

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้รวมรวมกลุ่มประชากรตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจ 114 คน แบ่งเป็นชาย 53 คน (46%) หญิง 61 คน (54%) และกลุ่มคนปกติ 62 คน แบ่งเป็นชาย 28 คน (45%) หญิง 34 คน (55%) อายุเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจเท่ากับ 51 ปี (median : min-max = 52 : 21 - 77) อายุเฉลี่ยของกลุ่มคนปกติเท่ากับ 38 ปี (median : min-max = 39 : 20 - 61) ค่า BMI ในผู้ป่วยโรคหัวใจมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 26 kg/m² (median : min-max = 25.1 : 18.2 - 41.1) และในคนปกติเท่ากับ (median : min-max = 21.4 : 17.2-34.0) (ตารางที่ 10)

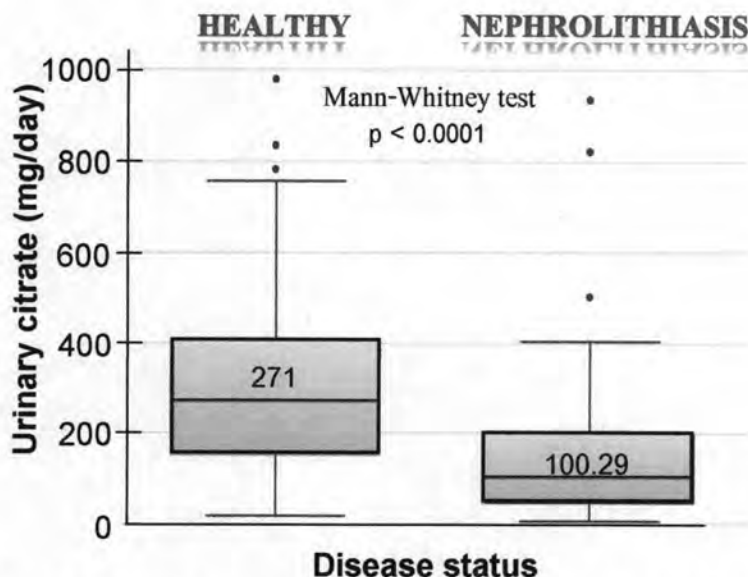
ตารางที่ 10 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มประชากรศึกษา

ลักษณะของกลุ่มประชากรศึกษา	กลุ่มคนปกติ	กลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจ	P value
จำนวนประชากร	62	114	-
เพศ			0.866 ^a
ชาย	28 (45%)	53 (46%)	
หญิง	34 (55%)	61(54%)	
อายุ (ปี) (mean : SD)	38 : 12.0	50.6 : 11.3	0.0001 ^b
(median : min-max)	39 : 20-61	52 : 21-77	
BMI (kg/m ²) (mean : SD)	22.10 : 4.2	26.0 : 4.6	0.0001 ^b
(median : min-max)	21.4 : 17.2-34.0	25.1 : 18.2-41.1	

