายงานของ Nurten Ozsoy และคณะ (2009)⁽²³⁾ พบค่า IC_{50} ของสารสกัดง้วน่านทางจระเข้เท่ากับ 41.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จากการศึกษาค้างนี้ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้จากการสกัดทั้งสองวิธี แต่หากคำนวณจากสมการความสัมพันธ์ การสกัดโดยวิธีคั้นน้ำสดและการสกัดด้วยเอทานอลมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 828.27 ± 392.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 776.81 ± 38.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าที่รายงานโดย Nurten Ozsoy และคณะ ข้างต้น

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวม ด้วย Folin-Ciocalteu Reagent โดยวิธีที่

ดัดแปลงจากวิธีของ Chan *et al.*, 2009 ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน โดยแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (mg gallic acid equivalent; mgGAE) ต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ผลการวิเคราะห์พิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก มีสมการดังนี้ $y = 0.0057x + 0.0838$, $R^2 = 0.9994$ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสมุนไพรไทย 6 ชนิด (Table 1) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีค่าสูงกว่าที่ได้จากการสกัดโดยวิธีคั้นน้ำสด ซึ่งจากผลการศึกษาค้างนี้พบว่า สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับรายงานของ Lou NS และคณะ (2016)⁽²⁴⁾ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกสามารถให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระได้ง่าย จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง⁽²⁵⁾ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังขึ้นกับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดแต่ละชนิดด้วย⁽²⁶⁾

สมุนไพรไทยที่เลือกนำมาศึกษาทั้ง 6 ชนิด เป็นกลุ่มที่มีรายงานว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้⁽²⁷⁻³⁰⁾ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทั่วไปการต้านอนุมูลอิสระเกิดได้จากหลายกลไก เช่น 1) สารคีเลต (chelating agent) คือสารที่มีโครงสร้างเป็น ortho-dihydroxyl group ทำหน้าที่จับกับโลหะทรานซิชัน เช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ 2) สารดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) สารฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกหลายชนิดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ เกิดเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ที่มีความเสถียรเพิ่มขึ้นเนื่องจากโครงสร้างสามารถเกิดการเรโซแนนซ์ของอิเล็กตรอนได้ 3) การ

เสริมฤทธิ์ (synergism) ของวิตามินอี เมื่อวิตามินอี (α -tocopherol) ให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลเปอร์ออกไซด์ (ROO-) จะเปลี่ยนเป็นอนุมูลวิตามินอี ซึ่งสารฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกจะรีดิวส์อนุมูลวิตามินอีกลับเป็นวิตามินอีเหมือนเดิม ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ต่อไปอีก จากผลการศึกษาพบว่าใบกะเพราที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงมาก มีรายงานว่าใบกะเพราที่มีสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ luteolin และ orientin ในใบกะเพรามีโครงสร้างตรงพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2-3 คอนจูเกตกับหมู่ 4-oxo ในวงคาร์บอน ซึ่งสารที่มีโครงสร้างลักษณะนี้จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง⁽³¹⁾

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไกลเคชัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไกลเคชันในหลอดทดลองด้วยวิธี BSA glycation assay (Table 2) พบว่า สารสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรไทยทั้ง 6 ชนิด มีฤทธิ์ต้านไกลเคชัน ในขณะที่สารสกัดแบบ

คั้นสด ไม่มีฤทธิ์ต้านไกลเคชัน โดยสารสกัดตำลึงมีร้อยละความสามารถต้านไกลเคชันสูงที่สุดเท่ากับ 36.86 ± 2.19 รองลงมา ได้แก่ สารสกัดจากกะเพรา (34.82 ± 5.48) และชะพลู (34.62 ± 5.33) ซึ่งมีความสามารถสูงกว่าสารมาตรฐาน aminoguanidine (32.55 ± 1.56) สำหรับฤทธิ์ต้านไกลเคชันของสารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้ (30.50 ± 2.61) ผลมะระขี้นก (27.89 ± 3.90) และใบเตยหอม (26.63 ± 0.89) แม้จะมีฤทธิ์น้อยกว่า แต่เมื่อพิจารณาแล้วไม่แตกต่างกันมากนัก สอดคล้องกับผลการศึกษาที่มีรายงานว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดย Munasinghe MA และคณะ (2011) ได้ทำการทดลองในอาสาสมัคร พบว่า สารสกัดใบตำลึงทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽³⁰⁾ ในขณะที่ใบกะเพรามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ streptozotocin ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง⁽³²⁾ และ Raju Patil และคณะ (2011) พบว่าสารสกัดใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* L.) ช่วยลดระดับกลูโคสและไขมันในเลือดของหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานจากการกระตุ้นด้วย Alloxan⁽²⁹⁾ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าสารสกัดใบ

Table 2 Anti-glycation activity of plant extracts (percent inhibition)

Plant extracts	Plant species	% Inhibition of glycation	
		Freeze-dried juice extract	70% Ethanol extract
Holy basil leaves	<i>Ocimum sanctum</i> L.	0 (-19.18 $\pm$ 4.99)	34.82 $\pm$ 5.48
Pandan leaves	<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.	0 (-12.55 $\pm$ 5.14)	26.63 $\pm$ 0.89
Ivy gourd leaves	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	0 (-13.46 $\pm$ 1.92)	36.86 $\pm$ 2.19
Aloe jelly	<i>Aloe vera</i> Linn	0 (-10.99 $\pm$ 3.43)	30.50 $\pm$ 2.61
Bitter cucumber fruits	<i>Momordica charantia</i> Linn.	0 (-16.58 $\pm$ 4.57)	27.89 $\pm$ 3.90
Wild pepper leaves	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.ex Hunter	0 (-8.77 $\pm$ 1.83)	34.62 $\pm$ 5.33
Aminoguanidine		32.55 $\pm$ 1.56	

ชะพลู มีฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นและใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานได้⁽³³⁻³⁴⁾ Alper Okyar และคณะ (2001) ได้ทดสอบความสามารถระดับน้ำตาลในเลือดโดยใช้หนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่อดอาหารมา 8 ชั่วโมง พบว่า หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเนื้อวุ้นของวุ้นหางจระเข้ มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง⁽³⁵⁾ ส่วนผลมะเร็งขึ้นก มีฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นและมีความเป็นไปได้ที่จะลดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้⁽³⁶⁾ และ Sreenivasan Sasidaran และคณะ (2011) พบว่าสารสกัดใบเตยหอมช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานได้⁽²⁷⁾ นอกจากนี้ Anchalee Chiabchalard และคณะ (2015) ได้ทดสอบ OGTT (oral glucose tolerance test) ในอาสาสมัครสุขภาพดี 30 คนโดยให้ดื่มน้ำต้มใบเตยหอมหลังจากกินกลูโคส 75 กรัม โดยใช้น้ำตาลเป็นสารควบคุมผลลบ พบว่าน้ำตาลในเลือดของอาสาสมัครที่ดื่มน้ำต้มใบเตยหอมช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มทดสอบได้⁽²⁸⁾

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

ผลทดสอบ cell cytotoxicity ด้วย MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด ทั้งสารสกัดน้ำคั้นสด และสารสกัดเอทานอล โดยวิธี MTT assay เป็นการทดลองเพื่อศึกษาว่าเซลล์แมคโครฟาจ Raw 264.7 ในสถานะที่มี LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสถานะที่มี LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะมีการเจริญเทียบเท่ากับเซลล์ที่เลี้ยงปกติหรือไม่ เพื่อพิสูจน์ว่าฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดที่ต่างกันไม่ได้ขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสารสกัดนั้นไม่ได้ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ผลการทดสอบจำนวนเซลล์

แมคโครฟาจ Raw 264.7 ที่เลี้ยงในสถานะที่มี LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด จากการคำนวณทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่า สารสกัดเอทานอลจากสมุนไพร 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดน้ำคั้นสด มะระขึ้นก ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p -value < 0.05) ดังนั้น จึงไม่นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

ผลทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

ผลทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด โดยทดสอบการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของสารสกัด หลังจากเซลล์ Raw 264.7 ถูกกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย LPS แล้ว 24 ชั่วโมง (Table 3) พบว่า aminoguanidine (สารควบคุมผลบวก) มีความสามารถด้านการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด Raw 264.7 ได้ร้อยละ 89 ± 4.36 และ 105 ± 3.03 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงกว่า โดยสารสกัดใบเตยหอมสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ถึงร้อยละ 88.6 ± 1.85 และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบดีเทียบเท่า aminoguanidine (89 ± 4.36) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน รองลงมาได้แก่สารสกัดใบชะพลู และสารสกัดใบกะเพรา และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำคั้นสด ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก็พบว่า สารสกัดใบเตยหอมสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ถึงร้อยละ 112.1 ± 0.91 และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบซึ่งดีกว่า aminoguanidine (105 ± 3.03) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน รองลงมาได้แก่สารสกัดจากใบตำลึง ใบชะพลู และใบกะเพรา

Table 3 Anti-inflammatory activity of plant extracts by Griess assay

Plant extracts	% Inhibition of nitric oxide generation		
	Freeze-dried juice extract conc. = 0.1 mg/mL	Freeze-dried juice extract conc. = 1 mg/mL	70% Ethanol extract conc. = 0.1 mg/mL
Holy basil leaves	29.1 ± 5.75	75.5 ± 1.37	40.5 ± 7.17
Pandan leaves	5.9 ± 11.80	112.1 ± 0.91	88.6 ± 1.85
Ivy gourd leaves	37.2 ± 3.88	86.1 ± 7.02	26.4 ± 2.49
Aloe jelly	0	20.1 ± 5.82	38.6 ± 6.38
Bitter cucumber fruits	22.2 ± 11.08	-	27.5 ± 12.56
Wild pepper leaves	0	82.1 ± 6.17	80.8 ± 9.21
Aminoguanidine	89.0 ± 4.36	105.6 ± 3.03	

ผลทดสอบการยับยั้งการผลิตพรอสตา
แกลนดิน E_2

ผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการผลิต PGE_2 ของ
สารสกัดสมุนไพร ในเซลล์ Raw 264.7 หลังถูก
กระตุ้นด้วย LPS 24 ชั่วโมง (Table 4) พบว่าสาร
มาตรฐาน indomethacin (สารควบคุมผลบวก)
ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้าน

การอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด Raw 264.7
จากการยับยั้งการผลิต PGE_2 ได้ร้อยละ 85.1 และ
เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น
0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเอทานอลจาก
ใบชะพลูสามารถยับยั้งการผลิต PGE_2 ได้สูงที่สุด คือ
ร้อยละ 81.7 เกือบเทียบเท่าฤทธิ์ของ indomethacin
และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ

Table 4 Anti-inflammatory activity of plant extracts by prostaglandin E_2 immunoassay

Plant extracts	% Inhibition of prostaglandin E_2 production		
	Freeze-dried juice extract conc. = 0.1 mg/mL	Freeze-dried juice extract conc. = 1 mg/mL	70% Ethanol extract conc. = 0.1 mg/mL
Holy basil leaves	0	67.8	0.0
Pandan leaves	41.2	81.5	0.0
Ivy gourd leaves	25.9	79.7	0.0
Aloe jelly	2.1	41.6	0.0
Bitter cucumber fruits	13.9	-	0.0
Wild pepper leaves	5.5	80.1	81.7
Indomethacine	85.1		

มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดน้ำคั้นสดจากใบเตยหอม ใบชะพลู และใบตำลึง สามารถยับยั้งการการผลิต PGE_2 ได้ถึงร้อยละ 81.5, 80.1 และ 79.7 ตามลำดับ

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบเตยหอม ใบตำลึง ใบชะพลู และใบกะเพรา มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO และ PGE_2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ เนื่องจากในกระบวนการอักเสบจะมีการสร้าง NO และ PGE_2 ซึ่งเป็น inflammatory mediators ในปริมาณสูงมากในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS⁽³⁷⁾ ทั้ง PGE_2 และ NO ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage โดยเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็น inducible enzyme ที่จะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นจำนวนมากโดย proinflammatory cytokine และ endotoxin โดย PGE_2 มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการสร้าง inflammatory mediator หลายชนิด ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดงและมีไข้ ในขณะที่ NO มีผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบ ดังนั้นการยับยั้งการหลั่งของ PGE_2 และ NO จึงเป็นแนวทางหลักที่สำคัญทางหนึ่งในการควบคุมกระบวนการอักเสบ ผลการศึกษครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาโดยเหินยวนำให้เกิดการอักเสบในหนูทดลอง เช่น การศึกษาฤทธิ์ลดการอักเสบของน้ำมันระเหยจากใบกะเพรา ของ Singh S และคณะ (1996)⁽³⁸⁾ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากใบชะพลู ของ Zakaria ZA และคณะ (2010)⁽³⁹⁾ และการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากใบและเถาตำลึง ของ Deshpande SV (2011)⁽⁴⁰⁾

ส่วนการศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ด้านอักเสบของสารสกัดจากใบเตยในสัตว์ทดลองยังไม่พบรายงาน อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกยับยั้งการอักเสบอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การยับยั้งการทำงานของ NF- κ B (Nuclear factor- κ B), TNF- α (Tumor necrosis factor α) และ PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) ยังต้องการข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ด้านอักเสบซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปพัฒนาต่อไป

สรุป

แม้ว่าสมุนไพรไทย 6 ชนิดที่ศึกษา ได้แก่ เตยหอม ชะพลู มะระจีนก ตำลึง กะเพรา และว่านหางจระเข้ ได้มีการรายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้านไกลเคชั่น และด้านการอักเสบ มาก่อนหน้านี้ แต่ยังไม่มียารายงานการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างสมุนไพรในรูปสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำคั้นสดว่าให้ผลการทดสอบแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านไกลเคชั่น และด้านการอักเสบได้ดีกว่าสารสกัดน้ำคั้นสด ยกเว้นใบตำลึงที่สารสกัดน้ำคั้นสดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีกว่าสารสกัดเอทานอล ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในด้านการส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรพื้นบ้านที่สามารถหาซื้อได้ง่ายและมีราคาถูก ทั้งในรูปแบบการรับประทานเป็นอาหารหรือการนำมาวิจัยพัฒนาเป็นยาจากสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อใช้เป็นยาทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ได้อย่างเหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประเภททุนวิจัยทั่วไป งบประมาณ ปี พ.ศ. 2558-2559

เอกสารอ้างอิง

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-7.
2. Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nat Med* 2006; 12: 62-6.
3. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-61.
4. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-12.
5. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
6. Willcox JK. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44: 275-95.
7. Van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Res* 2000; 1: 67-72.
8. Ames BM, Shinena MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 7915-22.
9. Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increase in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1081-7.
10. Steinberg D. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation* 1991; 84: 1420-25.
11. Steinmetz KA, Pottor JD. Vegetable, fruit and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 1027-39.
12. Nor FM, Mohamed S, Idris NA, Ismail R. Antioxidative properties of *Pandanus marylifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. *Food Chem* 2008; 110: 319-27.
13. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem* 1998; 75: 199-212.
14. Moure A, Cruz JM, Franco D. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72: 145-71.
15. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 29: 1199-200.
16. Chan SW, Lee CY, Yap CF, Wan Alda WM, Ho CW. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *Int Food Res J* 2009; 16: 203-13.
17. Matsuura N, Aradate T, Sasaki C, *et al.* Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts. *J Health Sci* 2002; 48: 520-26.
18. Kaewamatawong R, Jeungmunkong T. Antioxidant activities DPPH and total phenolics content of some Thai medicinal plant extracts. *J Sci Tech UBU* 2006; 8: 76-8. (in Thai)

19. Hakkim FL, Shankar CG, Girija S. Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their *in vitro* callus cultures. J Agric Food Chem 2007; 55: 9109-17.
20. Boonla P, Phadungkit M, Mahaweerawat U, Somdee T. Antioxidant and antimutagenic activities of *Piper sarmentosum* Roxb. Leaf extracts. Isan J Pharm 2004; 10: 283-94.
21. Umamaheswari M, Chatterjee TK. In Vitro Antioxidant Activities of the Fractions of *Coccinia Grandis* L. Leaf Extract. Afr J Tradit Complement Altern Med 2008; 5: 61-73.
22. Jimtaisong A, Krisdaphong P. Antioxidant activity of *Pandanus amaryllifolius* leaf and root extract and its application in Topical emulsion. Trop J Pharm Res 2013; 12: 425-31.
23. Ozsoy N, Candoken E, Akev N. Implications for degenerative disorders: Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and β -tocopherol in *Aloe vera*. Oxidative med cell longev 2009; 2: 99-106.
24. Lou NS, Lai CY, Hsu SY, Ho TC. Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. Food Chem 2016; 197: 1-6.
25. Benamrouchea LL, Madani K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. Ind Crops Prod 2013; 50: 723-30.
26. Su MS, Shyu YT, Chien PJ. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. Food Chem 2008; 111: 892-6.
27. Sasidharan S, Sumathi V, Jegathambigai NR, Latha LY. Antihyperglycaemic effects of ethanol extracts of *Carica papaya* and *Pandanus amaryllifolius* leaf in streptozotocin-induced diabetic mice. Nat Prod Res 2011; 25: 1982-87.
28. Chiabchalard A, Nooron N. Antihyperglycemic effects of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. leaf extract. Pharmacogn Mag 2015; 11: 117-22.
29. Patil R, Patil R, Ahirwar B, Ahirwar D. Isolation and characterization of anti-diabetic component (bioactivity—guided fractionation) from *Ocimum sanctum* L. (Lamiaceae) aerial part. Asian Pac J Trop Med 2011; 4: 278-82.
30. Munasinghe MAAK, Abeysena C, Yaddhige IS, Vidanapathirana T, Piyumal KPB. Blood sugar lowering effect of *Coccinia grandis* (L.) J. Voigt: Path for a new drug for Diabetes Mellitus. Exp Diabetes Res 2011; 2011: 978762 (<https://doi.org/10.1155/2011/978762>)

31. Chaudhary A, Sharma S, Mittal A, Gupta S, Dua A. Phytochemical and antioxidant profiling of *Ocimum sanctum*. J Food Sci Technol 2010 (<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04417-2>)
32. Muzammila MS, Dineshb V, Rahimanc SM, *et al.* Antidiabetic potential of herbal extracts studied in (STZ) Streptozotocin induced diabetic rat. Int J Pharm Biol Sci 2013; 3: 78-85.
33. Deetae P, Parichanon P, Trakunleewathana P, Chanseetis C, Lertsir S. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. Food Chem 2012; 133: 953-9.
34. Kavishankar G, Lakshmidhevi N, Murthy S, Prakash HS, Niranjanaet SR. Diabetes and medicinal plants-A review. Int J Pharm Biomed Sci 2011; 2: 65-80.
35. Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sütülpinar N. Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. Phytother Res 2001; 15: 157-61.
36. Trakoonosot W, Sotanaphun U, Phanachet P, Porasuphatana S, Udomsubpayakul U, Komindr S. Pilot study: Hypoglycemic and antiglycation activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) in type 2 diabetic patients. J Pharm Res 2013; 6: 859-64.
37. Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y, Kim EH. *Atractylodes japonica* suppresses lipopolysacchhalide-stimulated expression of inducible nitric oxide synthese and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. Biol Pharm Bull 2004; 27: 324-7.
38. Singh S, Majumdar DK, Rehan HMS. Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. J Ethnopharmacol 1996; 54: 19-26.
39. Zakaria ZA, Patahuddin H, Mohamad AS, Israf DA, Sulaiman MR. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. J Ethnopharmacol 2010; 128: 42-8.
40. Deshpande SV, Patil MJ, Daswadkar SC, Suralkar U, Agarwal A. A study on anti-inflammatory activity of the leaf and stem extracts of *Coccinia grandis* L. Voigt. Int J Appl Biol Pharm Technol 2011; 2: 247-50.