a : Chi-square test, b : Mann-Whitney test. BMI: Body mass index

ผลการวิเคราะห์ปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ

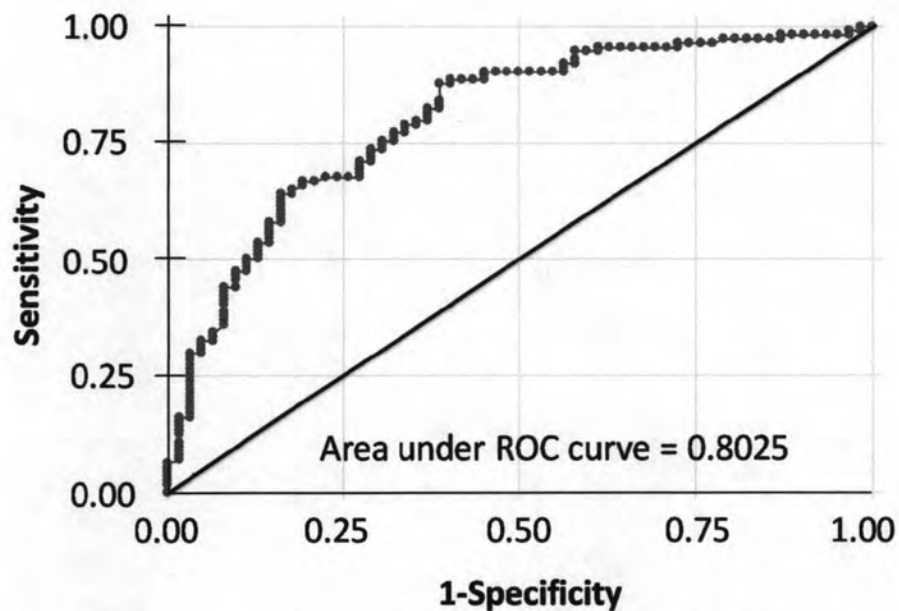
จากการวิเคราะห์ปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ พบว่าผู้ป่วยโรคหัวใจมีระดับซีเทรตในปัสสาวะต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.0001) (รูปที่ 4) โดยค่า median (IQR) ของระดับซีเทรตในปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจ เท่ากับ 100.29 (151.5) mg/day ขณะที่ในกลุ่มควบคุมคนปกติมีค่าเท่ากับ 271 (244.59) mg/day



รูปที่ 4 ระดับซิเตรตในปัสสาวะในกลุ่มประชากรโรคนิ่วไตเทียบกับกลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีการขับออกของซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ค่า median (IQR) ของระดับซิเตรตในปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มคนปกติ เท่ากับ 100.29 (151.5) และ 271 (244.59) mg/day ตามลำดับ (Mann-Whitney test, $P < 0.001$)

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานค่าอ้างอิง (cutoff) ของระดับซิเตรตในปัสสาวะในคนไทย การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ Receiver operating characteristic (ROC) analysis เพื่อหาค่าอ้างอิงของระดับซิเตรตในปัสสาวะที่เหมาะสม และประเมินคุณค่าของการตรวจวัดระดับซิเตรตในปัสสาวะสำหรับใช้ในการแยกแยะกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจากคนปกติ รูปที่ 5 แสดง ROC curve ของระดับซิเตรตในปัสสาวะที่วัดจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต ($n = 114$) และกลุ่มคนปกติ ($n = 62$) ROC curve ที่ได้มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) เท่ากับ 0.8025

พื้นที่ใต้กราฟของ ROC curve เป็นค่าที่ใช้สำหรับบอกว่าการทดสอบ (test) ใดๆ มีประสิทธิภาพในการแยกระหว่างกลุ่มคนเป็นโรค (diseased) กับคนที่ไม่เป็นโรค (non-diseased) ได้ดีเพียงใด โดย $AUC = 0.5$ บ่งชี้ว่าการทดสอบนั้นๆ ไม่สามารถแยกระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคและกลุ่มที่ไม่เป็นโรคได้เลย (50% sensitivity, 50% specificity) ขณะที่ $AUC = 1.0$ บ่งบอกว่าการทดสอบนั้นๆ สามารถใช้จำแนกกลุ่มที่เป็นโรคและกลุ่มที่ไม่เป็นโรคได้อย่างสมบูรณ์แบบ (perfectly distinguishing) (100% sensitivity, 100% specificity) การศึกษานี้ได้ค่า $AUC = 0.8025$ แสดงว่าการตรวจวัดซิเตรตในปัสสาวะสามารถจำแนกกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจากคนปกติได้ในระดับค่อนข้างดี (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ROC curve analysis เพื่อหาค่าอ้างอิง (cutoff) ของระดับซีเทรตในปัสสาวะ

จากผลการวิเคราะห์ ROC curve analysis การศึกษานี้เลือกค่า cutoff ของระดับซีเทรตในปัสสาวะที่ 200 mg/day สำหรับคำนวณค่าวินิจฉัย (diagnostic values) ตารางที่ 11 แสดง 2x2 table ของ urinary citrate test โดยกำหนด cutoff สำหรับผลบวกที่ <200 mg/day

ตารางที่ 11 ผลการจำแนกกลุ่มประชากรตามค่า cutoff ของระดับซีเทรตในปัสสาวะ

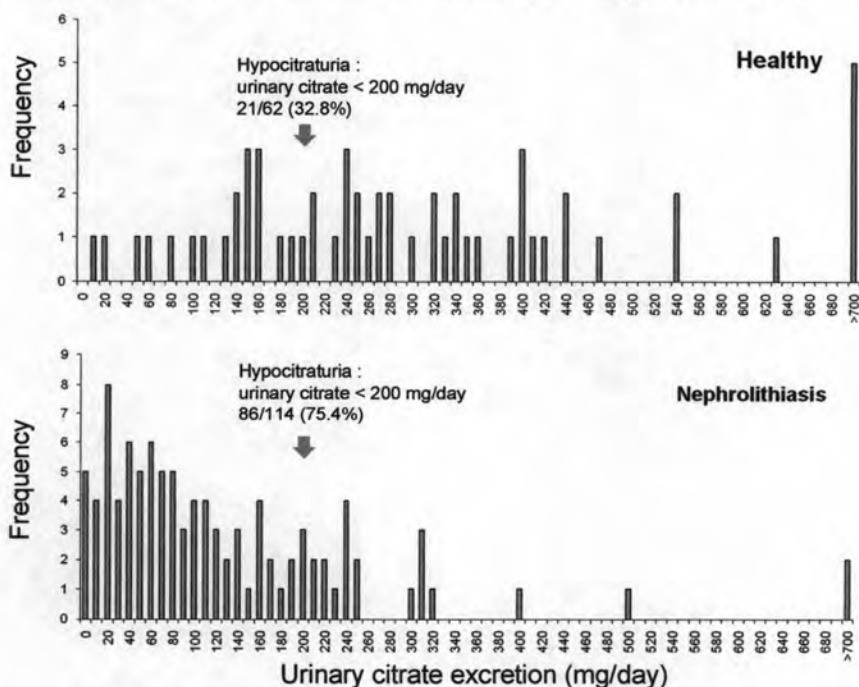
Urinary citrate test	Nephrolithiasis (%)	Healthy (%)	Total
Positive (<200 mg/day)	86 (75)	20 (32)	107
Negative (≥200 mg/day)	28 (25)	42 (68)	69
Total	114 (100)	62 (100)	176

จากตารางที่ 11 สามารถคำนวณค่าวินิจฉัย (diagnostic values) ได้ดังต่อไปนี้

Sensitivity	Pr(+ D)	75.44%
Specificity	Pr(- ~D)	67.74%
Positive predictive value	Pr(D +)	81.13%
Negative predictive value	Pr(~D -)	60.00%
Correctly classified (Accuracy of test)		72.73%

กำหนด D = disease (nephrolithiasis) ~D = non-disease (healthy)

เมื่อเปรียบเทียบการกระจายตัวของปริมาณซิเตรตในปัสสาวะระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และกลุ่มคนปกติ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตส่วนใหญ่มีระดับซิเตรตในปัสสาวะต่ำ แตกต่างจากในกลุ่มคนปกติอย่างชัดเจน (รูปที่ 6) และจากผลการวิเคราะห์ข้างต้นกำหนดค่า cutoff สำหรับภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) คือ <200 mg/day พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตส่วนใหญ่มีระดับซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่า 200 mg/day ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 75.4 ส่วนในคนปกติพบภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำเพียงร้อยละ 32.8 เท่านั้น เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ chi-square test พบว่าภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำสัมพันธ์กับโรคนิ่วไตอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 12) ($P < 0.001$)