Antioxidant Properties, Total Phenolics and Flavonoids and the Inhibition of Cell Proliferation in Cholangiocarcinoma from Thai Herbals

Kittipat Sopitthummakhun^{1*}, Worrawat Promden² and Panthip Rattanasinganchan³

¹Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province, Thailand

²Faculty of Education, Buriram Rajabhat University, Buriram Province, Thailand

³Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province, Thailand

Abstract

This research studied the biochemical properties of Thai herbal extracts, namely the antioxidant properties, total phenolic and flavonoid contents, and the inhibition of cell proliferation in cholangiocarcinoma. The extracts were prepared by maceration in organic solvents. The ethyl acetate extracts of *Balanophora abbreviata* (BA) and *Dalbergia parviflora* (DP) were found to possess antioxidants against ABTS^{•+} and DPPH[•] and have high contents of total phenolics and flavonoids. The TEAC values for ABTS^{•+} and DPPH[•] of BA ethyl acetate extract were 1.878 ± 0.023 and 1.238 ± 0.066 , respectively, while the total phenolic and flavonoid contents were detected as 500.71 ± 5.84 mg GAE g⁻¹ extract and 353.89 ± 14.7 mg QE g⁻¹ extract, respectively. The TEAC values for ABTS^{•+} and DPPH[•] of DP ethyl acetate extract were 0.892 ± 0.025 and 1.943 ± 0.177 , respectively, while the total phenolic and flavonoid contents were detected to be 362.44 ± 5.95 mg GAE g⁻¹ extract and 685.93 ± 36.19 mg QE g⁻¹ extract, respectively. The methanol extracts of BA, DP, and *Barleria cristata* (BC) exhibited the percent inhibition of cell proliferation in cholangiocarcinoma cell line, RMCCA-1, at 51.21 ± 1.57 , 64.51 ± 0.77 and 40.40 ± 0.58 , respectively. However, the inhibition was not detected in Cholangiocyte cell line, MMNK-1. These studies concluded that the ethyl acetate extracts of BA and DP contain effective antioxidants, a high level of total phenolic and flavonoid contents, and the methanol extracts of BA and DP has the potential to inhibit cell proliferation in Cholangiocarcinoma. This information has the potential to be applied in pharmacological and biomedical research for developing effective cancer chemotherapeutic agents in the future.

Keywords: Antioxidant, Phenolic compounds, Flavonoids, Cholangiocarcinoma

*Corresponding author E-mail address: ksopittha@gmail.com

Received: 2 September 2020

Revised: 3 November 2020

Accepted: 18 November 2020

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่นำดีจากสมุนไพรไทย

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ^{1*} วรวัฒน์ พรหมเด่น² และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ³

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

²คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์

³คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของสารสกัดสมุนไพรไทย ประกอบด้วยสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่นำดี สารสกัดเตรียมโดยการแช่สมุนไพรในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหราเท้านุ้ (Balanophora abbreviate) และครี (Dalbergia parviflora) มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] และมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในระดับสูง โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหราเท้านุ้มีค่า TEAC ต่อ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 1.878 ± 0.023 และ 1.238 ± 0.066 ตามลำดับ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 500.71 ± 5.84 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัดและ 353.89 ± 14.7 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทของครี มีค่า TEAC ต่อ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 0.892 ± 0.025 และ 1.943 ± 0.177 ตามลำดับ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่ากับ 362.44 ± 5.95 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัดและ 685.93 ± 36.19 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ สารสกัดเมทานอลของโหราเท้านุ้ ครี และอังกาบ (Barleria cristata) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่นำดีชนิด RMCCA-1 โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 51.21 ± 1.57 , 64.51 ± 0.77 และ 40.40 ± 0.58 ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่นำดีปกติชนิด MMNK-1 ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากโหราเท้านุ้ และครีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์สูง และสารสกัดเมทานอลของโหราเท้านุ้และครี สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่นำดี ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยทางเภสัชวิทยาและการแพทย์ เพื่อพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ มะเร็งที่นำดี

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: ksopittha@gmail.com

รับบทความ: 2 กันยายน 2563

แก้ไขบทความ: 3 พฤศจิกายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 18 พฤศจิกายน 2563

บทนำ

ปัจจุบันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับการศึกษาวิจัย และค้นคว้าสารออกฤทธิ์สำคัญจากสมุนไพร โดยเฉพาะการศึกษาด้านเภสัชวิทยาที่จำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพ การแยกสารให้บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี และการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคอย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาสารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรได้รับความสนใจทางเภสัชวิทยาและการแพทย์ เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคเบาหวาน โรคไตเรื้อรัง และโรคมะเร็งหลายชนิด⁽¹⁾ สารออกฤทธิ์ที่มีรายงานว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบในสมุนไพร ประกอบด้วยกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งเรียกโดยรวมว่า “สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)” ที่มีสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายอย่าง ที่สำคัญ คือ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ และการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง^(2, 3) คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาวิจัยสารสกัดที่จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคในกลุ่มมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งพบมากในผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยมีสาเหตุจากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์เยื่อทางเดินท่อน้ำดี (biliary tract epithelial cell) ที่พัฒนาเปลี่ยนเป็นกลุ่มเซลล์เนื้อร้าย ซึ่งทางการแพทย์แบ่งเป็นสองกลุ่มสำคัญ คือ มะเร็งท่อน้ำดีนอกตับ (extrahepatic CCA) พบประมาณร้อยละ 75 ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมด และมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (intrahepatic CCA) พบประมาณร้อยละ 25 สาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าสัมพันธ์กับการอักเสบ และเชื่อมโยงกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้

ในตับ (*Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis*)⁽⁴⁾ ซึ่งเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงสุกของผู้คนในจังหวัดแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำหรับแนวทางการรักษาในปัจจุบันยังคงใช้การผ่าตัดเป็นวิธีการหลัก ร่วมกับการใช้เคมีบำบัด แต่ปัญหาสำคัญของมะเร็งท่อน้ำดีอยู่ที่วิธีการตรวจวินิจฉัย ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ในระยะแรก ส่วนมากจะพบเมื่อผู้ป่วยมีอาการอยู่ในระยะลุกลาม ทำให้การรักษาด้วยวิธีข้างต้น มีความเสี่ยงและมีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำ^(5, 6) ดังนั้นแนวทางสำคัญในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีจึงขึ้นกับหลักการ 2 ข้อคือ ข้อแรกต้องพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความเที่ยงตรง รวดเร็ว และแม่นยำ เพื่อนำไปสู่วิธีกำหนดแนวทางการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ และข้อที่สองคือการพัฒนาตัวยารักษาที่มีเป้าหมายต่อเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะ โดยเกิดอาการข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธี ABTS และ DPPH scavenging assay ร่วมกับการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด การวัดปริมาณรวมของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (total phenolic and flavonoid contents) ที่สัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ⁽⁷⁾ โดยศึกษาในสมุนไพรที่พบได้ในท้องถิ่นของประเทศไทย ได้แก่ โหระพา (Balanophora abbreviata) อังกาบ (Barleria cristata) แกแล (Maclura cochinchinensis) มะไฟเดือนห้า (Scoparia dulcis) กำแพงเก้าชั้น (Salacia verrucosa) มะเกลือ (Diospyros mollis) ครี (Dalbergia parviflora) กำแพงเจ็ดชั้น (Salacia chinensis) เพชรทิง (Spirolobium cambodianum) มะแขว่น (Zanthoxylum lim-

onella) และคัตเค้า (*Randia horrida*) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้ ด้วยวิธี MTT assay โดยคาดว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถนำไปต่อยอดองค์ความรู้ เพื่อพัฒนาเป็นตัวยารักษามะเร็งท่อน้ำดีที่มีประสิทธิภาพและมีผลข้างเคียงต่ำต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรด้วยการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์

สารสกัดหยาบจากสมุนไพรแต่ละชนิด ได้แก่ โหระพาสุ้นซ์ (*Balanophora abbreviata*) อังกาบ (*Barleria cristata*) แกแล (*Maclura cochinchinensis*) มะไฟเดือนห้า (*Scoparia dulcis*)

กำแพงเก้าซัน (*Salacia verrucosa*) มะเกลือ (*Diospyros mollis*) ครี (*Dalbergia parviflora*) กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*) เพชรหึง (*Spirolobium cambodianum*) มะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) และคัตเค้า (*Randia horrida*) เตรียมด้วยการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้ว (*solvent polarity*) แตกต่างกัน โดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมาก คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ส่วนของสมุนไพรที่ใช้ คือ ใบ ก้าน หรือ ดอกสำหรับการสกัดจากพืชแต่ละชนิดสรุปใน Table 1 ลำดับวิธีการเตรียมสารสกัดเริ่มด้วยการนำชิ้นส่วนสมุนไพรแต่ละชนิดล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วจึงนำไปอบให้แห้งในตู้อบ ใช้อุณหภูมิประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำชิ้นส่วนที่แห้งแล้วไปบั่นให้

Table 1 The part of herbal for extraction in organic solvent

Code [#]	Common name (ภาษาไทย)	Scientific name	The part of plant for extraction
BA	โหระพาสุ้นซ์	<i>Balanophora abbreviata</i>	Cap or Pileus
BC	อังกาบ	<i>Barleria cristata</i>	Stalk and leaf
DM	มะเกลือ	<i>Diospyros mollis</i>	Leaf
DP	ครี	<i>Dalbergia parviflora</i>	Stalk and leaf
MC	แกแล	<i>Maclura cochinchinensis</i>	Leaf
RH	คัตเค้า	<i>Randia horrida</i>	Leaf
SA	เพชรหึง	<i>Spirolobium cambodianum</i>	Stalk and leaf
SC	กำแพงเจ็ดชั้น	<i>Salacia chinensis</i>	Leaf
SD	มะไฟเดือนห้า	<i>Scoparia dulcis</i>	Stalk and leaf
SV	กำแพงเก้าซัน	<i>Salacia verrucose</i>	Leaf
ZL	มะแขว่น	<i>Zanthoxylum limonella</i>	Stalk and leaf

[#]The code indicates the scientific name of herbal in this study.

ละเอียด แล้วนำไปแช่ในตู้ทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำไปกรองเพื่อแยกกากด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 แล้วนำไประเหยแห้งเพื่อแยกตัวทำละลายส่วนเกินออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ในขั้นตอนสุดท้ายเก็บรักษาสารสกัดหยยาที่แห้งสนิทใน microtube ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

2. การวัดการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี ABTS และ DPPH scavenging assay

ABTS scavenging assay ทดสอบด้วยการนำสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยากับ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ซึ่งอยู่ในรูปอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยใช้หลักการวัดการหายไปของอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร⁽⁸⁾ วัดปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยใช้ความเข้มข้นของ $ABTS^{\bullet+}$ เท่ากับ 66 ไมโครโมลาร์ บ่มปฏิกิริยา (incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

DPPH scavenging assay ทดสอบด้วยการนำสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยากับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งอยู่ในรูปอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ โดยใช้หลักการวัดการหายไปของอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร⁽⁹⁾ วัดปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยใช้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ เท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) อนุมูลอิสระแสดงใน “Equation 1” โดยนำมาใช้เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ร้อยละห้าสิบ (inhibitory concentration at 50%, IC_{50}) แสดงใน “Equation 2” การศึกษานี้เปรียบเทียบค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) โดยใช้สัดส่วนระหว่างค่า IC_{50} ของ Trolox ต่อ IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพร (หรือ IC_{50} ของ ascorbic acid ที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการเปรียบเทียบ) โดยแสดงความสัมพันธ์ใน “Equation 3”

Equation 1

$$\text{ค่าร้อยละการยับยั้ง (\%inhibition)} = 100 - [(A_0/A_s) \times 100\%]$$

เมื่อค่า A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุมูลอิสระ ($ABTS^{\bullet+}$ หรือ $DPPH^{\bullet}$) และ A_s คือค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุมูลอิสระที่ผสมกับสารสกัดจากสมุนไพร หรือ สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (ในการทดลองนี้ คือ Trolox หรือ ascorbic acid)

Equation 2

$$Y = mX + C \text{ (สมการเส้นตรง)}$$

กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง “ค่าร้อยละการยับยั้ง (แกน X)” และความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (หรือความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox) (แกน Y) ในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า C แสดงจุดตัดแกน Y ค่า IC_{50} ได้จากการแทนค่า $Y = 50$ จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัด ณ จุดนี้

Equation 3

$$TEAC = \frac{\text{ค่า } IC_{50} \text{ ของ Trolox}}{\text{ค่า } IC_{50} \text{ ของสารสกัดจากสมุนไพร (หรือ ascorbic acid)}}$$

3. การวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

การวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกอ้างอิงตาม Ainsworth EA และ Gillespie KM (2007)⁽¹⁰⁾ วิธีการโดยย่อคือ วัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบฟีนอลิกของสารตัวอย่างกับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร⁽¹¹⁾ การรายงานค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด หาได้จากการคำนวณค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ใช้เป็นสารฟีนอลิกมาตรฐาน โดยรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE g⁻¹ extract)

การวัดปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์อ้างอิงตาม Zhishen J, และคณะ 1999⁽¹²⁾ วิธีการโดยย่อคือ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบฟลาโวนอยด์กับสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียมไนไตรท์ (NaNO₂) และอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร การรายงานค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์จากสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด หาได้จากการคำนวณค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอเซติน (quercetin) ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์มาตรฐาน โดยรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์เคอเซตินต่อกรัมสารสกัด (mg QE g⁻¹ extract)

4. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท้องน้ำดีชนิด RMCCA-1 ด้วยสารสกัดสมุนไพร

เซลล์มะเร็งท้องน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท้องน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงใน HAM-F12 ที่มี fetal bovine serum ร้อยละ 10 และ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum ร้อยละ 5

ตามลำดับ⁽¹³⁾ จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม บนถาด 96 หลุม จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายควบคุม (solvent control) จากนั้นนำเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดอัตราการรอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT⁽¹⁴⁾ โดยมีหลักการในการเปลี่ยนสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้เป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan crystal) เร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase จากเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วจึงนำผลึกฟอร์มาซาน ไปละลายใน DMSO (dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำสารละลายฟอร์มาซาน ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

5. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใช้วิธีการ One-way ANOVA ($p < 0.05$), ด้วย Data analysis function ในโปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft Office 365)

ผลการวิจัย

1. ค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสมุนไพร

กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน สำหรับเปรียบเทียบค่า TEAC กับสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่างๆ โดย TEAC ของกรดแอสคอร์บิกต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] มีค่าเท่ากับ 1.083 ± 0.002 และ 1.217 ± 0.170 ตามลำดับ (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบค่า TEAC ของสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ พบสารสกัด

Table 2 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) unit of ascorbic acid against ABTS and DPPH radicals

Standard antioxidant agent	TEAC**	
	ABTS	DPPH
Ascorbic acid	1.083 ± 0.002	1.217 ± 0.170

**The average values are from triplicate experiments, with standard deviation (SD)

จากสมุนไพรสองชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] มากกว่าร้อยละ 80 ของค่า TEAC ที่ได้จากการทดสอบคือ โหระพาสุ่ม (BA) มีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 1.878 ± 0.023 และ 1.238 ± 0.066 ตามลำดับ และครี (DP) มีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 0.892 ± 0.025 และ 1.943 ± 0.177 ตามลำดับ นอกจากนี้พบสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} อย่างเดียว คือ สารสกัดเมทานอล และเอทิลอะซิเตทจากแกลด (MC) มีค่า TEAC เท่ากับ 0.927 ± 0.050 และ 1.043 ± 0.073 ตามลำดับ และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากมะไฟเดือนห้า (SD) มีค่า TEAC เท่ากับ 0.830 ± 0.119 (Table 3)

2. ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

ปริมาณรวมที่สูงของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดสมุนไพรซึ่งสัมพันธ์และสอดคล้องกับความสามารถสูงในการต้านอนุมูลอิสระ สรุปใน Table 3 (โดยใช้เกณฑ์ในการพิจารณาจากค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•]) คือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหระพาสุ่ม (BA) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและ

ฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 500.71 ± 5.84 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด และ 353.89 ± 14.7 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของครี (DP) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 362.44 ± 5.95 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัดและ 685.93 ± 36.19 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดพบในสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากแกลด คือมีปริมาณเท่ากับ 604.97 ± 26.15 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด (ซึ่งมีค่า TEAC ต่อการต้านอนุมูลอิสระที่เฉพาะ ABTS^{•+}) ปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์สูงสุดพบในสารสกัดเมทานอลและเอทิลอะซิเตทของเพชรหึง (SA) เท่ากับ 903.89 ± 15.71 และ 864.23 ± 39.28 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ โดยมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับ ABTS^{•+} (Table 3)

3. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ชนิด RMCCA-1

ผลทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 พบว่าสารสกัดเมทานอลของ โหระพาสุ่ม (BA) อังกาบ (BC) มะเกลือ (DM) ครี (DP) แกลด (MC) และมะไฟเดือนห้า (SD) และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของ

Table 3 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) unit against ABTS and DPPH radicals and total phenolic and flavonoid contents in each plant extract

Plant list	Extraction solvent [§]	TEAC**		Total phenolics** mg GAE g ⁻¹ extract	Total flavonoids** mg QE g ⁻¹ extract
		ABTS	DPPH		
โหระท้าวสุนัข <i>B. abbreviata</i> (BA)	MeOH	0.204 ± 0.014	0.082 ± 0.003	82.72 ± 0.95	170.23 ± 7.73
	EtOAc	1.878 ± 0.023	1.238 ± 0.066	500.71 ± 5.84	353.89 ± 14.7
อังกาบ <i>B. cristata</i> (BC)	MeOH	0.130 ± 0.007	0.057 ± 0.001	55.08 ± 1.25	141.94 ± 2.95
	EtOAc	0.090 ± 0.004	0.031 ± 0.001	62.28 ± 2.15	170.72 ± 10.64
มะเกลือ <i>D. mollis</i> (DM)	MeOH	0.161 ± 0.013	0.077 ± 0.006	64.2 ± 1.66	177.13 ± 10.16
	EtOAc	0.217 ± 0.008	0.071 ± 0.003	81.08 ± 2.8	303.25 ± 13.48
ครี <i>D. parviflora</i> (DP)	MeOH	0.613 ± 0.045	0.097 ± 0.008	273.55 ± 10.74	576.11 ± 30.12
	EtOAc	0.892 ± 0.025	1.943 ± 0.177	362.44 ± 5.95	685.93 ± 36.19
แกแล <i>M. cochinchinensis</i> (MC)	MeOH	0.927 ± 0.050	0.278 ± 0.023	517.72 ± 7.78	659.18 ± 31.43
	EtOAc	1.043 ± 0.073	0.484 ± 0.076	604.97 ± 26.15	524.64 ± 28.87
คัดเค้า <i>R. horrida</i> (RH)	MeOH	0.324 ± 0.039	0.240 ± 0.012	203.71 ± 3.8	509.04 ± 31.94
	EtOAc	0.195 ± 0.013	0.189 ± 0.016	144.93 ± 4.65	409.98 ± 16.64
เพชรหึง <i>S. cambodianum</i> (SA)	MeOH	0.657 ± 0.101	0.825 ± 0.076	474.65 ± 2.97	903.89 ± 15.71
	EtOAc	0.765 ± 0.055	0.599 ± 0.016	389.05 ± 18.53	864.23 ± 39.28
กำแพงเจ็ดชั้น <i>S. chinensis</i> (SC)	MeOH	0.401 ± 0.034	0.563 ± 0.012	358.05 ± 19.17	757.3 ± 41.71
	EtOAc	0.262 ± 0.014	0.036 ± 0.003	42.67 ± 3.41	338.09 ± 20.95
มะไฟเดือนห้า <i>S. dulcis</i> (SD)	MeOH	0.500 ± 0.028	0.962 ± 0.072	331.71 ± 1.26	274.62 ± 17.78
	EtOAc	0.830 ± 0.119	0.309 ± 0.026	152.54 ± 3.09	223.19 ± 13.37
กำแพงเก้าชั้น <i>S. verrucosa</i> (SV)	MeOH	0.135 ± 0.001	0.076 ± 0.006	83.41 ± 1.21	218.8 ± 6.61
	EtOAc	0.014 ± 0.002	0.059 ± 0.001	58.99 ± 3.44	242.51 ± 6.05
มะแขว่น <i>Z. limonella</i> (ZL)	MeOH	0.364 ± 0.003	0.085 ± 0.005	160.16 ± 1.54	306.87 ± 15.3
	EtOAc	0.193 ± 0.008	0.047 ± 0.003	96.37 ± 1.91	245.9 ± 15.59