รูปที่ 6 การกระจายตัวของระดับซิเตรตในปัสสาวะของกลุ่มควบคุม (บน) และกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (ล่าง) เมื่อกำหนด cutoff สำหรับ hypocitraturia ที่ <200 mg/day พบว่าประชากรที่เป็นโรคนิ่วไต ร้อยละ 75.4 มีภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำเพียงร้อยละ 32.8

ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) ต่อการเกิดโรคนิ่วไต โดย logistic regression

ผลการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่าภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำสัมพันธ์ระหว่างกับโรคนิ่วไตอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อหาขนาดของความสัมพันธ์ดังกล่าว การศึกษานี้เลือกใช้ logistic regression สำหรับคำนวณ odds ratio (OR) ของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (urinary citrate <200 mg/day) ต่อการเกิดโรคนิ่วไต

ตารางที่ 12 แสดงผลการคำนวณความเสี่ยง (OR) ของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนิ่วไต ค่า crude OR ของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ เท่ากับ 6.45 (CI: 3.26 - 12.76, $P < 0.001$) เมื่อควบคุมปัจจัยอายุ เพศ และดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) แล้ว พบว่า ค่า adjusted OR ของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ เท่ากับ 6.39 (CI: 2.92 - 14.00, $P < 0.001$) แสดงว่าผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วไตเป็น 6.39 เท่า เมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่มีความเสี่ยงภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (normocitraturia)

นอกจากภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำแล้ว ผลการวิเคราะห์ยังพบว่าปัจจัยอายุและดัชนีมวลกายเป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีนัยสำคัญของโรคนิ่วเช่นกัน โดย adjusted OR ของผู้ที่มีอายุ 40 ปีขึ้นไป เท่ากับ 3.55 (CI: 1.49 - 8.48 $p = 0.004$) แสดงว่าผู้ที่มีอายุ 40 ปีขึ้นไปมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่วไตมากกว่าผู้ที่อายุน้อยกว่า 40 ปี ถึง 3.55 เท่า เมื่อพิจารณาภาวะน้ำหนักเกินและโรคอ้วนก็มีความเสี่ยงต่อโรคนิ่วไต โดยประเมินจากค่าดัชนีมวลกาย ($BMI \geq 23 \text{ kg/m}^2$ อยู่ในภาวะน้ำหนักเกิน ขณะที่ $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ จัดว่าเป็นโรคอ้วน) พบว่าผู้ที่มี $BMI \geq 23 \text{ kg/m}^2$ มีค่า adjusted OR เท่ากับ 2.27 (CI: 1.01 - 5.09, $P = 1.01 - 5.09$) นั่นคือประชากรกลุ่มนี้มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่วไตเป็น 2.77 เท่า ของกลุ่มที่มีดัชนีมวลกายปกติหรือ $BMI < 23 \text{ kg/m}^2$ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความเสี่ยงของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนิ่วไต

Independent variables	Crude OR (95%CI)	P value	Adjusted OR (95%CI)	P value
Age				
- <40 years	1.00	<0.001*	1.00	0.004*
- ≥40 years	5.33 (2.65 - 10.75)		3.55 (1.49 - 8.48)	
Gender				
- Male	1.00	0.866	1.00	0.743
- Female	0.95 (0.51 - 1.76)		1.14 (0.52 - 2.49)	
BMI (kg/m ²)				
- <23	1.00	<0.001*	1.00	0.047*
- ≥23	3.83 (1.92 - 7.62)		2.27 (1.01 - 5.09)	
Hypocitraturia				
- No	1.00	<0.001*	1.00	<0.001*
- Yes	6.45 (3.26 - 12.76)		6.39 (2.92 - 14.00)	

ผลการตรวจกรองหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน NaDC-1 ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