[§] The abbreviation of extraction solvent; MeOH (methanol), EtOAc (ethyl acetate)

**The average values are in the triplicate experiments with standard deviation (SD)

มะเกลือ มีค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 มากกว่าร้อยละ 40 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายควบคุม (Fig. 1) นอกจากนี้ ผลเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติ MMNK-1 พบว่าสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรโหระพาเห้าน้ำ (BA) อังกาบ (BC) และครี (DP) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 โดยมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 51.21 ± 1.57 , 40.40 ± 0.58 และ 64.51 ± 0.77 ตามลำดับ (Fig. 2) โดยไม่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ($p < 0.05$) ในทางตรงกันข้ามพบว่าสารสกัดเมทานอลและสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากมะเกลือ

(DM) และสารสกัดเมทานอล จากแกลง (MC) และมะไฟเดือนห้า (SD) กลับมีค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ท่อน้ำดีปกติมากกว่าของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Fig. 2)

วิจารณ์และสรุป

จากผลการทดลองโดยพิจารณาเปรียบเทียบค่า TEAC ของกรดแอสคอร์บิก (สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน) พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระทั้ง ABTS^{•+} และ DPPH[•] ที่ดีที่สุดในการทดลองนี้ ได้แก่ สารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหระพาเห้าน้ำ (BA) และครี (DP) ซึ่งมีค่าการต้านอนุมูลอิสระในหน่วยของ TEAC มากกว่าร้อยละ 80 ของค่าที่เทียบกับกรดแอสคอร์บิก (Table 2 และ 3) ในภาพรวมพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิด

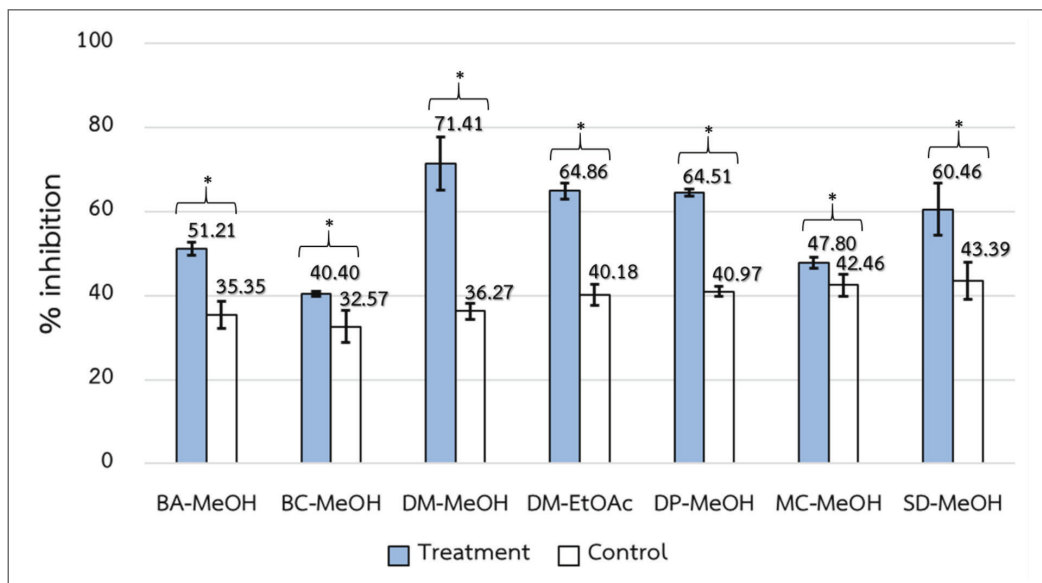


Fig. 1 Percent inhibition (%) of cell proliferation in RMCCA-1 using herbal extracts in 48 hours incubation. Treatment is defined as the incubation of 50 $\mu\text{g/mL}$ herbal extracts and RMCCA-1; control is defined as the incubation of extraction solvent (methanol) and RMCCA-1.

*The data are shown the significant difference at $p < 0.05$ (One-way ANOVA)

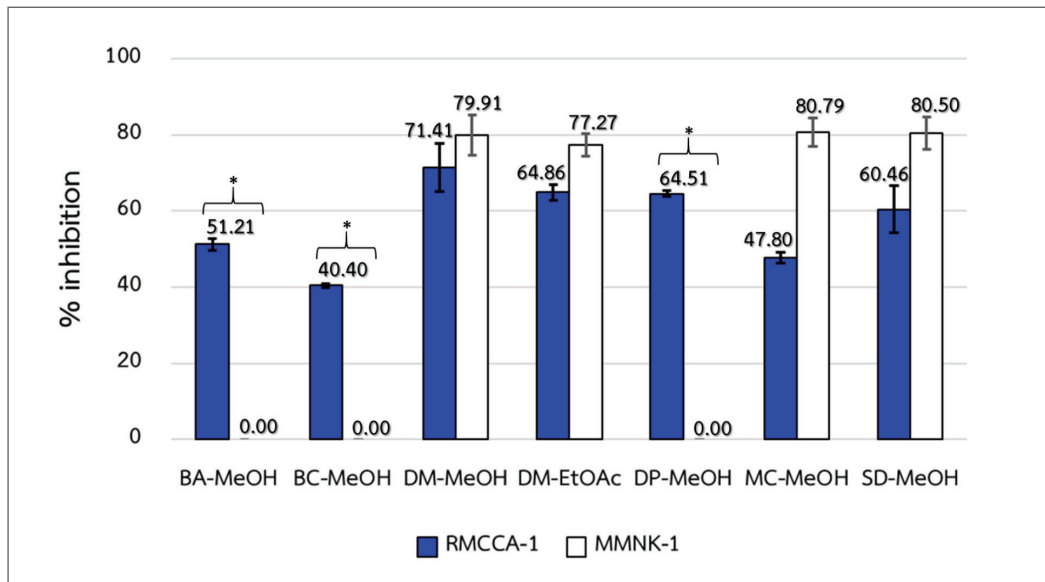


Fig. 2 The comparison between the percent inhibition (%) of cell proliferation in RMCCA-1 and MMNK-1 after 48 hours incubation with 50 $\mu\text{g/mL}$ herbal extracts.

*The data are shown the significant difference at $p < 0.05$ (One-way ANOVA).

มีค่าการต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับปริมาณรวมในระดับที่สูงของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ สอดคล้องกับผลการศึกษาในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ในสมุนไพรชนิดอื่น⁽¹⁵⁾ และแม้ว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากแกน (MC) จะไม่ได้มีค่าการต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH $\cdot$ ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับโหราเท้าน้ำและครี แต่ก็มีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS $\cdot^{+}$ ที่สูง (1.043 ± 0.073) ซึ่งมีความสอดคล้องไปในแนวโน้มเดียวกับค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (604.97 ± 26.15 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด) และฟลาโวนอยด์ (524.64 ± 28.87 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด) ในระดับที่สูงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบมีแนวโน้มคล้ายกันในสารสกัดเมทานอลจากเพชรหึง (SA) คือมีปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 903.89 ± 15.71 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด และมีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS $\cdot^{+}$ และ DPPH $\cdot$ เท่ากับ 0.657 ± 0.101

และ 0.825 ± 0.076 ตามลำดับ (Table 3)

ความสามารถในการละลายของสารสกัดสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นข้อจำกัดสำหรับการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ท่อน้ำดี ทำให้ไม่สามารถทดสอบสารสกัดได้ครบทุกชนิด เนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรที่เตรียมได้ทั้งหมดละลายได้น้อยมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือในตัวทำละลาย DMSO ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งพบว่าละลายสารสกัดสมุนไพรได้ดี และไม่มีปัญหาเรื่องการตกตะกอนเมื่อเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งใน Fig. 1 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุมที่ใช้ตัว

ทำละลายเมทานอล ($p < 0.05$) ปริมาณเมทานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลายจึงไม่มีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 นอกจากนี้สารสกัดจากสมุนไพรที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ดี ควรจะมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 (Fig. 2) ผลการทดสอบเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากพบว่าสารสกัดจากโหราเท้านุข (BA) อังกาบ (BC) และครี (DP) ในตัวทำละลายเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี RMCCA-1 เท่านั้น ($p < 0.05$) โดยไม่พบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 สารสกัดเหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากโหราเท้านุข (BA) และครี (DP) ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ได้ดี เมื่อหาค่าความแตกต่างระหว่าง ค่า TEAC เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก และมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในระดับที่สูง ซึ่งสัมพันธ์กับค่าการต้านอนุมูลอิสระสูง ดังนั้นโหราเท้านุขและครีจึงเป็นสมุนไพรที่น่าศึกษาต่อไป เพราะนอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ท่อน้ำดีปกติ

สารสกัดจากสมุนไพรในการวิจัยครั้งนี้เตรียมด้วยวิธีแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีระดับความมีขั้วแตกต่างกัน ซึ่งเป็นวิธีแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ในระดับหนึ่ง (partial purification) พบว่าสารออกฤทธิ์ที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูง และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบได้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ซึ่งสอดคล้อง

เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาสมุนไพรชนิดอื่นที่ใช้ระบบตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในขั้นตอนการเตรียมสารสกัด เช่น การสกัดสารจาก *Origanum minutiflorum* (พืชสมุนไพรมีลักษณะเป็นพุ่ม นำมาใช้ทำเป็นชาสำหรับดื่ม พบได้ในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาทางตอนเหนือ) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล (n-butanol) พบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] และมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกที่สูง จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และบิวทานอล⁽¹⁶⁾ การศึกษาสารสกัดจาก *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) (Oregano เป็นพืชในกลุ่มมินต์ มีกลิ่นเฉพาะตัว พบได้ในประเทศในฝั่งยุโรปที่ใกล้แถบศูนย์สูตร และแถบเมดิเตอร์เรเนียน) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ก็ได้รายงานว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] อนุมูลอิสระในระบบ FRAP (ferric reducing antioxidant power) และอนุมูลอิสระ superoxide (O₂^{•-}) พบในระบบตัวทำละลายที่เป็น น้ำ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท อีกทั้งยังมีค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในระดับที่สูง นอกจากนี้ยังมีรายงานการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa จากสารสกัดในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท⁽¹⁷⁾ สารสกัดจากใบต้นชิงเขา (ในประเทศไทยเรียกว่า ต้นโกฐจุฬาลัมพา) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล (อัตราส่วน 20:80) พบว่ามีค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} อนุมูลอิสระในระบบ CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูง อีกทั้งยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง DLD-1 (human colon adenocarcinoma) และ ECC-1 (human endometrium carcinoma)⁽¹⁸⁾ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์สำคัญจากสมุนไพรทั้งสองชนิดพบได้จากการสกัดด้วยตัวทำ

ละลายที่มีสมบัติขี้ข้าว (เมทานอล และเอทิลอะซิเตท มีความเป็นขี้ข้าวมากกว่าเฮกเซน) ข้อมูลที่ได้เหล่านี้จะนำไปสู่การค้นคว้า พัฒนาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพ และการแยกองค์ประกอบในสารสกัดของสมุนไพรเหล่านี้ รวมทั้งการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเบื้องต้นเพื่อการพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาโรคมะเร็งในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ฤทัยวรรณ ไช้ทอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมี และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระชัย ทิตถากร วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Liguori I, Russo G, Curcio F, *et al.* Oxidative stress, aging and disease. Clin Interv Aging 2018; 13: 757-77.
2. Sudha P, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian ayurvedic medicinal plants. BMC Complem Altern M 2011; 11: 1-10.
3. Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants—EUROFEDA. Mol Aspects Med 2002; 23: 1-38.
4. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. Ann Oncol 2005; 16 Suppl 2; ii93-6.
5. Sripa B, Parojkul C. Cholangiocarcinoma: Lessons from Thailand. Curr Opin Gastroenterol 2014; 24: 349-56.
6. Treeprasertsuk S, Poovorawan K, Soonthornworasiri N, *et al.* A significant cancer burden and high mortality of intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand: a nationwide database study. BMC Gastroenterology 2017; 17: 1-7.
7. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997; 2: 152-9.
8. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999; 26: 1231-37.
9. Jinlun X, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. J Agric Food Chem 2014; 62: 4251-60.
10. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. Nat Protoc 2007; 2: 875-7.
11. Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. Anal Methods 2013; 21: 5990-9.

12. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999; 64: 555-9.
13. Rattanasinganchan P, Leelawat K, Treepongkaruna S, *et al.* Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line (RMCCA-1) from a Thai patient. World J Gastroenterol 2006; 12: 6500-6.
14. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochemica 2012; 114: 785-96.
15. Shi P, Du W, Wang Y, Teng X, Chen X, Ye L. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Food Sci Nutr 2019; 7: 148-54.
16. Elmastas M, Celik SM, Genc N, Aksit H, Erenler R, Gulcin I. Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea — *Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. Int J Food Prop 2018; 21: 374-84.
17. Koldas S, Demirtas I, Ozen T, Demirci MA, Behcet L. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. J Sci Food Agric 2015; 95: 786-98.
18. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. Cell Mol Biol 2018; 64: 25-34.

The Comparison of Efficiency, Sensitivity, and Effect of Inhibitors on Commercial DNA Analysis Kits

Phatcharin Mahawong, Supakit Khacha-ananda* and Yutti Amornlertwatana

*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai Province, Thailand*

Abstract

DNA fingerprint provides great and useful information for human identification in criminal investigations and court cases, family relationships and human ancestor study. To investigate DNA fingerprint, a commercial kit based on polymerase chain reaction technique representing a rapid and convenient use has been chosen to obtain the highest efficiency and less time-consuming. The parameters such as sensitivity, efficiency, and capability to amplify DNA under inhibitors were considered for the selection of commercial kit. Hence, the aim of research was to compare these parameters between two commercial kits (Investigator[®]24 plex Go kit and PowerPlex[®] Fusion 6C). The standard DNA was serial two-fold diluted in the range between 0.25-5.0 ng/ μ L. In the case of inhibitors, DNA samples were mixed with different kinds of inhibitors (calcium chloride, humic acid, or hematin). The percentage of detected allele, average peak height, heterozygous peak balance, and inter-locus balance were calculated. The results found that percentage of detected allele, average peak height, and heterozygous peak balance in low concentration of DNA sample analyzed by Investigator[®]24 plex Go kit were better than those by PowerPlex[®] Fusion 6C kit. However, DNA sample investigated by PowerPlex[®] Fusion 6C kit provided low value ranging in acceptance criteria of inter-locus balance. It was found that calcium chloride affected DNA amplification processed by PowerPlex[®] Fusion 6C kit, whereas hematin interfered with DNA amplification processed by Investigator[®]24 plex Go kit. Nevertheless, humic acid did not affect amplification process of both commercial kits. In conclusion, both commercial kits showed efficiency in DNA fingerprinting. Investigator[®]24 plex Go kit also gave good typing which can be obtained from a very low amount of DNA. The research data provides useful information to guide the selection of commercial kit that corresponds with services and specimens in laboratory resulting in maximal accuracy and precision of DNA typing result.

Keywords: DNA, Efficiency, Sensitivity, Amplification inhibitor

*Corresponding author E-mail address: supakit.kh@cmu.ac.th

Received: 15 October 2020

Revised: 7 December 2020

Accepted: 9 December 2020

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ความไว และผลของตัวยับยั้ง ชุดนำยาดตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป

พัชรินทร์ มawangค์ สุภกิจ คชาอนันต์* และ ยุติ อมรเลิศวัฒนา

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

บทคัดย่อ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีประโยชน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลทางคดี พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการศึกษาบรรพบุรุษมนุษย์ การทดสอบดังกล่าวอาศัยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปด้วยเทคนิค polymerase chain reaction ที่สะดวกและรวดเร็วเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดและลดระยะเวลาในการทดสอบ พารามิเตอร์ เช่น ประสิทธิภาพ ความไว และความทนต่อสารยับยั้งเป็นปัจจัยที่ต้องพิจารณาสำหรับการเลือกใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของนำยาดสำเร็จรูประหว่าง Investigator® 24 plex Go kit และ PowerPlex® Fusion 6C โดยเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 - 5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ศึกษาความทนต่อสารยับยั้งโดยทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ กรดฮิวมิก หรือเฮมาติน จากนั้นเปรียบเทียบพารามิเตอร์ ได้แก่ ร้อยละจำนวนอัลลีลที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ค่าเฉลี่ยความสูงของพีค heterozygous peak balance และ inter-locus balance ผลการทดลองพบว่า Investigator® 24 plex Go kit ตรวจพบร้อยละจำนวนอัลลีล ค่าเฉลี่ยความสูงของพีค และ heterozygous peak balance ได้ดีกว่า PowerPlex® Fusion 6C kit ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระดับต่ำ แต่ PowerPlex® Fusion 6C kit ให้ค่า inter-locus balance ในระดับต่ำและอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ส่วนความทนต่อสารยับยั้งพบว่า Investigator® 24 plex Go kit ทนทานต่อแคลเซียมคลอไรด์ได้ดี ขณะที่ PowerPlex® Fusion 6C kit ทนทานต่อเฮมาตินได้ดี แต่ไม่พบความแตกต่างของสองชุดตรวจเมื่อบ่มร่วมกับกรดฮิวมิก จึงสรุปได้ว่าชุดตรวจทั้งสองมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดย Investigator® 24 plex Go kit สามารถใช้ได้ดีแม้ว่าในตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอน้อย และชุดตรวจทั้งสองมีความสามารถทนต่อสารยับยั้งได้แตกต่างกัน ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการในการเลือกใช้ชุดตรวจให้ตรงกับวัตถุประสงค์ของงาน เพื่อช่วยการตรวจวิเคราะห์ให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ ประสิทธิภาพ ความไว สารยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: supakit.kh@cmu.ac.th

บทนำ

ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นกรดนิวคลีอิกชนิดหนึ่งทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจึงมีความสำคัญในลำดับวิวัฒนาการเนื่องจากเป็นสารพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่น โดยบุตรได้รับการถ่ายทอดจากบิดาหนึ่งส่วนและมารดาอีกหนึ่งส่วน ทำให้พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอในแต่ละบุคคลที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติ^(1, 2) และเนื่องจากดีเอ็นเอสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ผิวหนัง เยื่อ กระพุ้งแก้ม กระดูก หรือปลายรากเส้นผม⁽³⁾ ทำให้มีการนำดีเอ็นเอมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเพื่อระบุยืนยันตัวบุคคลในทางคดี พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายโลหิต รวมทั้งการศึกษาวิวัฒนาการและบรรพบุรุษมนุษย์⁽⁴⁾

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลหรือความสัมพันธ์ทางสายโลหิตใช้วิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการ denaturation, annealing และ extension ทำให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่และมีจำนวนของสายดีเอ็นเอมากขึ้น⁽⁵⁾ จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค electrophoresis ซึ่งในอดีตการตรวจสอบจะกระทำแบบ single-locus PCRs และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค silver staining⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามมีการพัฒนาน้ำยาที่สามารถตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอได้มากกว่า 1 ตำแหน่งในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันและสะดวกรวดเร็วมากขึ้น โดยใช้เทคนิค multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) ซึ่งอาศัย primer มากกว่าหนึ่งชุดในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อให้มีการขยายส่วนดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งชิ้นในหนึ่งปฏิกิริยาพร้อมๆ กัน ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน⁽⁷⁾

การตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่นิยมโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่มีการเรียงตัวของเบสแบบซ้ำๆ ที่เรียกว่า short tandem repeats (STRs) ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในโครโมโซมร่างกาย (autosomal chromosome) และโครโมโซมเพศ (sex chromosome)⁽⁸⁾ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 องค์การระหว่างประเทศ Federal Bureau of Investigation (FBI) แนะนำให้ตรวจรูปแบบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 13 ตำแหน่ง (loci) ประกอบด้วย CSF1PO, FGA, THO1, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 และ D21S11 ทั้งนี้ในปัจจุบันการตรวจในตำแหน่งดังกล่าวอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากลักษณะรูปแบบดีเอ็นเอในบางตำแหน่งสามารถพบความถี่ลดซ้ำกันในกลุ่มประชากรเดียวกันมากยิ่งขึ้น จึงส่งผลต่อความเชื่อมั่นในการแปลผลการวิเคราะห์ จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการพัฒนาชุดน้ำยาใหม่ที่เพิ่มจำนวนตำแหน่งการวิเคราะห์จากเดิมอีก 7 ตำแหน่ง ได้แก่ D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045 เพื่อเพิ่มอำนาจในการคัดออกและแยกแยะความแตกต่างระหว่างสองบุคคล⁽⁹⁾