เนื่องจากมีหลักฐานบ่งชี้ว่าปริมาณซีเทรตในอาหาร (dietary citrate intake) และปริมาณการดูดกลับของซีเทรตที่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น (tubular citrate reabsorption) ส่งผลต่อปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ และการดูดกลับของซีเทรตที่เซลล์บุท่อไตส่วนต้นนี้อาศัยโปรตีนขนส่ง NaDC-1 เพื่อพิสูจน์ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphisms) ในยีน NaDC-1 สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำหรือไม่ การศึกษานี้จึงตรวจกรองหาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน exons ของยีน NaDC-1 โดยวิธี direct sequencing จำนวนและข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่นำมาตรวจกรองหาความหลากหลายทางพันธุกรรมแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ัวไตที่นำมาตรวจรหาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NaDC-1* โดยการหาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing)

Nephrolithiasis cases	Gender	Age (year)	Urinary creatinine (g/day)	Corrected CCr (ml/min/1.73 m ²)
RKT01	Female	59	0.64	47.19
RKT02	Female	50	0.65	54.59
RKT04	Female	66	0.93	49.34
RKT05	Female	63	0.64	42.28
RKT06	Female	61	0.28	18.90
RKT10	Female	62	0.68	41.18
RKT14	Female	43	1.08	80.35
RKT15	Male	50	1.35	87.48
RKT16	Female	68	0.90	60.21
RKT20	Male	35	1.27	58.51
RKT21	Male	56	1.22	63.79
RKT22	Female	46	1.07	81.92
RKT29	Female	51	0.36	18.58
n = 13	M:F	56	0.90	54.6
	3 : 10	(12)	(0.44)	(21.5)

CCr: Creatinine clearance, Age, urinary creatinine and corrected CCr are summarized in median (IQR).

ผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน exons ของยีน *NaDC-1* โดยการทำให้ multiple alignment พบ single nucleotide polymorphism (SNP) จำนวน 1 SNP ซึ่งตรงกันกับที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank คือ rs11567842 (A/G) อยู่ใน exon 12 (ตารางที่ 14) (รูปที่ 7B)

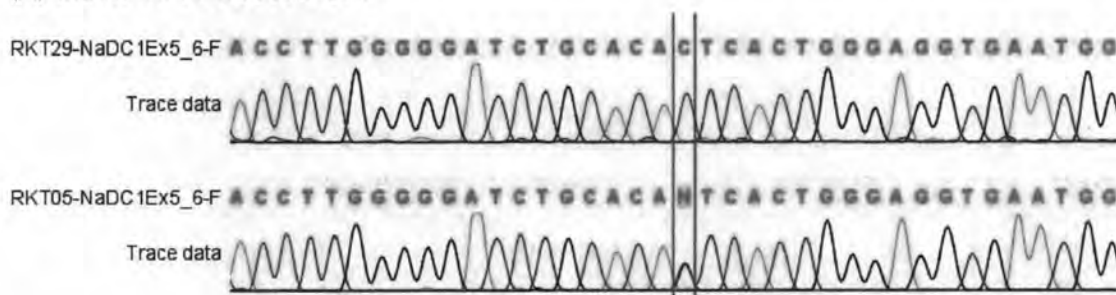
เนื่องจาก exon 3-4, exon 5-6 และ exon 7-8 ของยีน *NaDC-1* มี introns ที่มีความยาวไม่มากนักแทรกอยู่ระหว่างกลาง จึงสามารถออกแบบ primers ให้ครอบคลุมส่วนของ intron 3, intron 5 และ intron 7 ได้ ซึ่งจากผลการทำให้ multiple alignment พบ SNP ในส่วนของ intron 5 คือ rs9890678 (C/T) (ตารางที่ 14) (รูปที่ 7A)

จาก SNP database มีข้อมูลว่า exon 2 มี missense SNP คือ rs16964363 (A/C) แต่จากผลการตรวจกรองเบื้องต้นในการศึกษานี้ ไม่พบ SNP ดังกล่าว อาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อย หากเพิ่มขนาดตัวอย่างอาจจะพบ SNP นี้ได้