ในห้องทดลองมีบริษัทผู้ผลิตจำนวนหลายรายที่จำหน่ายชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปดังกล่าวเพื่อใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งหน่วยงานที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เช่น The Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) และ The European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) ได้กำหนดมาตรฐานในการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป ที่ต้องศึกษาความถูกต้องของชุดน้ำยา ความไว และความทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ซึ่งเป็นสาเหตุที่พบบ่อยสุดของความล้มเหลวใน

การทำ PCR แม้ว่าจะมีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอ รายงานที่ผ่านมาพบว่ากรดฮิวมิก และเฮมาตินเป็นหนึ่งในสารยับยั้งและรบกวนกระบวนการทำ PCR ที่สามารถพบได้ในกรณีวัตถุพยานหรือผู้เสียหายถูกฝังดินเป็นเวลานาน⁽¹⁰⁾ นอกจากนั้นสารกลุ่มคอลลาเจน และแคลเซียมที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งในวัตถุพยาน กระดูกสามารถรบกวนปฏิกิริยา PCR ได้เช่นกัน⁽¹¹⁾ จากปัจจัยดังกล่าวจึงทำให้การพิจารณาเลือกใช้ชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องศึกษาความไว ประสิทธิภาพ และความทนต่อสารยับยั้งกระบวนการ PCR เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของงานที่ปฏิบัติและชนิดของสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ และได้น้ำยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ลดอัตราการทำซ้ำและเวลาในการวิเคราะห์ และลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพ ความไว และความทนต่อสารยับยั้งกระบวนการ PCR ของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป (multiplex commercial PCR amplification kits) จำนวน 2 ยี่ห้อระหว่าง Investigator® 24 plex Go kit และ PowerPlex® Fusion 6C

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐาน

ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาทดสอบคือ control DNA 9948 (Qiagen, Germany)

2. ประสิทธิภาพและความไวของชุดทดสอบ

นำดีเอ็นเอมาตรฐานใน 5 ช่วงความเข้มข้น (5.0, 2.5, 1.0, 0.5 และ 0.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยชุดวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit (Qiagen, Germany) หรือ PowerPlex® Fusion

6C (Promega, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท

3. ความทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมาศึกษาผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR โดยศึกษาตัวยับยั้ง 3 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์ เฮมาติน (hematin) ความเข้มข้น 1800, 3600 และ 7200 ไมโครโมลาร์ และกรดฮิวมิก (humic acid) ความเข้มข้น 75, 150 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร⁽¹²⁾ โดยเติมตัวยับยั้งแต่ละชนิดและแต่ละความเข้มข้นลงไปในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit หรือ PowerPlex® Fusion 6C ตามคำแนะนำของบริษัท

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification)

นำดีเอ็นเอในแต่ละการทดลองไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค multiplex PCR สำหรับน้ำยา Investigator® 24 plex Go kit เพิ่มปริมาณด้วย primer ต่อทั้งหมด 22 ตำแหน่ง ได้แก่ D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, SE33, DYS391 และ Amelogenin ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย denaturation อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาทีจำนวน 3 รอบ จากนั้น denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที annealing อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

40 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที จำนวน 23 รอบ และ extension อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น final extension อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

สำหรับน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C เพิ่มปริมาณด้วย primer ต่อทั้งหมด 27 ตำแหน่งได้แก่ CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, Penta D, Penta E, SE33, Amelogenin, DYS391, DYS576 และ DYS576 ภายใต้สภาวะที่ประกอบด้วย pre denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 29 รอบ และ extension อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำ PCR product ที่ได้ไปแยกและตรวจวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

5. การแยกและตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วิเคราะห์รูปแบบอัลลีลของ PCR product ด้วยเครื่อง Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, USA) ตามคำแนะนำของแต่ละชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์ โดยนำ PCR product ผสมกับ Hidi-formamide และ BTO size standard จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีแล้วจึงนำเข้าเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ซึ่งรูปแบบของอัลลีลในแต่ละตำแหน่งการตรวจจะทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Mapper IDX (Applied Biosystems, USA)

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองซ้ำในแต่ละกลุ่มตัวอย่างและในแต่ละการทดลองแบบ intra-day และ inter-day จำนวน 3 ซ้ำ ผลการทดลองทั้งหมดแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การคำนวณประสิทธิภาพ ความไว และความทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการ PCR อาศัยพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

1. ร้อยละจำนวนอัลลีลที่ตรวจวิเคราะห์ได้ แสดงร้อยละของจำนวนอัลลีลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ ต่อจำนวนอัลลีลทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบ⁽¹²⁾

2. ค่าเฉลี่ยความสูงของพีค คำนวณจากค่าเฉลี่ยความสูงของพีคที่ตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งหมดและแสดงผลในหน่วย relative fluorescent units (RFUs)⁽¹³⁾

3. Heterozygous peak balance คือค่าความสมดุลของอัตราส่วนความสูงพีคที่เป็น heterozygous คำนวณจากอัตราส่วนระหว่างความสมดุลของ 2 พีคที่เป็น heterozygous locus หากชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพที่ดีในการแสดงผลค่าพีค heterozygous ค่าที่ได้ควรมากกว่า 0.6^(13, 14)

4. Inter-locus balance อัตราส่วนความสูงของพีคในแต่ละตำแหน่งของ STR หนึ่งเปรียบเทียบกับตำแหน่งอื่นๆ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกัน ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียงกัน โดยสามารถคำนวณจากค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (coefficient of variance) ของอัตราส่วนระหว่างความสูงของพีคในตำแหน่งหนึ่งกับผลรวมของความสูงของพีคทั้งหมดในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นั้น ซึ่งค่าที่ต่ำแสดงถึงมีค่า inter-locus balance ที่ดี โดยควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.350⁽¹⁵⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม GraphPad Prism® software version 5.01 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวแปรมากกว่า 2 ตัว ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (Two-way

ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในรายคู่ด้วย Bonferroni post-tests ขณะที่การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียวหรือปัจจัยเดียว 2 กลุ่มขึ้นไปทดสอบด้วย One-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในรายคู่ด้วย post-hoc Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติน้อยกว่า 0.05

ผลการวิจัย

ในการศึกษาประสิทธิภาพ ความไว และความทนต่อตัวบ่งชี้จะเปรียบเทียบเฉพาะในตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่าง 2 ชุดตรวจสำเร็จรูป โดยพบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit สามารถวิเคราะห์จำนวนรูปแบบอัลลีลได้ทั้งหมดร้อยละ 100 ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งแต่ 0.25 - 5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ขณะที่ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C สามารถวิเคราะห์จำนวนอัลลีลได้ทั้งหมดร้อยละ 100 ในความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 2.5 และ 5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.25, 0.5 และ 1.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสามารถตรวจวิเคราะห์จำนวนอัลลีลได้ทั้งหมดร้อยละ 10.61 ± 2.63, 92.42 ± 6.94 และ 92.42 ± 9.46 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 ชุดตรวจพบว่าจำนวนรูปแบบอัลลีลที่ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับจำนวนรูปแบบอัลลีลที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C (Fig. 1A) ขณะที่ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคพบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit มีค่าเฉลี่ยความสูงของพีค ระหว่าง 767.40 ± 40.39 ถึง 10,215.01 ± 2,500.92 relative

fluorescent units (RFUs) เมื่อวิเคราะห์ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ขณะที่ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C มีค่าเฉลี่ยความสูงของพีคระหว่าง 17.24 ± 5.39 ถึง 2,366.51 ± 863.26 RFUs โดยความสูงของพีคที่ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอความเข้มข้น 1.0, 2.5 และ 5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับความสูงของพีคที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C (Fig. 1B)

การศึกษาค่า heterozygous peak balance ของชุดวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป 2 ชนิด พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit มีค่า heterozygous peak balance เฉลี่ยระหว่าง 0.85 ± 0.03 ถึง 0.93 ± 0.009 เมื่อวิเคราะห์ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ขณะที่ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C มีค่า heterozygous peak balance เฉลี่ยระหว่าง 0.0 ± 0.0 ถึง 0.96 ± 0.009 เมื่อวิเคราะห์ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Fig. 2) โดยค่า heterozygous peak balance ที่ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C (Fig. 2) และเมื่อเปรียบเทียบค่า heterozygous peak balance ของทั้งสองชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งแต่ 0.5 ถึง 5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าค่าเฉลี่ย heterozygous peak balance มีค่ามากกว่า 0.6 แสดงว่ามีความสมดุลของอัตราส่วนความสูงพีคที่เป็น heterozygous ที่ดีไม่แตกต่างกัน

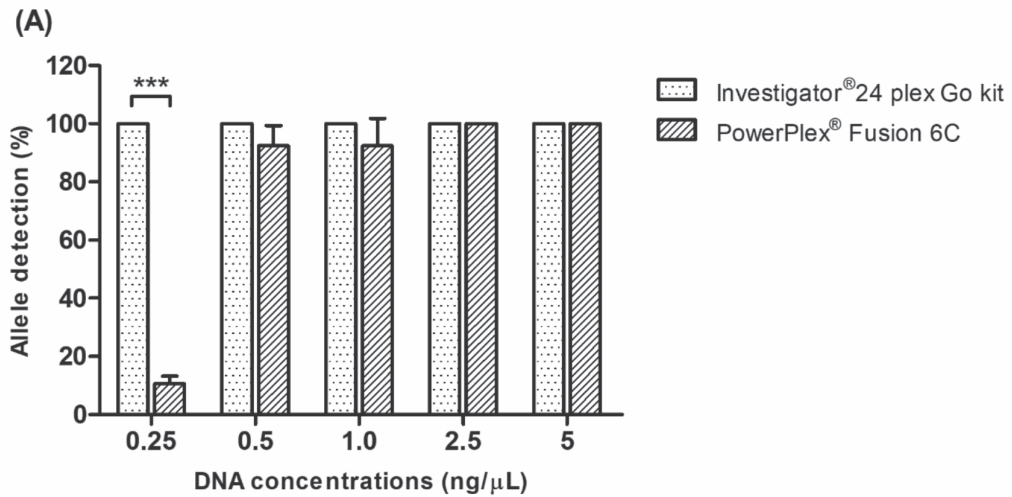


Fig.1 The percentage (A) and average peak height (RFUs) (B) of detected alleles in DNA samples at concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, and 5 ng/μL. The investigation of allele was performed by two multiplex commercial PCR amplification kits either Investigator®24 plex Go kit or PowerPlex® Fusion 6C. The data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. *P < 0.05 and ***P < 0.001 compared between two kits

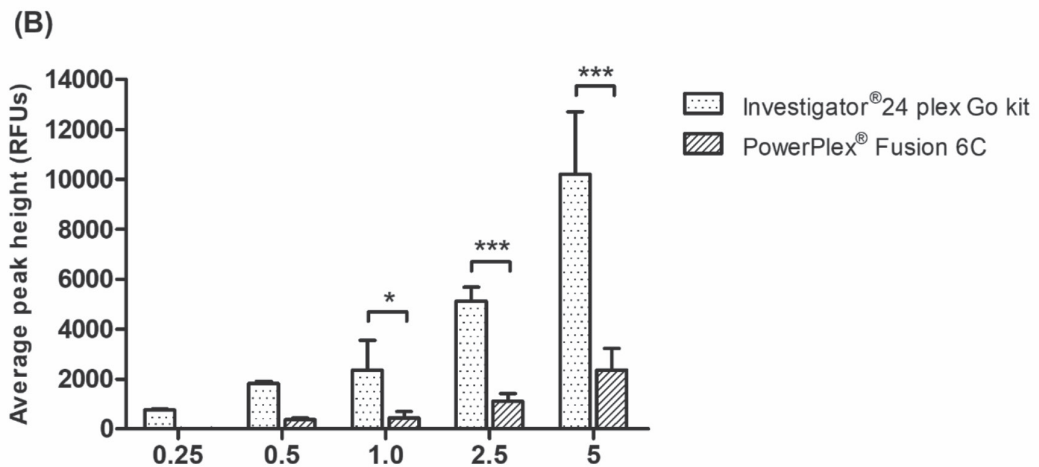


Fig.1 The percentage (A) and average peak height (RFUs) (B) of detected alleles in DNA samples at concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, and 5 ng/μL. The investigation of allele was performed by two multiplex commercial PCR amplification kits either Investigator®24 plex Go kit or PowerPlex® Fusion 6C. The data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. *P < 0.05 and ***P < 0.001 compared between two kits

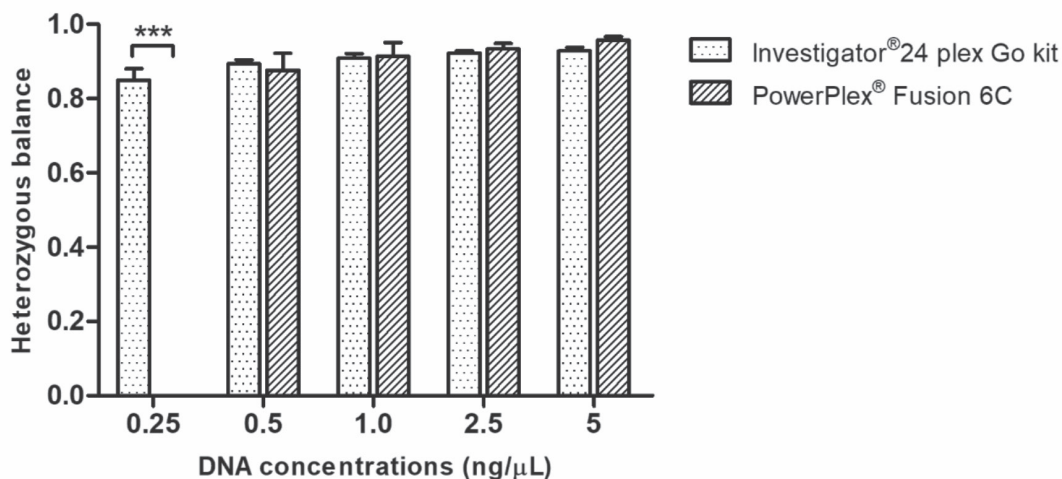


Fig. 2 The heterozygous peak balance (intra-locus balance) of detected alleles in DNA samples at concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, and 5 ng/μL. The investigation of allele was performed by two multiplex commercial PCR amplification kits either Investigator®24 plex Go kit or PowerPlex® Fusion 6C. The data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. ***P < 0.001 compared between two kits

การศึกษา inter-locus balance พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit สามารถวิเคราะห์ค่า inter-locus balance ได้ในช่วง 0.56 ± 0.02 ถึง 0.60 ± 0.08 เมื่อวิเคราะห์ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C สามารถวิเคราะห์ค่า inter-locus balance ได้ในช่วง 0.26 ± 0.03 ถึง 3.09 ± 0.36 ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Fig.3) และเมื่อเปรียบเทียบ ระหว่าง 2 ชุดตรวจพบว่า inter-locus balance ที่ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go มีค่าน้อยกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C (Fig. 3) และเมื่อเปรียบเทียบค่า inter-locus balance ของทั้งสองชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งแต่ 0.5 ถึง 5.0 นาโนกรัม

ต่อไมโครลิตร พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C มีค่า inter-locus balance น้อยกว่า 0.350 แสดงว่ามีความสมดุลของอัตราส่วนความสูงของอัลลีลในแต่ละตำแหน่งดีกว่า ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go

ผลแคลเซียมคลอไรด์ในการยับยั้งปฏิกิริยา PCR พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit สามารถวิเคราะห์จำนวนรูปแบบอัลลีลได้ทั้งหมดร้อยละ 100 ในทุกความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (Fig. 4A) ขณะที่ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C สามารถวิเคราะห์จำนวนอัลลีลได้ทั้งหมดร้อยละ 81.82 ± 0.0 , 30.30 ± 5.24 และ 16.67 ± 2.62 ในแต่ละความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ (Fig. 4C) ขณะที่ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคทั้งหมด พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์

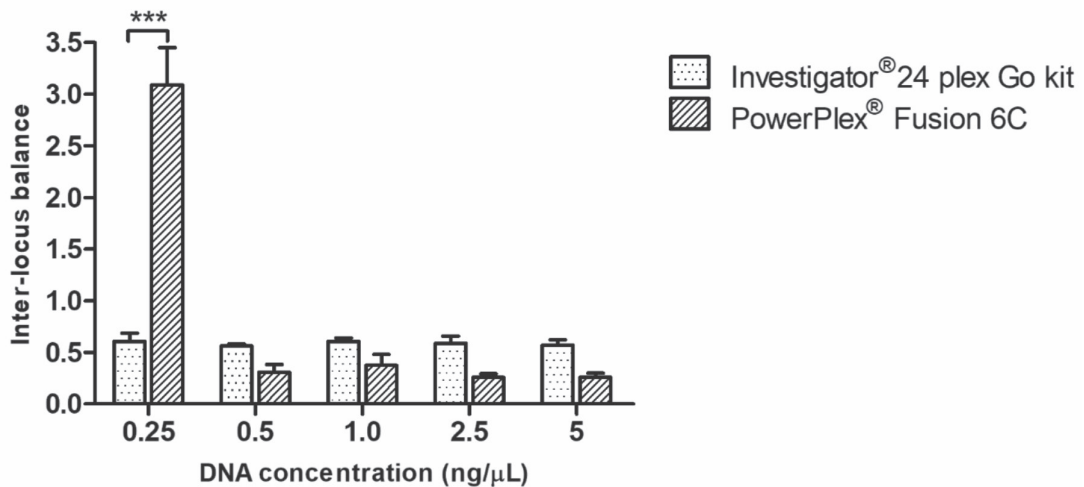


Fig. 3 The inter-locus balance of detected alleles in DNA samples at concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, and 5 ng/μL. The investigation of allele was performed by two multiplex commercial PCR amplification kits either Investigator®24 plex Go kit or PowerPlex® Fusion 6C. The data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. ***P < 0.001 compared between two kits

สำเร็จรูป Investigator®24 plex Go kit และ PowerPlex® Fusion 6C มีค่าเฉลี่ยความสูงของพีคระหว่าง $13,528.86 \pm 2,2224.92$ ถึง $14,703.48 \pm 1,900.044$ RFUs และ 357.14 ± 73.25 ถึง $3,555.59 \pm 354.58$ RFUs เมื่อวิเคราะห์ในทุกความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (Fig. 4B และ Fig. 4D) โดยแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคที่วิเคราะห์ด้วย PowerPlex® Fusion 6C ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ (Fig. 4D)

ในกรณีของกรดฮิวมิก พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator®24 plex Go kit สามารถวิเคราะห์จำนวนรูปแบบอัลลีลได้ทั้งหมดร้อยละ 100 ในทุกความเข้มข้นของกรดฮิวมิกที่นำมาทดสอบ (Fig. 5A) ขณะที่ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป

PowerPlex® Fusion 6C สามารถวิเคราะห์จำนวนอัลลีลได้ร้อยละ 100 ± 0.00 , 100 ± 0.00 และ 30.30 ± 13.89 ในความเข้มข้นของกรดฮิวมิก ตั้งแต่ 75, 150 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (Fig. 5C) ขณะที่ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคทั้งหมดที่วิเคราะห์ พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator®24 plex Go kit และ PowerPlex® Fusion 6C มีค่าเฉลี่ยความสูงของพีคระหว่าง $1,333.31 \pm 655.10$ ถึง $8,377.02 \pm 2,258.24$ RFUs และ 159.67 ± 94.15 ถึง $2,483 \pm 947.43$ RFUs เมื่อวิเคราะห์ในทุกความเข้มข้นของกรดฮิวมิก (Fig. 5B และ Fig. 5D) และเมื่อเปรียบเทียบความสูงเฉลี่ยของพีคระหว่าง 2 ชุดตรวจพบว่าความสูงของพีคที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator®24 plex Go มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดฮิวมิกเพิ่มมากขึ้น และชุดตรวจทั้งสอง