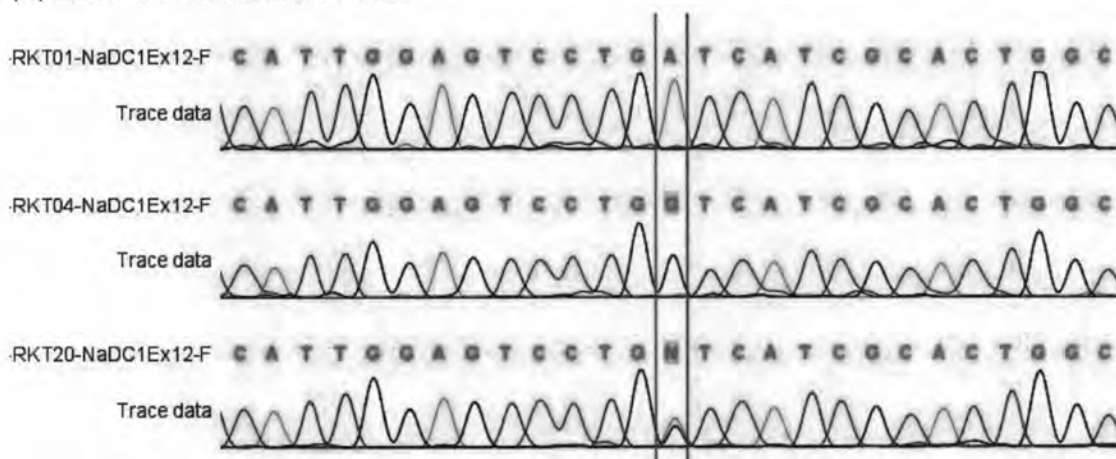
ตารางที่ 14 ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในยีน *NaDC-1* ของผู้ป่วยโรคนี้วไต

Sequenced regions	n	Nephrolithiasis Cases	SNP ID	Variant	Amino acid Change	SNP genotype found
Exon 1	12	RKT01, 02, 04, 05, 06, 10, 14, 16, 20, 21, 22, 29	none			None
Exon 2	11	RKT01, 02, 04, 05, 06, 10, 14, 20, 21, 22, 29	rs16964363	A/C	M45L	AA
Exon 3-4	11	RKT01, 02, 04, 05, 06, 14, 16, 20, 21, 22, 29	none			none
Exon 5-6	5	RKT05, 14, 20, 22, 29	intron5 : rs9890678	C/T		CC, CT
Exon 7-8	8	RKT01, 02, 04, 05, 14, 16, 20, 22	none			none
Exon 9	10	RKT01, 02, 04, 05, 06, 14, 16, 20, 22, 29	none			none
Exon 10	9	RKT01, 02, 04, 05, 06, 14, 16, 20, 29	none			none
Exon 11	9	RKT01, 02, 04, 05, 14, 16, 20, 21, 29	none			none
Exon 12	7	RKT01, 02, 04, 14, 16, 20, 29	rs11567842	A/G	I550V	AA, AG, GG