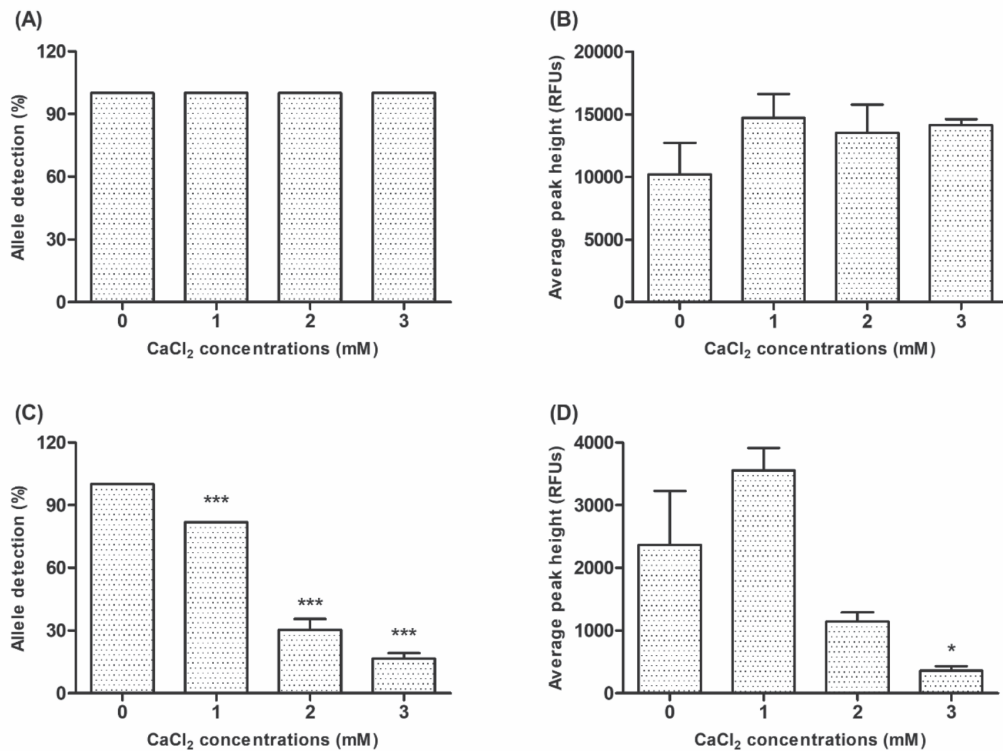


Fig. 4 The inhibitory effect of calcium chloride on PCR amplification and STR typing. The percentage (A) and average peak height (RFUs) (B) of detected alleles performed by Investigator®24 plex Go kit. The percentage (C) and average peak height (RFUs) (D) of detected alleles performed by PowerPlex® Fusion 6C. The data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared the experimental group without inhibitor

พบความสูงเฉลี่ยของพีคมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีกรดฮิวมิกความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Fig. 5B และ Fig. 5D)

การยับยั้งปฏิกิริยา PCR ด้วยตัวยับยั้งเฮมาติน พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit และ PowerPlex® Fusion 6C ตรวจร้อยละจำนวนอัลลีลได้ลดลงเท่ากับ 84.85 ± 26.24 และ 78.79 ± 15.96 ตามลำดับ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเฮมาตินความเข้มข้น 7,200 ไมโครโมลาร์ (Fig. 6A และ Fig. 6C) ขณะที่ค่าเฉลี่ยความสูงของ

พีคทั้งหมดที่วิเคราะห์ พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit มีความสูงของพีคเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเฮมาตินความเข้มข้น 1,800 3,600 และ 7,200 ไมโครโมลาร์ (Fig. 6B) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างแต่ละความเข้มข้นของเฮมาติน เมื่อตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C (Fig. 6D)

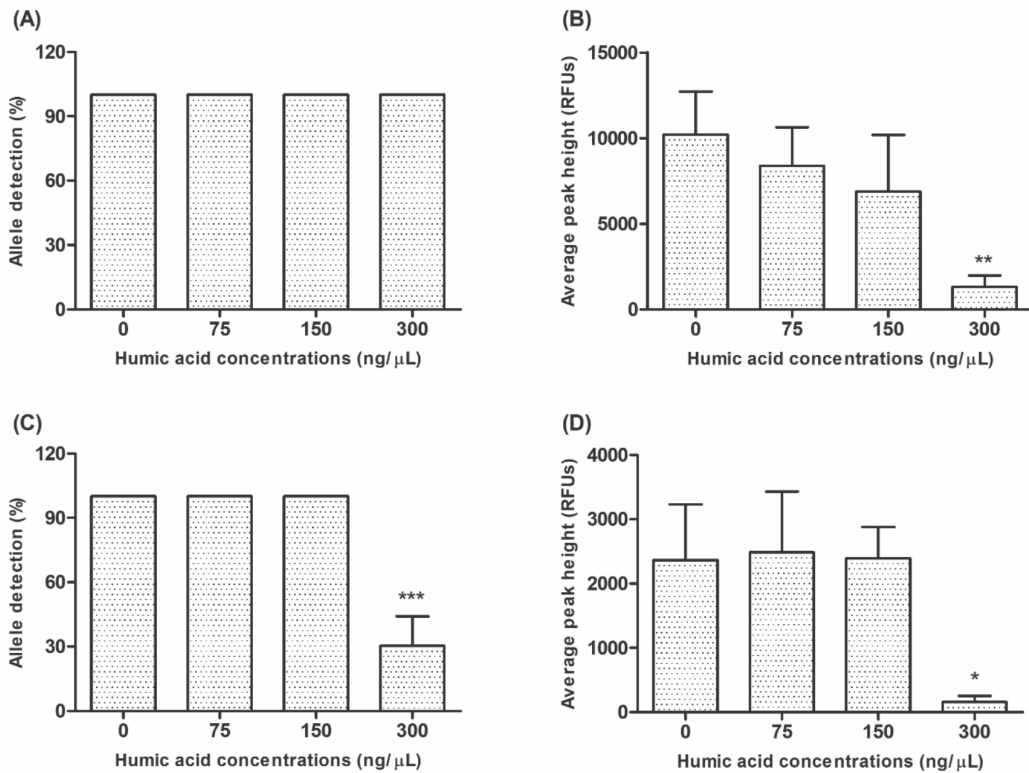


Fig. 5 The inhibitory effect of humic acid on PCR amplification and STR typing. The percentage (A) and average peak height (RFUs) (B) of detected alleles performed by Investigator® 24 plex Go kit. The percentage (C) and average peak height (RFUs) (D) of detected alleles performed by PowerPlex® Fusion 6C. The data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared the experimental group without inhibitor

วิจารณ์

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีประโยชน์ต่องานนิติวิทยาศาสตร์และนิติเวชศาสตร์ ที่จะนำไปสู่การพิสูจน์ข้อเท็จจริงในคดีความตามกระบวนการยุติธรรม และด้วยความหลากหลายของตัวอย่างในคดีความต่าง ๆ ที่ใช้ตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ เช่น เลือดหรือคราบเลือด เชื้อบูกระพุ้งแก้ม คราบอสุจิ เส้นผม กล้ามเนื้อ และกระดูก ส่งผลต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอ⁽¹⁶⁾ และปริมาณตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่มีในแต่ละตัวอย่าง⁽¹⁷⁾ ดังนั้นความหลากหลายดังกล่าวจึงเป็น

ปัจจัยสำคัญที่ต้องนำมาพิจารณาในการเลือกชุดตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพ ความไว และทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR จากการศึกษาเปรียบเทียบความไว และประสิทธิภาพระหว่างชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit และ PowerPlex® Fusion 6C kit ในตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานหมายเลข 9948 พบว่าชุดวิเคราะห์ทั้งสองสามารถวิเคราะห์รูปแบบอัลลีลได้ทั้งหมดร้อยละ 100 ยกเว้นที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระดับต่ำสุดในงานวิจัยนี้คือ 0.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

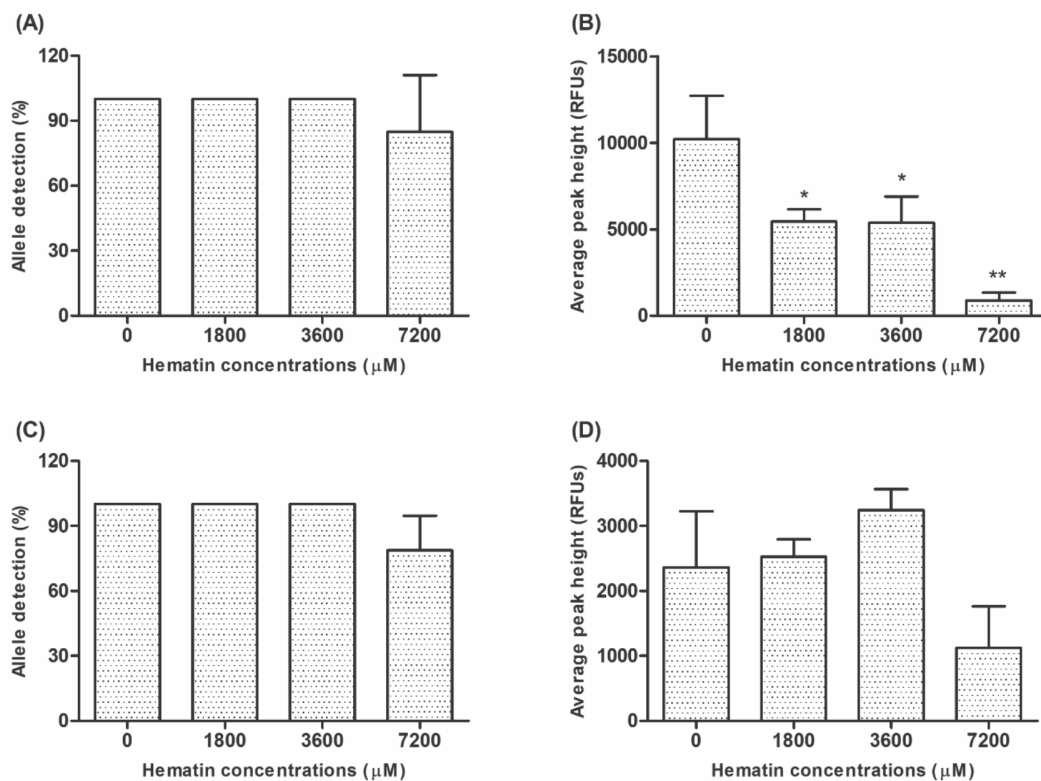


Fig. 6 The inhibitory effect of hematin on PCR amplification and STR typing. The percentage (A) and average peak height (RFUs) (B) of detected alleles performed by Investigator® 24 plex Go kit. The percentage (C) and average peak height (RFUs) (D) of detected alleles performed by PowerPlex® Fusion 6C. The data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.5$ and ** $P < 0.01$ compared the experimental group without inhibitor.

ที่ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit วิเคราะห์ได้เพียงร้อยละ 10.61 นอกจากนั้นชุดตรวจวิเคราะห์ Investigator® 24 plex Go kit มีค่าเฉลี่ยความสูงของพีค มากกว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elwick, K. และคณะ⁽¹⁸⁾ ที่พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอยิ่งลดน้อยลงโอกาสที่จะพบจำนวนรูปแบบของอัลลีลและค่าเฉลี่ยความสูงของพีคจะลดลงเช่นกัน เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Global-File® PCR Amplification และ Investigator®

24plex QS kits อย่างไรก็ตามชุดวิเคราะห์ในงานวิจัยครั้งนี้ ค่าแนะนำของบริษัทผู้ผลิตชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit ระบุว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร⁽¹⁹⁾ แต่บริษัทผู้ผลิตชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit ระบุว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมเท่ากับ 1.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร⁽²⁰⁾ ซึ่งความเข้มข้นตามที่บริษัทแนะนำดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ร้อยละจำนวนอัลลีลและความสูงของพีคได้ตามปกติ และ

ไม่มีผลกระทบต่อการศึกษา PCR แต่อย่างใด แม้ว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit จะพบร้อยละอัลลีลที่ตรวจวิเคราะห์ได้และค่าเฉลี่ยความสูงของพีคลดลงเมื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบจำนวนตำแหน่งทั้งหมดที่สามารถวิเคราะห์ได้จากทั้งสองชุดตรวจดังกล่าว สามารถตรวจได้ทั้งสิ้น 27 ตำแหน่งที่มากกว่าของชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit ที่ตรวจได้เพียง 22 ตำแหน่ง ซึ่งจำนวนตำแหน่งที่มากขึ้นจะช่วยเพิ่มอำนาจในการตรวจสอบและคัดแยกแต่ละบุคคลเมื่อมีการคำนวณทางสถิติ⁽²¹⁾

การตรวจสอบความสมดุลของอัลลีลในผลการวิเคราะห์มีความสำคัญเช่นกัน โดยงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาค่า heterozygous peak balance ซึ่งเป็นอัตราส่วนความสูงของพีคสองพีคที่เป็น homozygous allele ซึ่งกันและกัน ในทางทฤษฎีกระบวนการเพิ่มปริมาณและตรวจสอบลักษณะของดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพ จะพบความสูงของสองพีคที่เป็น heterozygous ดังกล่าวนี้อาจใกล้เคียงกันซึ่งทำให้ค่า heterozygous peak balance เท่ากับ 1 แต่ในทางปฏิบัติค่า heterozygous peak balance ที่ยอมรับได้คือมากกว่า 0.6⁽²²⁾ จากผลการศึกษาพบว่าค่า heterozygous peak balance ของสองชุดตรวจในงานวิจัยนี้มีค่ามากกว่า 0.6 ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอทดสอบ ซึ่งแสดงว่าทั้งสองชุดตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพที่ดีไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรพบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit มีค่า heterozygous peak balance มากกว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าในกรณีตัวอย่างที่มีความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำ ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex

Go kit สามารถตรวจวิเคราะห์ได้และมีความสมดุลของพีค heterozygous อยู่ในช่วงยอมรับได้ ขณะที่การวิเคราะห์ Inter-locus balance ที่เปรียบเทียบความสูงของอัลลีลในแต่ละตำแหน่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอหนึ่งกับตำแหน่งอื่นๆ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกันซึ่งควรมีค่าใกล้เคียงกัน พบว่าค่า inter-locus balance ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit มีค่าน้อยกว่า 0.350 และมีค่าต่ำกว่าการตรวจด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของชุดน้ำยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR ส่วนการพบค่า inter-locus balance ที่สูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้ อาจเนื่องมาจากการทดสอบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยหรือต่ำ เนื่องจากมีการรายงานว่าปริมาณดีเอ็นเอส่งผลต่อความสมดุลของพีค โดยการใช้ดีเอ็นเอในช่วง 62.5-1000 พิโคกรัมส่งผลต่อความไม่สมดุลของพีค⁽²³⁾

จากการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่มักพบความหลากหลายของตัวอย่างส่งตรวจ เช่น ตัวอย่างเลือด ชี้น้ำอสุจิ เส้นผม เล็บ และกระดูกจากศพ ยิ่งกว่านั้นวัตถุพยานที่เกิดจากที่เกิดเหตุส่วนมากจะประกอบไปด้วยดีเอ็นเอปริมาณน้อยและเสื่อมสภาพ รวมทั้งมีการปนเปื้อนสารยับยั้งจากธรรมชาติสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงทดสอบความทนของชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปทั้งสองต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR 3 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ กรดฮิวมิก และเฮมาติน ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบรูปแบบอัลลีลของชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit มีค่าลดลงเมื่อมีตัวยับยั้งปฏิกิริยาแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งมักพบในการตรวจดีเอ็นเอจากกระดูกและรากฟัน เพราะสารดังกล่าวส่งเสริมให้กระดูกแข็งแรง เหนียวแน่น ทนทาน ไม่เปราะง่าย

ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอจากกระดูกจึงมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานานเพื่อกำจัดแคลเซียมออกไป⁽²⁴⁾ อย่างไรก็ตามแคลเซียมที่หลงเหลืออาจมีผลยับยั้งปฏิกิริยา PCR โดยไปขัดขวางการทำงานของแมกนีเซียมมีผลทำให้เอนไซม์ DNA polymerase ทำงานได้ไม่ดีและส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาการสร้างสายดีเอ็นเอคณน้อยลง⁽²⁵⁾ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ที่ 3 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งตรงข้ามกับที่มีรายงานมาก่อนซึ่งรายงานว่าความเข้มข้นของแคลเซียมที่มากกว่า 3 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีผลต่อ AmpliTaq DNA polymerase⁽²⁶⁾

ขณะที่การทดสอบความทนทานต่อกรดฮิวมิค พบว่าทั้งสองชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปมีความทนทานต่อกรดฮิวมิคความเข้มข้น 75 และ 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้ดีไม่แตกต่างกัน แต่ความสูงของพีคที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit มีแนวโน้มลดลง นอกจากนั้นที่ความเข้มข้นของกรดฮิวมิคที่สูงสุดในการศึกษาครั้งนี้ (300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) มีผลต่อกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจรูปแบบดีเอ็นเอของชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กรดฮิวมิคเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในธรรมชาติ เกิดจากการรวมตัวของสารอินทรีย์ โดยกรดฮิวมิคมีส่วนประกอบที่มีหมู่ anionic เช่น partially deprotonated phenolic และ carboxylic groups และเป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็น hydrophobic components (aromatic และ aliphatic moieties)⁽²⁷⁾ การปนเปื้อนกรดฮิวมิคมักพบในตัวอย่างที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แช่หรือเสื่อมสภาพในดินหรือน้ำเป็นระยะเวลา⁽²⁸⁾ โดยมีรายงานว่ากรดฮิวมิคกระบวนการทำงานของ DNA polymerase ในการเข้าจับกับสายแม่แบบดีเอ็นเอ

ปฏิกิริยา PCR นอกจากนั้นกรดฮิวมิคสามารถแขวนลอยในน้ำและรวมตัวเป็นสารประกอบรวมกับไอออนของเหล็กและแคลเซียมที่มีผลต่อปริมาณไอออนในปฏิกิริยาการทำงานของ PCR⁽²⁹⁾ การศึกษาในครั้งนี้พบว่าตรงข้ามกับรายงานที่ผ่านมา ซึ่งพบว่ากรดฮิวมิคที่ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรส่งผลยับยั้งกระบวนการ PCR และการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Identi-filer® และ SGM Plus®⁽³⁰⁾ นอกจากนั้นกรดฮิวมิคความเข้มข้นมากกว่า 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรยังมีผลต่อการลดลงของค่าเฉลี่ยความสูงของพีค และความเข้มข้นของกรดฮิวมิคที่ 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจะไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ โดยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex Fusion⁽³¹⁾ ส่วนการทนทานต่อเฮมาตินพบว่าเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit ความเข้มข้นของเฮมาตินในทุกความเข้มข้นทดสอบมีผลต่อการลดลงของความสูงของพีคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเฮมาตินเป็นสารที่มีความสามารถจับกับโลหะได้ โดยพบในเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งเฮมาตินสามารถเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในระหว่างขั้นตอนการต่อสายดีเอ็นเอ (extension) ทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการ PCR ลดลง⁽²⁵⁾

สรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบความไว ระหว่างชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit และ PowerPlex® Fusion 6C kit ในตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 9948 พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit มีความไวสูงกว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit ที่ความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอ ตั้งแต่

1.0 ถึง 0.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และการเปรียบเทียบความทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR พบว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Gokit สามารถทนทานต่อตัวยับยั้งแคลเซียมคลอไรด์ได้ดีกว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit แต่ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C kit สามารถทนทานต่อเฮมาติน ได้ดีกว่าชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป Investigator® 24 plex Go kit และทั้งสองชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปมีประสิทธิภาพและความไวในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของกรดฮิวมิกได้ดีไม่แตกต่างกัน ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการในการเลือกใช้ชุดตรวจให้ตรงกับวัตถุประสงค์ของงานที่รับผิดชอบและชนิดของสิ่งส่งตรวจของแต่ละห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยในการตรวจวิเคราะห์ให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ บริษัท เอ พลัส เมดิคอล เอนซ์ จำกัด และ ITS (THAILAND) CO., LTD. ที่ให้การสนับสนุนชุดตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หมายเลขทุน Research ID: FOR 2562 06099

เอกสารอ้างอิง

1. Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Invest Genet 2013; 4: 1-10.
2. Stoneking M. DNA and recent human evolution. Evol Anthropol 1993; 2: 60-73.
3. van Oorschot RA, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: a review. Invest Genet 2010; 1:1-14.
4. Saad R, editor. Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. Baylor University Medical Center Proceedings; 2005; USA: Baylor Health Care System.
5. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol 2013; 133: 1-4.
6. Ji Y, Qu C, Cao B. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 2007; 28: 1173-5.
7. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J Clin Lab Anal 2002; 16: 47-51.
8. Panneerchelvam S, Norazmi MN. Forensic DNA profiling and database. MJMS 2003; 10: 20-6.
9. Hares DR. Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. Forensic Sci Int Genet 2015; 17: 33-4.
10. Sidstedt M, Steffen CR, Kiesler KM, Vallone PM, Rådström P, Hedman J. The impact of common PCR inhibitors on forensic MPS analysis. Forensic Sci Int Genet 2019; 40: 182-91.
11. Hu Q, Liu Y, Yi S, Huang D. The effect of six common PCR inhibitors on DNA polymerase and DNA template. IJFP 2014; 2: 61-4.

12. Mattayat D, Kitpipit T, Phetpeng S, Asawutmangkul W, Thanakiatkrai P. Comparative performance of AmpFLSTR[®] Identifiler[®] Plus PCR amplification kit and QIAGEN[®] Investigator[®] IDplex Plus kit. *Sci Justice* 2016; 56: 468-74.
13. Debernardi A, Suzanne E, Formant A, Pène L, Dufour A, Lobry J. One year variability of peak heights, heterozygous balance and inter-locus balance for the DNA positive control of AmpFSTR[®] Identifiler[®] STR kit. *Forensic Sci Int Genet* 2010; 5: 43-9.
14. Gill P, Sparkes R, Kimpton C. Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Sci Int* 1997; 89: 185-97.
15. Cannon C. Assessment of four polymerases for low volume, fast PCR amplification of STR loci for DNA reference samples. *JFSCI*. 2016; 2: 1-11.
16. da Silva R, Sales-Peres A, de Oliveira R, de Oliveira F, Sales-Peres S. Use of DNA technology in forensic dentistry. *J Appl* 2007; 15: 156-61.
17. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem* 2020; 412: 2009-23.
18. Elwick K, Mayes C, Hughes-Stamm S. Comparative sensitivity and inhibitor tolerance of GlobalFiler[®] PCR Amplification and Investigator[®] 24plex QS kits for challenging samples. *Leg Med (Tokyo)* 2018; 32: 31-6.
19. QIAGEN. Investigator 24Plex QS Handbook. In: Qiagen, editor. Germany 2018.
20. Promega. PowerPlex Fusion System for Use on the Applied Biosystems Genetic Analyzers. In: Corporation P, editor. USA 2020.
21. Goodwin W, Ballard D, Simpson K, Thacker C, Syndercombe-Court D, Gow J. Case study: paternity testing—when 21 loci are not enough. *Int Congr Ser* 2004; 1261: 460-2.
22. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation* 2014: 1-585.
23. Wang DY, Chang CW, Lagacé RE, Calandro LM, Hennessy LK. Developmental validation of the AmpFISTR[®] Identifiler[®] Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance. *J Forensic Sci* 2012; 57: 453-65.
24. Elliott WJ, Ram CV. Calcium channel blockers. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2011; 13: 687-9.

25. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci* 2010; 55: 25-33.
26. Abu Al-Soud W, Rådström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3748-53.
27. Olah J. Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. *Aquaculture* 1984; 37: 191-2.
28. Baar C, d'Abbadie M, Vaisman A, *et al.* Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 1-12.
29. Sidstedt M, Jansson L, Nilsson E, *et al.* Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2015; 487: 30-7.
30. Mulero JJ, Chang CW, Lagacé RE, *et al.* Development and validation of the Amp-FISTR MiniFiler PCR Amplification Kit: a MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J Forensic Sci* 2008; 53: 838-52.
31. Sidstedt M, Steffen C, Kiesler K, Vallone P, Rådström P, Hedman J. The impact of common PCR inhibitors on forensic MPS analysis. *Forensic Sci Int Genet* 2019; 40: 182-91.

Comparison of Urine Dipstick and Urine Culture in Diagnosis of Urinary Tract Infection

Putza Chonsawat, Benjamaporn Wongphan*, Jantawan Satayarak and
Asrinda Abdulkanan

*Diagnostic Laboratory, Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University,
Bangkok, Thailand*

Abstract

This study was designed to evaluate the diagnostic accuracy of the rapid urine strip test, nitrite and leukocyte esterase to predict urinary tract infection (UTI) by comparison with the gold standard of urine culture. A total of 492 samples were collected from the patients receiving treatment at the Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand, during the study period of January 2019 to August 2020. It was found that 58.13% were positive with bacterial culture. The prevalence of urinary tract infections in females (65.73%) was higher than that in males (34.27%). Almost all of the detected microorganisms were gram-negative, the *Escherichia coli* (52.21%) was the most frequently isolated, followed by *Klebsiella pneumoniae* (9.18%) and *Enterococcus faecalis* (7.59%), respectively. The sensitivity of nitrite alone and leukocyte esterase alone were 33.64% and 81.12% with the specificity of 97.57% and 71.84%. The combination of nitrite and leukocyte esterase test on the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were 67.18%, 97.99%, 96.70% and 77.25%, respectively. This study indicated that the rapid urine strip test, nitrite and leukocyte esterase, can be used as a screening tool before urine culture for UTI diagnosis. The test also showed a high sensitivity, accurate predictive value, low cost, and easy interpretation suitable for screening of infectious and non-infectious urine.

Keywords: Rapid urine strip test, Urinary tract infection, Nitrite, Leukocyte esterase

*Corresponding author E-mail address: benjamaporn.won@mahidol.ac.th

Received: 16 October 2020

Revised: 10 November 2020

Accepted: 7 January 2021

การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะด้วยแถบทดสอบกับการเพาะเชื้อเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ

พุตรา ชลสวัสดิ์ เบญจมาภรณ์ วงษ์พันธุ์* จันทวรรณ สัตยารักษ์ และ อัสรินดา อับดุลกานาน

งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการใช้แถบตรวจปัสสาวะสำเร็จรูปไนไตรท์ (nitrite; N) และ ลิวโคไซต์เอสเทอเรส (leukocyte esterase; LE) เปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะ ในการวินิจฉัยการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะของผู้ป่วยที่มารับบริการการรักษาที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2563 จำนวนทั้งหมด 492 ตัวอย่าง ซึ่งผลการเพาะเชื้อในปัสสาวะ พบเชื้อจุลชีพ ร้อยละ 58.13 พบความชุกของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในเพศหญิง (ร้อยละ 65.73) สูงกว่าในเพศชาย (ร้อยละ 34.27) เชื้อจุลชีพที่พบเกือบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ซึ่งเชื้อที่พบมากที่สุดได้แก่ *Escherichia coli* (ร้อยละ 52.21) รองลงมาได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* (ร้อยละ 9.18) และ *Enterococcus faecalis* (ร้อยละ 7.59) ตามลำดับ จากผลการตรวจตัวอย่างปัสสาวะด้วยแถบทดสอบสำเร็จรูปไนไตรท์ (N) และ ลิวโคไซต์เอสเทอเรส (LE) พบว่ามีค่าความไวร้อยละ 33.64 และ 81.12 ตามลำดับ และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 97.57 และ 71.84 ตามลำดับ และเมื่อนำผลการทดสอบทั้งสองชนิดประกอบกันพบว่าจะได้ค่าความไว ความจำเพาะ การทำนายผลบวก และการทำนายผลลบ เป็นร้อยละ 67.18, 97.99, 96.70 และ 77.25 ตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้แถบทดสอบสำเร็จรูปไนไตรท์ และ ลิวโคไซต์เอสเทอเรสรวมกันสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจคัดกรองการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะก่อนการส่งเพาะเชื้อได้ แถบทดสอบสำเร็จรูปมีความไวและการทำนายผลลบสูง และยังเป็นวิธีที่สะดวก ทำงานง่าย ราคาถูก ตรวจสอบและอ่านผลได้ในทันที สามารถนำมาใช้ตรวจขั้นต้นเพื่อแยกปัสสาวะที่มีและไม่มีเชื้อออกจากกันได้

คำสำคัญ: แถบตรวจปัสสาวะสำเร็จรูป ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ไนไตรท์ ลิวโคไซต์เอสเทอเรส

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: benjamaporn.won@mahidol.ac.th

รับบทความ: 16 ตุลาคม 2563

แก้ไขบทความ: 10 พฤศจิกายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 7 มกราคม 2564

บทนำ

การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection; UTI) เป็นโรคที่เกิดจากอวัยวะในระบบทางเดินปัสสาวะซึ่งได้แก่ ไต ท่อไต กระเพาะปัสสาวะ และท่อปัสสาวะ เกิดการอักเสบจากการติดเชื้อ⁽¹⁾ จากการศึกษาของ Khazaei และคณะในประเทศอิหร่านพบการรายงานอุบัติการณ์การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะสูงเป็นอันดับต้นของการติดเชื้อในโรงพยาบาล⁽²⁾ ส่วน Bency และคณะ ในปี พ.ศ. 2556 ที่ประเทศอินเดีย พบว่าผู้หญิงมีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะสูงถึงร้อยละ 63.3 ส่วนในเพศชายพบเพียงร้อยละ 36.7⁽³⁾ โดยเกือบทั้งหมดเป็นการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจากการศึกษาของ Vranic และคณะ ในปี พ.ศ. 2558 พบว่าการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะมักพบการติดเชื้อ *Escherichia coli* บ่อยที่สุดประมาณร้อยละ 67.21 รองลงมาเป็น *Proteus spp.*, *Enterococcus faecalis* และ *Enterobacter*⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาล โดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือผู้ป่วยที่มีการอุดตันของทางเดินปัสสาวะ และยังเป็นสาเหตุสำคัญที่สุดของการติดเชื้อในกระแสเลือดในผู้สูงอายุ⁽⁵⁾ โดยการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ สามารถแบ่งได้เป็นแบบที่มีอาการแสดง (symptomatic UTI) โดยมักมีไข้ หนาวสั่น ซึ่งแพทย์จะสามารถตรวจและวินิจฉัยได้ และการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะแบบไม่มีอาการ (asymptomatic bacteriuria)⁽⁶⁾ ซึ่งมักไม่มีไข้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเชื้อในปัสสาวะ (urine culture) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ $> 10^5$ โคโลนีต่อหน่วยปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร (CFU/mL) โดยการเก็บปัสสาวะจากการสวนปัสสาวะแบบสะอาดถือว่าเป็นจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีนัยสำคัญ บ่งชี้การติดเชื้อ

ในทางเดินปัสสาวะไม่ว่าผู้ป่วยจะมีหรือไม่มีอาการ ดังนั้นการวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ และการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อได้ ซึ่งในปัจจุบันวิธีที่ถือเป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ คือการเพาะเชื้อจากตัวอย่างปัสสาวะ อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวมีราคาแพง ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญเฉพาะทางและต้องใช้เวลารอผลการตรวจวิเคราะห์อย่างน้อย 24-48 ชั่วโมง ปัจจุบันได้มีการพัฒนาแถบทดสอบสารเคมีในปัสสาวะ (dipstick test) ซึ่งส่วนใหญ่ทำจากเซลลูโลสโดยที่บริเวณรูเล็ก ๆ ตอนปลายของแถบชุบด้วยสารเคมีซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ผิดปกติในปัสสาวะ ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการตรวจ⁽⁷⁾ วิธีนี้สามารถตรวจได้สะดวก รวดเร็ว มีความไวและความน่าเชื่อถือสูง แต่การใช้แถบทดสอบในการตรวจมีข้อควรระวังคือต้องเก็บรักษาแถบทดสอบไม่ให้ถูกความชื้น ควรตรวจปัสสาวะทันทีที่ได้รับตัวอย่าง และไม่ควรตรวจปัสสาวะที่เก็บมานานเกิน 2 ชั่วโมง รวมทั้งการอ่านผลภายในระยะเวลาที่กำหนดก็จะช่วยให้การตรวจมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของผลการตรวจปัสสาวะโดยใช้แถบทดสอบไนไตรท์ (N) และ ลิวโคซัยท์เอสเทอเรส (LE) เปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะ ในด้านความไวและความจำเพาะ โดยใช้ผลการเพาะเชื้อเป็นเกณฑ์มาตรฐาน และนำผลการศึกษาที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนเพื่อลดการส่งตรวจเพาะเชื้อจากปัสสาวะในรายที่ไม่จำเป็น เนื่องจากการใช้แถบทดสอบทำได้สะดวก รวดเร็วและมีราคาถูกกว่าการเพาะเชื้อ

วัสดุและวิธีการ

การพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน

โครงการวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในคน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ TMEC 18-065

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างคือผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งแพทย์ส่งตรวจเพาะเชื้อแบคทีเรียจากปัสสาวะ โดยไม่จำกัดเพศและอายุ ดำเนินการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2563 จำนวนรวม 492 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะเก็บจากผู้ป่วยที่มารับบริการทั้งแผนกผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอก และเพื่อป้องกันการปนเปื้อน (contamination) จึงให้กลุ่มตัวอย่างทำความสะอาดอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกด้วยน้ำสะอาดและถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้ง จากนั้นเก็บปัสสาวะส่วนกลาง (mid-stream) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ภาชนะปลอดเชื้อ (Labmaster, Thailand) แล้วส่งตัวอย่างมาที่งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูง โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

การตรวจปัสสาวะด้วยวิธีการเพาะเชื้อ

จุ่ม sterile calibrate loop ขนาด 10 ไมโครลิตร (SterileRight®, Taiwan) ลงในตัวอย่างปัสสาวะ แล้วนำไปจีดเพาะเชื้อ (streak plate) เพื่อหาจำนวนและชนิดของเชื้อใน blood agar (Scharlua, Thailand) และ Mac Conkey agar

(Scharlua, Thailand) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อแต่ละชนิดที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คูณด้วย 1000 เพื่อรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อหน่วยปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร (CFU/mL) เชื้อแบคทีเรียที่พบในปริมาณสูง (มากกว่า 10^3) นำไปแยกชนิดเชื้อ (identify) ต่อ โดยการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) จนทราบชนิด (species) ของเชื้อ

การตรวจปัสสาวะทางเคมีด้วยการใช้แถบทดสอบ (strip test)

นำตัวอย่างปัสสาวะที่ส่งตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อแล้วมาตรวจด้วยแถบทดสอบทันที โดยเทปัสสาวะลงในหลอดทดลองพลาสติกกันแหลม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะอัตโนมัติ (Sysmex UX-2000, Germany)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการเพาะเชื้อกับผลการตรวจในไตรท์/ลิวโคซัยท์เอสเทอร์ส มาคำนวณหาค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), ค่า positive predictive value (PPV) และค่า negative predictive value (NPV) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

การศึกษาความไว

$$\% \text{ sensitivity} = \frac{\text{TP} \times 100}{\text{TP} + \text{FN}}$$

การศึกษาความจำเพาะ

$$\% \text{ specificity} = \frac{\text{TN} \times 100}{\text{TN} + \text{FP}}$$

positive predictive value (PPV)

$$\% \text{ PPV} = \frac{\text{TP} \times 100}{\text{TP} + \text{FP}}$$

negative predictive value (NPV)

$$\% \text{ NPV} = \frac{\text{TN} \times 100}{\text{TN} + \text{FN}}$$

TP = true positive, FN = false negative,

TN = true negative, FP = false positive

ผลการวิจัย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของผลตรวจด้วยแถบทดสอบไนไตรท์ (N) และลิวโคซัยท์เอสเทอเรส (LE) เปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะของผู้ป่วยที่มาการรักษาที่โรงพยาบาลจำนวนทั้งหมด 492 ตัวอย่าง พบว่า

1. ผลการเพาะเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย 492 ราย พบเชื้อจุลินทรีย์ 286 ราย (ร้อยละ 58.13) ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ 206 ราย (ร้อยละ 41.87) เป็นชาย 98 ราย (ร้อยละ 34.27) หญิง 188 ราย (ร้อยละ 65.7) (Fig. 1) เชื้อจุลินทรีย์

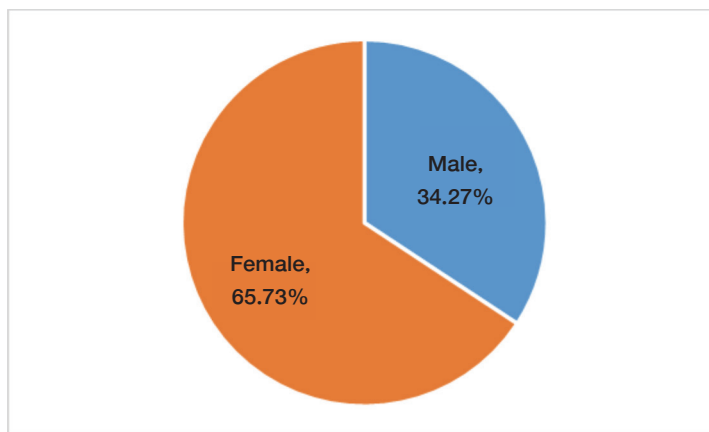


Fig. 1 Distribution of patient with positive culture

ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (ร้อยละ 80.38) เชื้อที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Escherichia coli* (ร้อยละ 52.21) รองลงมา ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* (ร้อยละ 9.18) และ *Enterococcus faecalis* (ร้อยละ 7.59) (Table 1)

2. ผลการตรวจปัสสาวะด้วยแถบทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อ พบว่าแถบทดสอบ LE ให้ผลตรวจที่เป็นบวกตรงกับผลเพาะเชื้อ

มากที่สุด 232 ราย (ร้อยละ 81.12) ส่วนแถบทดสอบ N ให้ผลเป็นบวก 99 ราย (ร้อยละ 34.62) และผลแถบทดสอบ LE และ N ให้ผลบวกทั้งคู่ 88 ราย (ร้อยละ 30.77) การเพาะเชื้อให้ผลบวกแต่แถบทดสอบ LE ให้ผลลบ 54 ราย (ร้อยละ 18.88) และแถบทดสอบ N ให้ผลลบ 187 ราย (ร้อยละ 65.38) ส่วนในรายที่การเพาะเชื้อให้ผลลบ แต่แถบทดสอบ LE ให้ผลบวก 58 ราย (ร้อยละ 28.16) และแถบ

Table 1 Distribution of Bacteria isolated form Culture Positive Patient

Organisms	Male (%)	Female (%)	Total no. of isolates
<i>Escherichia coli</i> (ESBL producing stain)	28 (24.78%)	61 (30.05%)	89 (28.16%)
<i>Escherichia coli</i>	16 (14.16%)	60 (29.56%)	76 (24.05%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9 (7.96%)	9 (4.43%)	18 (5.70%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ESBL producing stain)	2 (1.77%)	9 (4.43%)	11 (3.48%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	9 (7.97%)	15 (7.39%)	24 (7.59%)
<i>Proteus mirabilis</i>	11 (9.74%)	10 (4.93%)	21 (6.65%)
<i>Proteus mirabilis</i> (ESBL producing stain)	1 (8.62%)	1 (0.49%)	2 (0.63%)
Yeast	7 (6.19%)	15 (7.39%)	22 (6.96%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (8.85%)	9 (2.46%)	15 (4.75%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6 (5.31%)	2 (0.99%)	8 (2.53%)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Gr.B)	4 (3.64%)	1 (0.49%)	5 (1.58%)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (0.88%)	3 (1.48%)	4 (1.27%)
<i>Morganella morganii</i>	0 (0%)	4 (1.97%)	4 (1.27%)
<i>Providencia rettgeri</i>	3 (2.66%)	0 (0%)	3 (0.95%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0.89%)	2 (0.99%)	3 (0.95%)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0 (0%)	2 (0.99%)	2 (0.63%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0 (0%)	2 (0.99%)	2 (0.63%)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	2 (1.77%)	0 (0%)	2 (0.63%)
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0 (0%)	1 (0.49%)	1 (0.32%)
<i>Citrobacter diversus</i>	1 (0.89%)	0 (0%)	1 (0.32%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 (0%)	1 (0.49%)	1 (0.32%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (0.89%)	0 (0%)	1 (0.32%)
<i>Viridans Streptococci</i>	1 (0.89%)	0 (0%)	1 (0.32%)
Total	113	203	316

ทดสอบ N ให้ผลบวก 5 ราย (ร้อยละ 2.43) (Table 2)

3. ผลการตรวจปัสสาวะด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าความไวและความจำเพาะ จากผลการตรวจด้วยแถบทดสอบ N และ LE ร่วมกัน และคำนวณหาค่าความไว และความจำเพาะ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อพบว่า แถบทดสอบ N มีความไว และความจำเพาะ ร้อยละ 33.64 และ 97.57 ตามลำดับ ส่วนแถบทดสอบ LE มีความไว และความจำเพาะ ร้อยละ 81.12 และ 71.84 ตามลำดับ และเมื่อใช้ผลจาก 2 แถบทดสอบ N และ LE ร่วมกันให้ผลความไวและความจำเพาะคิดเป็นร้อยละ 67.18 และ 97.99 ตามลำดับ (Table 3)

4. ผลการคำนวณค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ จากผลการศึกษาค่าการทำนายผลบวกของผลการตรวจ N และ LE คือร้อยละ 95.19 และ 80.00 ตามลำดับ และค่าการทำนายผลลบ คือ ร้อยละ 51.80 และ 73.27 ตามลำดับ และเมื่อใช้ผลจาก 2 การทดสอบคือผล LE และ N ร่วมกันพบว่า

ค่าการทำนายผลบวกคิดเป็นร้อยละ 96.70 และค่าการทำนายผลลบคิดเป็น ร้อยละ 77.25 (Table 3)

วิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาค้นนี้พบความชุกของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในเพศหญิง (ร้อยละ 65.73) สูงกว่าในเพศชาย (ร้อยละ 34.27) สอดคล้องกับรายงานของ Bency และคณะ ในปี พ.ศ. 2556 ที่ประเทศอินเดีย⁽³⁾ และ Parveen และ Rahim ในปี พ.ศ. 2560 ที่ประเทศบังกลาเทศ⁽⁸⁾ ด้วยลักษณะทางกายภาพของเพศหญิงที่มีท่อปัสสาวะ (ความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 4 เซนติเมตร) สั้นกว่าของเพศชาย (ความยาวโดยประมาณ 20 เซนติเมตร)⁽⁹⁾ และอยู่ใกล้ทวารหนัก ทำให้มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโรคและติดเชื้อได้ง่ายจากช่องคลอด อูจาระ และจากการมีเพศสัมพันธ์ เชื้อจุลินทรีย์ที่พบมีความชุกมากที่สุดคือ *E. coli* (ร้อยละ 52.05) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ralukrudej ในปี พ.ศ. 2554 ที่ประเทศไทย⁽¹⁰⁾

Table 2 Urine dipstick in comparison with urine culture

Dipstick tests	Culture (%)	
	Positive	Negative
Nitrite (N)		
Positive	99 (34.62)	5 (2.43)
Negative	187(65.38)	201 (97.57)
Leukocyte esterase (LE)		
Positive	232 (81.12)	58 (28.16)
Negative	54 (18.88)	148 (71.84)
Nitrite (N) and Leukocyte esterase (LE)		
Positive	88 (30.77)	3 (1.46)
Negative	43 (15.03)	146 (70.87)

Table 3 Performance characteristics of dipstick

	Nitrite (N)	Leukocyte esterase (LE)	Nitrite (N) & Leukocyte esterase (LE)
True positive (TP)	99	232	88
False negative (FN)	187	54	43
True negative (TN)	201	148	146
False positive (FP)	5	58	3
Sensitivity	34.62	81.12	67.18
Specificity	97.57	71.84	97.99
Positive predictive value (PPV)	95.19	80.00	96.70
Negative predictive value (NPV)	51.80	73.27	77.25

Bency และคณะในปี พ.ศ. 2556 ที่ประเทศอินเดีย⁽²⁾ และผลการศึกษาของ Setu และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 ที่ประเทศบังกลาเทศ⁽¹¹⁾

จากผลการศึกษาแถบทดสอบสำเร็จรูป ไนไตรท์ มีค่าความไวร้อยละ 33.64 ค่าความจำเพาะร้อยละ 97.57 ซึ่งการตรวจไนไตรท์ ในปัสสาวะจะให้ผลบวกในกรณีที่ปัสสาวะเป็นเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุส่วนใหญ่เป็นเชื้อแกรมลบ โดยเชื้อที่พบบ่อยคือ *E. coli* ซึ่งสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้^(14, 15) จากผลการศึกษาพบว่าไนไตรท์ มีค่าความไวต่ำ แต่มีความจำเพาะสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ralukrudej ในปีพ.ศ. 2554⁽¹⁰⁾ ผลการศึกษาของ Marques และคณะในปี พ.ศ. 2557⁽¹²⁾ และ Fernades และคณะในปีพ.ศ. 2560⁽¹³⁾ ซึ่งอาจเป็นเพราะเกิดผลลบลงเนื่องจากปัสสาวะของผู้ป่วยค้างอยู่ในกระเพาะปัสสาวะไม่ถึง 4 ชั่วโมง ทำให้แบคทีเรียเกิดปฏิกิริยาไม่เต็มที่ไม่นานพอที่จะเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ หรือหากทิ้งปัสสาวะไว้นานเกิน 4 ชั่วโมงจะทำให้แบคทีเรียในตระกูล non-fermentative gram negative bacilli บางชนิดเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ และเป็นไนโตรเจนได้อย่าง

สมบูรณ์ทำให้ตรวจไม่พบไนไตรท์ นอกจากนี้ยังพบว่าหากผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพจะทำให้เอนไซม์ที่มีอยู่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ หรือปัสสาวะมีสีเข้มและมีพีเอชต่ำกว่า 6 ซึ่งทำให้ความไวในการทดสอบลดลง ในกรณีพบเชื้อ *Enterococci* spp., *Staphylococci* spp. และยีสต์ ไนไตรท์จะให้ผลลบเพราะเชื้อเหล่านี้ไม่มีเอนไซม์เปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ ส่วนผลบวกปลอมมักเกิดจากผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีไนเตรทมากเกินไป หรือเก็บปัสสาวะไม่ถูกต้องมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย^(14, 15)

จากผลการศึกษาแถบทดสอบสำเร็จรูป ลิโคชียท์เอสเทอเรส พบมีค่าความไวร้อยละ 81.12 และค่าความจำเพาะร้อยละ 71.84 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marques และคณะใน พ.ศ. 2557¹² ถึงแม้ลิโคชียท์เอสเทอเรสจะมีค่าความจำเพาะสูงแต่ยังน้อยกว่าไนไตรท์ อาจเป็นเพราะมีผลลบลงซึ่งอาจเกิดจากไนเตรทในปัสสาวะมีกลูโคสมากกว่า 3 กรัมต่อเดซิลิตร ปัสสาวะมีความถ่วงจำเพาะสูง มีระดับอัลบูมินมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ได้รับยาปฏิชีวนะ เช่น เซฟาเล็กซิน เตตราไซคลิน และ กรดออกซาลิก

หรือผู้ป่วยอาจมีเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นที่ไม่ใช่แกรนูโลซัยท์ ทำให้ไม่สามารถตรวจหาเอนไซม์ได้ ในกรณีที่เกิดผลบวกปลอม พบได้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคอื่นนอกเหนือจากโรคติดเชื้อ เช่น โรคไต หรืออาจมีผงซักฟอกที่ปนเปื้อนมากับภาชนะเก็บปัสสาวะ

นอกจากนี้เมื่อนำผลการทดสอบทั้งสองชนิดประกอบกันพบว่าจะได้ค่าความไว ความจำเพาะ การทำนายผลบวกและการทำนายผลลบสูงขึ้น คือ ร้อยละ 67.18, 97.99, 96.70 และ 77.25 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Marques และคณะใน พ.ศ. 2557⁽¹²⁾ และ Hataysal และคณะใน พ.ศ. 2556⁽¹⁶⁾ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การพิจารณาใช้ผลการทดสอบทั้ง 2 ชนิดประกอบกันมีความไวที่ไม่สูงมาก แต่ค่าความจำเพาะ และค่าการทำนายผลบวกค่อนข้างสูง (ร้อยละ 97.99 และ 96.70) ดังนั้นแถบทดสอบสำเร็จรูปจึงสามารถนำมาช่วยคัดกรองการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะได้ดีในระดับหนึ่ง และแนะนำให้ประเมินผลการตรวจปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์อีกทางหนึ่ง เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามหากผลการตรวจพบความผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่งในสองรายการนี้ควรส่งทำการเพาะเชื้อต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาแถบทดสอบสำเร็จรูปในไตรท์ และลิวโคซัยท์เอสเทอเรส สามารถนำมาใช้ในการช่วยคัดกรองการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวกในการใช้สำหรับห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนในการทำงาน ราคาถูก ตรวจและอ่านผลได้ในทันที ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจขั้นต้นในการแยกปัสสาวะที่มีเชื้อแบคทีเรียและไม่มีเชื้อแบคทีเรียออกจากกันได้ใช้เป็นแนวทางที่แพทย์สามารถเลือกส่งตรวจเพาะเชื้อในรายที่เหมาะสม

เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ในรายที่แพทย์สงสัยก็สามารถตรวจซ้ำ และได้ผลในเวลารวดเร็ว แต่พบว่าการตรวจด้วยแถบทดสอบสำเร็จรูปมีข้อจำกัดในเรื่อง ความไวและการทำนายผลลบค่อนข้างต่ำ ซึ่งในรายที่แพทย์สงสัยก็ควรใช้วิธีเพาะเชื้อมาตรฐานเป็นสิ่งที่ตัดสินใจให้แน่ชัดอีกครั้ง

โดยรวม ลิวโคซัยท์เอสเทอเรสเป็น screening test เบื้องต้นที่จะตรวจหาสารซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็นเม็ดเลือดขาว ส่วนในไตรท์นั้น หากได้ผลเป็นบวกสามารถบอกการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ น่าจะเกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ทั้งนี้หากการติดเชื้อเกิดจากสาเหตุอื่นๆ เช่น เชื้อรา หรือเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) การเพาะเชื้อจะยังคงมีความสำคัญอยู่ เพราะแพทย์จะได้ให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่ถูกต้อง การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะนั้น เชื้อก่อโรคที่สำคัญส่วนใหญ่มักจะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา พบเป็นสาเหตุได้บ้างแต่อุบัติการณ์ต่ำ โดยสรุปรายงานการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาห้องปฏิบัติการต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเวชศาสตร์เขตร้อนที่ได้สนับสนุนทุนส่งเสริมการวิจัย คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ปีงบประมาณ 2561 ประเภท “ทุนวิจัยสำหรับโครงการวิจัยที่พัฒนางานประจำไปสู่การวิจัย (R2R)” เพื่อนำมาพัฒนางานประจำของงานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูง โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน และขอขอบคุณนักเทคนิคการแพทย์และเจ้าหน้าที่ งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงทุกท่าน ที่สนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Yimsiri B, Sirimongkolsakul S, Tantirat K. Urine analysis. Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, 1990. (in Thai)
2. Khazaei S, Khazaei S, Ayubi E. Importance of prevention and control of nosocomial infections in Iran. *Iran J Public Health* 2018; 47: 307-8.
3. Bency JAT, Priyanka R, Jose P. A study on the bacteriological profile of urinary tract infection in adults and their antibiotic sensitivity pattern in a tertiary care hospital in central Kerala. *Int J Res Med Sci* 2017; 5: 666-9.
4. Vranic SM, Zatric N, Rebic V, Aljicevic M, Abdulzaimovic A. The most frequent isolates from outpatients with urinary tract Infection. *Materia Socio-Medica* 2017; 29: 17-20.
5. Chang R, Greene MT, Chenoweth CE, *et al.* Epidemiology of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32: 1127-9.
6. Schnarr J, Smaill F. Asymptomatic bacteriuria, and symptomatic urinary tract infections in pregnancy. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 50-7.
7. Chupunya K. Urine Examination Manual, Textbook. Project - Siriraj Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University, Bangkok, 1985. (in Thai)
8. Parveen R, Rahim I. Study of bacterial pathogens in urinary tract infection and their antimicrobial sensitivity pattern. *Bangladesh J Infect Dis* 2017; 4: 40-4.
9. Mangera A, Patel AK, Chapple CR. Anatomy of the lower urinary tract. *Basic science volume 25, Issue 7, P307-13*, 2010.
10. Ralukrudej S. Evaluation of urine strip test for the diagnosis of urinary tract infection at Police General Hospital. *Chiang Mai Assoc Med Sci* 2009; 44: 106-9. (in Thai)
11. Setu SK, Sattar ANI, Saleh AA, *et al.* Study of bacterial pathogens in urinary tract infection and their antibiotic resistance profile in a tertiary care hospital of Bangladesh. *Bangladesh J Med Microbiol* 2016; 10: 22-6.
12. Marques AG, Doi AM, Pasternak J, Damascena MS, França C, Martino M. Performance of the dipstick screening test as a predictor of negative urine culture. *Einstein (Sao Paulo)* 2017; 15: 34-9.
13. Fernandes DJ, Devdas JM, Castelino DN. Utility of dipstick test (nitrite and leukocyte esterase) and microscopic analysis of urine when compared to culture in the diagnosis of urinary tract infection in children. *Int J Contemp Pediatr* 2018; 5: 156-60.
14. Lebnark T. Urinalysis and body fluids. Bangkok: Samcharoen Phanich (Bangkok) Co., Ltd; 1991. (in Thai)

15. Preechasuchakul B, Sukopokvech A. Urinalysis and body fluids, Bangkok: Department of Clinical Microscopy. Faculty of Medical Technology Mahidol University, 2000. (in Thai)
16. Hataysal EP, Saracligil B, Dagi HT, Vatansev H. How accurate is the urine dipstick test for diagnosing urinary tract infection? Eur Res J 2019; 5: 613-7.



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Suggestion for Authors

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

นโยบายการรับพิจารณาบทความ

วารสารเทคนิคการแพทย์ เป็นวารสารทางวิชาการของสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

มีวัตถุประสงค์เพื่อส่งเสริมการเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ และผลงานวิจัยโดยมีหลักเกณฑ์การพิจารณาบทความดังนี้

1. เป็นบทความด้านเทคนิคการแพทย์ (สาขาเคมีคลินิก สาขาจุลชีววิทยาคลินิก สาขาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก สาขาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ สาขาโลหิตวิทยา สาขาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด) วิทยาศาสตร์การแพทย์ และสาขาวิชาอื่นที่เกี่ยวข้องกับงานทางห้องปฏิบัติการทางคลินิก

2. บทความต้องไม่เคยนำไปเผยแพร่ในวารสารฉบับอื่นมาก่อน และไม่อยู่ระหว่างการพิจารณาในวารสารใดๆ

3. บทความจะต้องมีการอ่านตรวจทานต้นฉบับ จากคณะกรรมการหรือผู้ทรงคุณวุฒิเฉพาะสาขาจากภายนอกอย่างน้อย 2 ท่าน ทั้งนี้เพื่อให้วารสารมีคุณภาพในระดับมาตรฐานสากลและนำไปอ้างอิงได้

4. บทความที่ดีพิมพ์ลงในวารสารเทคนิคการแพทย์แล้วถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

5. ข้อเขียนและข้อคิดเห็นใดๆ ในวารสารนี้เป็นความคิดเห็นส่วนตัว และเป็นความรับผิดชอบของ

ผู้เขียนทั้งสิ้น ไม่ใช้ความเห็นของคณะกรรมการวารสารเทคนิคการแพทย์ และสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

6. การถอนบทความระหว่างขั้นตอนการพิจารณาโดยไม่มีเหตุผลสมควร กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ได้รับพิจารณาตีพิมพ์บทความครั้งต่อไปเป็นระยะเวลา 2 ปี

7. บทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ รายงานกรณีศึกษา และบทความวิจัยอย่างสั้น ผู้นิพนธ์ต้องแนบหนังสือรับรองที่ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน (Ethic committee)

8. บทความที่ดีพิมพ์ในวารสาร ผู้เขียนตั้งคำถามให้ผู้อ่านตอบแบบทดสอบ ลักษณะคำถามเป็นปรนัย มี 4 ตัวเลือก จำนวน 5 ข้อ หรือ 10 ข้อ ตอบบทความแล้วแต่กรณี โดยผู้เขียนและผู้อ่านที่ตอบแบบสอบถามถูกต้องทุกข้อจะได้หน่วยคะแนน ในกิจกรรมประเภทที่ 4 กิจกรรมชนิดที่ 16 การศึกษาด้วยตนเองผ่านสื่อสำเร็จรูป และผู้เขียนจะได้หน่วยคะแนน จากกิจกรรมประเภทที่ 5 กิจกรรมชนิดที่ 25 การตีพิมพ์ผลงานวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ในวารสารวิชาการ จากศูนย์การศึกษาต่อเนื่องเทคนิคการแพทย์ สภาเทคนิคการแพทย์ ดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่เว็บไซต์ www.mtcouncil.org หรือ www.cmtethai.net

ประเภทของบทความ แบ่งออกเป็น 9 ประเภท คือ

1. บทบรรณาธิการ (Editorials) เป็นบทความซึ่งวิเคราะห์ผลงานทางเวชศาสตร์การแพทย์ที่มีความสำคัญในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ หรือ

วิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง หรืออาจจะเป็นข้อคิดเห็นเพื่อประโยชน์ในด้านการยกระดับวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ให้สูงขึ้น

2. บทความปริทัศน์ (Review Article)

เป็นบทความเพื่อฟื้นฟูวิชาการซึ่งรวบรวมผลงานเกี่ยวกับเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ที่เคยลงตีพิมพ์ในวารสารอื่นมาแล้วโดยนำเรื่องมาวิเคราะห์ วิวิจารณ์ และเปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างแก่ผู้อ่านเกี่ยวกับเรื่องนั้น

3. นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Article)

เป็นรายงานเกี่ยวกับผลการวิจัยทางด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้องโดยไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน

4. บทความพิเศษ (Special Article)

เป็นบทความเกี่ยวกับเรื่องทั่วๆ ไปที่มีเนื้อหาและสาระที่เป็นประโยชน์และสร้างสรรค์ เพื่อพัฒนาผู้อ่านวารสารทุกระดับให้ได้รับความรู้ เพื่อนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น เรื่องเกี่ยวกับหลักธรรมะ ศิลปะการพูด ฯลฯ

5. รายงานการประชุมวิชาการ (Seminar Report) เป็นรายงานจากการประชุมสัมมนาวิชาการที่เป็นประโยชน์แก่ผู้อ่านวารสารเทคนิคการแพทย์

6. รายงานกรณีศึกษา (Case Report)

เป็นรายงานเกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยรายที่น่าสนใจทั้งทางด้านประวัติผลการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการคลินิกร่วมกัน

7. บทความวิจัยอย่างสั้น (Short Communication) เป็นบทความวิจัยฉบับย่อ เป็นรูปแบบการรายงานการศึกษาแบบกระชับ อันเนื่องมาจากข้อจำกัดของการศึกษา แต่มีความสมบูรณ์ในเนื้อหาที่น่าสนใจ รูปแบบที่เขียนเป็นลักษณะคล้ายนิพนธ์ต้นฉบับ แต่จะสั้นและกระชับกว่า

8. จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to the Editor) เป็นบทความซึ่งเสนอข้อคิดเห็นและประสบการณ์ทางด้านวิชาการที่เกี่ยวข้องกับงานในสาขาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์อย่างสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ

9. ย่อวารสาร (Abstract Review) เป็นการย่อบทความทางวิชาการด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องและน่าสนใจ ซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสารนานาชาติ เป็นภาษาไทย

การเตรียมต้นฉบับ

เพื่อให้การตีพิมพ์บทความเป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็ว ผู้นิพนธ์จะต้องปฏิบัติตามรายละเอียด ดังนี้

1. ภาษา ให้ใช้ได้ 2 ภาษาคือภาษาไทย และ/หรือภาษาอังกฤษ ถ้าต้นฉบับเป็นภาษาไทยควรพยายามใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยมากที่สุด โดยใช้ตามพจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทย และพจนานุกรมศัพท์วิทยาศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน สำหรับคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้กำกับภาษาเดิม (อังกฤษ) ในวงเล็บ หรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

2. ต้นฉบับ พิมพ์ด้วยโปรแกรม Word for Windows ด้วยอักษร Cordia New ขนาด 14 และพิมพ์เลขหน้าที่ต้องกลางขอบล่างของทุกหน้า โดยไม่ต้องพิมพ์ชื่อสกุลผู้นิพนธ์ในต้นฉบับ

ส่งต้นฉบับของบทความหรือบทความต่างๆ ทางเว็บไซต์ของวารสารฯ <http://www.jmt-amtt.com>

3. ชื่อเรื่อง ชื่อผู้นิพนธ์ ชื่อหน่วยงานและสถาบันให้แยกไฟล์ต่างหาก

3.1 ชื่อเรื่อง มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ ซึ่งควรให้สั้นแต่ได้ใจความ ไม่ควรใช้คำย่อในเรื่อง ยกเว้นคำที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป เช่น NADH ความยาวของชื่อเรื่องควรมีความชัดเจน สามารถบ่งบอกผู้อ่านให้ทราบถึงสาระสำคัญของเนื้อหาและรายละเอียดในตัวบทความ

3.2 ชื่อผู้นิพนธ์ ให้เขียนชื่อต้นและนามสกุลตัวเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุปริญญา ตำแหน่งทางวิชาการ หรือ ตำแหน่งทางราชการ ในกรณีที่มีผู้แต่งหลายคน ระบุชื่อผู้รับผิดชอบบทความและ E-mail address ที่สามารถติดต่อได้

3.3 ชื่อหน่วยงานและสถาบันระบุสถานที่ และ E-mail address ของผู้พิมพ์ทุกคนที่สามารถติดต่อได้

4. รายละเอียดของนิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้นให้เรียงหัวข้อ ตามลำดับต่อไปนี้

1) บทคัดย่อ (Abstract) มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำ
2) คำสำคัญ (keywords) มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ จำนวน 3-5 คำ) บทนำ (introduction) ประกอบด้วยเหตุผลและวัตถุประสงค์ ในการวิจัย
4) วัสดุและวิธีการ (materials and methods) รายละเอียดของเครื่องมือและน้ำยา รวมทั้งขั้นตอนที่สำคัญควรระบุให้ชัดเจน 5) ผลการวิจัย (results) เขียนใจความสั้นและชัดเจน อาจใช้ตารางหรือภาพประกอบคำอธิบาย คำอธิบายภาพและตาราง ให้เป็นภาษาอังกฤษ 6) วิจัย (discussion) 7) สรุป (conclusion) 8) กิตติกรรมประกาศ (acknowledgements) 9) เอกสารอ้างอิง (references) ให้เรียงลำดับเลขตามทีปรากฏก่อนหลังในเนื้อเรื่อง

5. ตาราง แผนภูมิ ภาพประกอบ ให้แยกไว้ท้ายบทความโดยใช้หนึ่งหน้าต่อหนึ่งตาราง หรือหนึ่งแผนภูมิ สำหรับภาพเป็นระบบอิเล็กทรอนิกส์ให้บันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif สำหรับข้อความและคำอธิบายในตารางและภาพให้เป็นภาษาอังกฤษ

6. การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ตามระบบ Vancouver ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ถ้ามาจากเอกสารภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อผู้พิมพ์เป็นภาษาอังกฤษ เขียนชื่อสกุลตัวเต็ม นำหน้าตามด้วยอักษรย่อของชื่อต้น

2. ถ้ามาจากเอกสารภาษาไทย ให้แปลเป็นภาษาอังกฤษและต่อท้ายด้วย (in Thai)

3. ถ้ามาจากภาษาอื่นให้แปลเป็นภาษาอังกฤษ และให้วงเล็บภาษาเดิมไว้ตอนท้าย

4. ปีที่อ้างอิงเป็นแบบ ค.ศ.

5. การอ้างอิงเอกสารให้ใช้ชื่อย่อของวารสารที่นำมาอ้างอิงตามแบบของ Index Medicus ปีที่ตีพิมพ์ ฉบับที่ (volume) หน้าต้นและหน้าสุดท้าย

6.1 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสาร

6.1.1 ผู้พิมพ์ตั้งแต่ 1 คนถึง 6 คน ใส่ชื่อผู้แต่งทุกคน ถ้ามีผู้พิมพ์มากกว่า 6 คน ให้ใส่ชื่อผู้แต่งเพียง 3 คนแรกตามด้วยคำว่า *et al.*

- Solter NA, Wasserman SI, Austern KF, *et al.* Cold urticaria: release into the circulation of histamine and eosinophilic chemotactic factor of anaphylaxis during cold challenge. N Engl J Med 1976; 294: 687-90.

- Manakul S, Inthachang N. Rapid haemocultures report. J Med Tech Assoc Thailand. 2012; 40: 4300-10. (in Thai)

6.1.2 ผู้พิมพ์เป็นคณะหรือกลุ่มบุคคล

- The committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, Recommended method for the determination of gamma-glutamyltransferase in blood. Scand J Clin Lab Invest 1976; 36: 119-25.

6.1.3 ไม่มีชื่อผู้พิมพ์ Anonymous.

- Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). Br Med J 1981; 283: 628.

6.1.4 วารสารประเภท supplement

- Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (abstract). Blood 1979; 54 (suppl 1): 26a.

6.2 ตัวอย่างการอ้างอิงหนังสือ

6.2.1 ผู้พิมพ์คนเดียว

- Eisen HN. Immunology: an Introduction to molecular and cellular principle of the immune response, 5th ed. New York: Harper and Row; 1974: 406

- Wijarm B. The Management of Knowledge toward Performance. Bangkok: Expernet Company; 2004. (in Thai)

- Chomeya R. Organizational Effectiveness on Health Care Criteria for Performance Excellence Framework in Government Hospitals in Public Health Region 6. [Ph.D. Thesis in Applied Behavioral Science Research]. Bangkok: Faculty of Graduate School, Srinakharinwirot University; 2003. (in Thai)

6.2.2 ผู้นิพนธ์เป็นคณะหรือกลุ่มบุคคล

- American Medical Association Department of Drugs. AMA drug evaluations. 3rd ed. Littleton: Publishing Sciences Group, 1977.

6.2.3 บรรณาธิการ ผู้รวบรวม ประ찬เป็นผู้แต่ง

- Finegold SM, Martin WJ. Diagnostic Microbiology. 6th ed. St.Louis: C.V. Mosby Company, 1982.

6.2.4 บทในหนังสือ

- Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading Microorganisms. In: Sodenman Wa Jr., Sidenman Wa, editors. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: WB Saunders; 1974. p. 457-72.

- Tienboon P. Anthropometric nutritional assessment. In: Chardapisak W, Gosarat C, editors. Ambulatory Pediatrics. Chiang Mai: Sangsilp Publishing; 2007. p. 363-9. (in Thai)

6.2.5 สิ่งตีพิมพ์ขององค์กรต่างๆ

- National Center for Health Statistics. Acute condition: incidence and associated disability, United State July 1968-June 1969. Rockville, MD: National Center for Health Statistics, 1972 (Vital and health statistics, Series 10: Data from the National Health Survey, no 69) (DHEW publication no. (HSM) 72-1036).

6.2.6 หนังสือรายเดือนและรายปักษ์

- Roueche B. Annals of medicine: the Santa Claus culture. The New York 1971 Sep. 4: 66-81.

6.2.7 หนังสือพิมพ์รายวัน

- Shaffer RA. Advances in chemistry are starting to unlock mysteries of the brain : discoveries should help cure alcoholism and insomnia, explain mental illness. How the messangers work. Wall Street Journal 1977 Aug. 12:1 (col 1), 10 (col 1).

6.3 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสารอิเล็กทรอนิกส์

6.3.1 CD-ROM

- Anderson SC, Poulsen KB, Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

6.3.2 บทความวารสารทางอินเทอร์เน็ต (Journal article on the Internet)

- Sanders GD, Bayourni AM, Holodnity M, *et al.* Cost-effectiveness of HIV screening in patients older than 55 year of age. Ann Intern Med [serial on the Internet]. 2008 Jun [cited 2008 Oct 7]; 148 (12). Available from: <http://www.annals.org/cgi/reprint/148/12/889.pdf>

6.3.3 หนังสือทางอินเทอร์เน็ต (Monograph on the Internet)

- Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available form: <http://www.nep.edu/books/0309074029/html/>

6.3.4 โสมเพจ/เว็บไซต์ (Homepage/Website)

- Cancer-Pain. org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c 2000-01 [cited 2008 Oct 3]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>



วารสาร

เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Check list การเตรียมต้นฉบับ วารสารเทคนิคการแพทย์

เอกสารประกอบพิจารณา และความรับผิดชอบของผู้แต่งหรือคณะผู้แต่ง

- ☐ ผู้แต่งหรือคณะผู้แต่งออกหนังสือรับรองว่า กำลังส่งให้วารสารเทคนิคการแพทย์พิจารณาเท่านั้น บทความนี้หรือบางส่วนของบทความไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน ถ้าบทความได้รับการยอมรับจากกองบรรณาธิการ บทความและบางส่วนของบทความนี้ จะตีพิมพ์โดย “วารสารเทคนิคการแพทย์” เพียงแห่งเดียวเท่านั้น
- ☐ การเสนอชื่อผู้ทรงคุณวุฒิเป็น Reviewer โดยผู้ทรงคุณวุฒิเป็นผู้มีผลงานวิชาการอย่างสม่ำเสมอ และต้องเป็นบุคคลจากภายนอกสถาบันของผู้แต่ง 2 ท่าน พร้อมสถานที่ทำงาน โทรศัพท์ และ E-mail address
- ☐ หนังสือรับรองที่ได้รับอนุญาตจากกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Ethic committee) (สำหรับบทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ และรายงานผู้ป่วย)

การพิมพ์ต้นฉบับ

- ☐ พิมพ์ต้นฉบับด้วยโปรแกรม Microsoft Word for Window
- ☐ ตั้งค่ากระดาษ ขนาด A4
- ☐ ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14
- ☐ ตาราง พิมพ์แยกจากเนื้อหาแต่รวมอยู่ในไฟล์เดียวกัน และเขียนคำว่า (Table...) ใน text
- ☐ รูปภาพ มีความคมชัด ความละเอียดไม่ต่ำกว่า 300 pixels/inches และเขียนคำว่า (Fig. ...) ใน text
- ☐ คำย่อ: ใช้เฉพาะที่เป็นสากลเท่านั้น และเขียนคำเต็ม วงเล็บคำย่อครั้งแรกใน Abstract บทคัดย่อหรือ text
- ☐ ชื่อยาหรือสารเคมีใช้ generic name เท่านั้น
- ☐ บทความภาษาไทย: การเขียนคำศัพท์ภาษาอังกฤษ ให้ยึดหลักการเขียนทับศัพท์หรือใช้ศัพท์บัญญัติตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน ยกเว้นคำที่แปลแล้วอาจได้ใจความไม่ชัดเจน ให้ใช้คำศัพท์ภาษาอังกฤษหรือเขียนคำแปลเป็นภาษาไทยแล้ววงเล็บศัพท์ภาษาอังกฤษ ปีให้ใช้เป็นปี พ.ศ. โดยไม่ต้องวงเล็บปี ค.ศ. โดยรวมควรใช้เป็นภาษาไทยให้มากที่สุด

การอ้างอิงเอกสาร: วิทยานิพนธ์ไม่สามารถนำมาเป็นเอกสารอ้างอิงได้

- ☐ ใส่หมายเลขเรียงลำดับที่อ้างอิง
- ☐ พิมพ์ยกระดับเหนือข้อความและมีวงเล็บ
- ☐ อ้างอิงท้ายบทความตามคำแนะนำผู้แต่ง (Suggestion for Authors: www.jmt-amtt.com)

หน้าแรก (title page) เขียนเป็นภาษาไทย และ อังกฤษ

- | | | |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| ☐ ชื่อเรื่อง | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ ชื่อ-สกุล ของผู้แต่งและคณะ | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ สถานที่ทำงานของผู้แต่งและคณะ | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ E-mail address: ของผู้แต่งและคณะ | | |
| ☐ หมายเลขโทรศัพท์ผู้รับผิดชอบบทความ | | |

ประเภทบทความ

- | | | |
|---|---|--|
| ☐ บทบรรณาธิการ | ☐ บทความปริทัศน์ | ☐ นิพนธ์ต้นฉบับ |
| ☐ บทความพิเศษ | ☐ รายงานการประชุมวิชาการ | ☐ รายงานกรณีศึกษา |
| ☐ บทความวิจัยอย่างสั้น | ☐ จดหมายถึงบรรณาธิการ | ☐ ข่อยวารสาร |

นิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้น ให้ลำดับเนื้อหาดังต่อไปนี้

- | | |
|---|--|
| ☐ บทคัดย่อ ไม่เกิน 300 คำ | ☐ คำสำคัญ (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ Abstract ไม่เกิน 300 คำ | ☐ Keywords (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ เนื้อหา ประกอบด้วย | |
| ☐ บทนำ (Introduction) | |
| ☐ วัสดุและวิธีการ (Materials and methods) | |
| ☐ ผลการศึกษา (Results) | |
| ☐ วิจัย (Discussions) | |
| ☐ สรุป (Conclusion) | |
| ☐ เอกสารอ้างอิง (References) เป็นภาษาอังกฤษ (ตามคำแนะนำ) | |
| ☐ ตาราง และ รูปภาพ เป็นภาษาอังกฤษ (ตามคำแนะนำ) | |

บทความปริทัศน์

อนุโลมตามผู้แต่ง แต่ให้มีขอบข่ายรูปแบบการเขียน ประกอบด้วย บทคัดย่อ บทนำ เนื้อเรื่อง สรุป

- | | |
|--|--|
| ☐ บทคัดย่อ ไม่เกิน 300 คำ | ☐ คำสำคัญ (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ Abstract ไม่เกิน 300 คำ | ☐ Keywords (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |

ลงชื่อ ผู้รับผิดชอบบทความ

(.....)

iSED®

the *perfect* ESR system



Simply insert the primary EDTA tubes and walk away!

iSED Advanced Rheology Technology

iSED's micro-flow cell captures the critical kinetics of Red Blood Cells in a highly Controlled testing environment. Utilizing a very small sample - 100 microliters- the iSED captures the impact of the most critical phase of the early-phase in the phenomenon of RBC sedimentation, the so-called Rouleaux formation, to produce ESR results that are unaffected by the variables commonly associated with traditional ESR testing, such as mixing of the sample and temperature.

Most importantly, iSED results are not affected by the hematocrit.

- ▶ Results in 20 seconds
- ▶ 100µL sample
- ▶ No disposables
- ▶ Works directly off primary EDTA tubes
- ▶ Closed container sampling
- ▶ Fully automated
- ▶ Random access
- ▶ Continuous feed operation
- ▶ High throughput (up to 180 samples per hour!)



Seditrol® ESR Quality Control Exclusively for iSED

- ▶ 18 month shelf life
- ▶ 31 day open vial stability
- ▶ No refrigeration required
- ▶ Barcoded, pierceable vials, ready to load
- ▶ No transfer of QC material required
- ▶ Free QC Data Management Program with peer data and 24/7 access

order information

Cat.	Description	Packaging
112-00101	iSED® Automated ESR Analyzer	1 each
112-05000	Test Card; 5000 iTests	1 card
112-10000	Test Card; 10,000 iTests	1 card
112-20000	Test Card; 20,000 iTests	1 card
112-40000	Test Card; 40,000 iTests	1 card
DSC06	Seditrol® Quality Control Kit	6 x 4.5mL
112-12-001	iWash™	4 x 500mL

specifications

Principle of Measure	photometrical rheoscope
Results	printed results (1-130mm/hr)
Sample Requirements	100µL whole blood (500µL dead volume)
Tube Requirements	13 x 75mm test tube in EDTA anti-coagulant, capped
Barcode Reader	Internal
Printer	Internal
Interface	Serial RS232 port for LIS connection
Power Requirements	100-240VAC; 50-60Hz; 160W
Weight	13.6 kgs (30 lbs)
Dimensions	36 x 27 x 34 cm (14.3 x 10.5 x 13.4 in)

ALCOR
SCIENTIFIC

WWW.ALCORSCIENTIFIC.COM

DISTRIBUTOR :

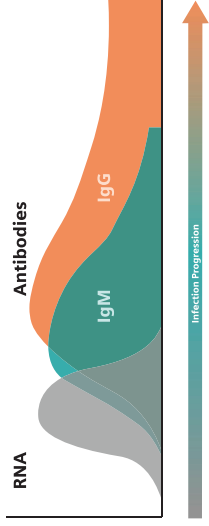
Bangkok Inter Products Co., Ltd.
91/247-251 Suwinthawong Road, Minburi, Bangkok 10510
Tel: 662 543-7430 Fax: 662 543-7900
Email: info@b-i-p.co.th Website: www.b-i-p.co.th

Not all antibody tests are created equal

High quality, extensive reach and targeting the right protein are all essential to ensure we effectively manage the threat of COVID-19

The SARS-CoV-2 Total Assay¹ is a highly sensitive and accurate antibody test

A total antibody test enables a clearer clinical picture over longer period of time.



What is sensitivity and specificity?

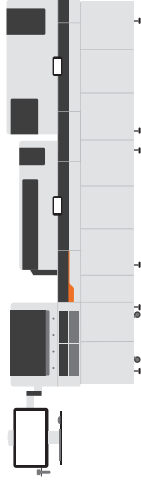
A highly sensitive test should capture nearly all true positive results.
A highly specific test should avoid nearly all false positive results.

100%
sensitivity²

99.8%
specificity³

Rapid

Identify SARS-CoV-2 antibodies
in as little as 10 minutes.⁵

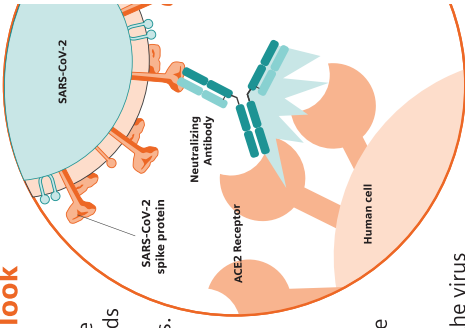


Total antibody blood tests, which run on laboratory analyzers, detect antibodies to SARS-CoV-2 (including IgG and IgM), that are used to identify those with an immune response that indicates recent infection or prior exposure.



Delivering long-term value as we look toward immunity and vaccination

The test detects antibodies to a key protein on the surface of the virus – a **spike protein**, which binds the virus to cells via a distinct human receptor (ACE2) found in lungs, heart, and multiple organs.



Studies indicate that certain (neutralizing) antibodies to the spike protein can **disarm** SARS-CoV-2, presumably by interfering with the ability of the virus to bind, penetrate and infect human cells.



Multiple vaccines in development for SARS-CoV-2 include the spike protein.

Reaching millions of patients

~20,000

50M/month

analysts worldwide* with the largest installed base in the U.S.

Production according to market demand as pandemic evolves

1. This test has not been FDA cleared or approved. This test has been authorized by FDA under an EUA for use by authorized laboratories. This test has been authorized only for detecting the presence of antibodies against SARS-CoV-2, not for any other viruses or pathogens. This test is only authorized for the duration of the declaration that circumstances exist justifying the authorization of emergency use of in vitro diagnostics for detection and/or diagnosis of COVID-19 under Section 564(b)(1) of the Act, 21 U.S.C. § 360bbb-3(f)(1), unless the authorization is terminated or revoked sooner. Product availability may vary by country and is subject to regulatory requirements.

2. For samples collected ≥14 days after positive PCR results.

3. Based on results for the ADVIA Centaur XP, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur CP, ADVIA Centaur CF, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur XPT.

4. Installed base of ADVIA Centaur XP, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur CP, ADVIA Centaur CF, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur XPT.

5. Dependent on test mix and configuration using Atellica Solution.

HOOD05162003093528