(A) Intron 5 : rs9890678 SNP

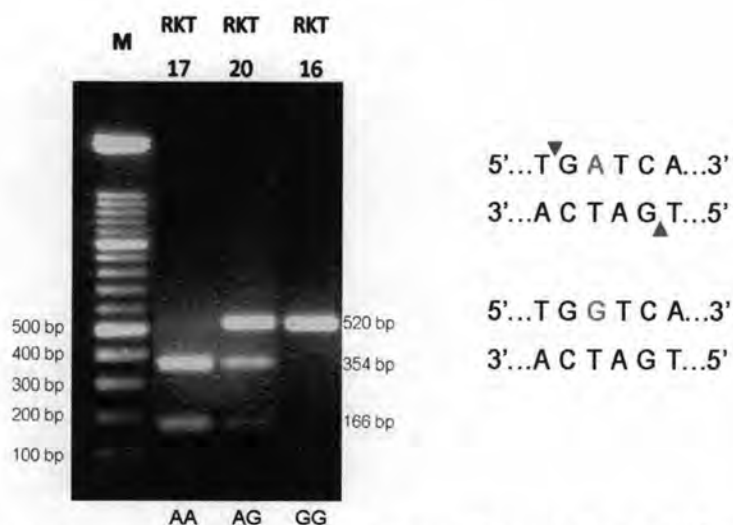


(B) Exon 12 : rs11567842 SNP



รูปที่ 7 ผลการคัดกรองหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยวิธีหาลำดับเบสโดยตรง พบความหลากหลายทางพันธุกรรมตรงกับฐานข้อมูลรหัส rs9890678 (C/T) ใน intron 5 ของยีน *NaDC-1* โดยพบจีโนไทป์แบบ CC และ CT แต่ไม่พบ CC ลำดับเบสที่แสดงมาจากตัวอย่าง RKT05 และ RKT29 (A) และพบความหลากหลายทางพันธุกรรมตรงกับฐานข้อมูลรหัส rs11567842 (A/G) SNP ใน exon 12 ของยีน *NaDC-1* โดยพบทั้ง 3 จีโนไทป์ ได้แก่ AA, AG และ GG ลำดับเบสที่แสดงมาจากตัวอย่าง RKT01, RKT04 และ RKT20 (B)

rs11567842 (A/G) เป็น missense SNP ทำให้กรดอะมิโนของโปรตีน *NaDC-1* ที่ตำแหน่ง 550 เปลี่ยนแปลงจาก isoleucine (I) เป็น valine (V) หรือเรียกว่า I550V polymorphism ดังนั้น SNP นี้ น่าจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีน *NaDC-1* และอาจสัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ผู้วิจัยจึงได้เลือกศึกษา rs11567842 (A/G) ในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้น โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) มาตรวจสอบ SNP ดังกล่าว โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bcl-I* สำหรับจำแนก A และ G alleles ซึ่งตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bcl-I* และผลของ PCR-RFLP แสดงในรูปที่ 8 เอนไซม์ *Bcl-I* สามารถตัดอัลลีล A (A allele) ได้ ขณะที่อัลลีล G (G allele) ไม่สามารถตัดได้



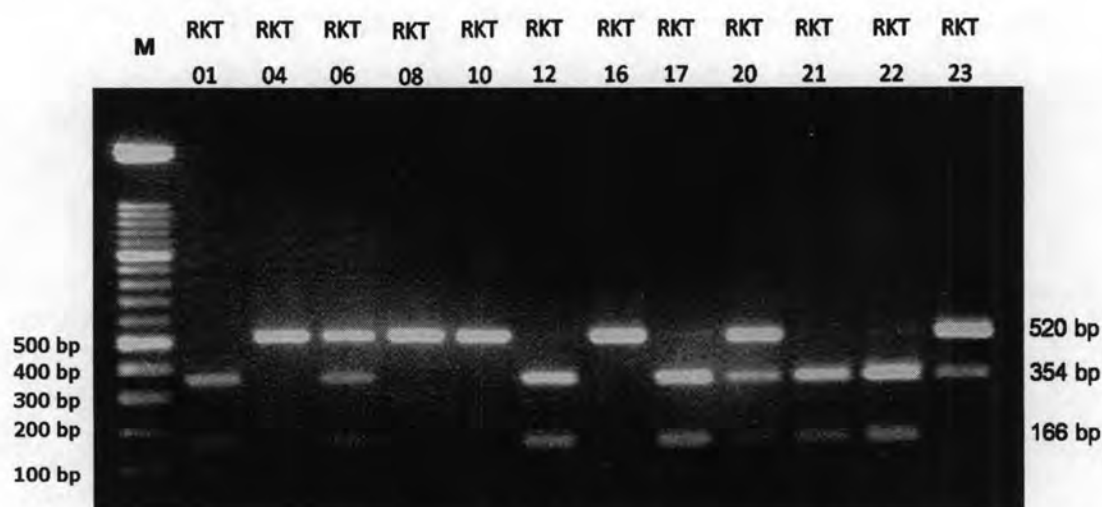
รูปที่ 8 ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bcl-I* และผลของ PCR-RFLP การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน ส่วน exon 12 ของยีน *NaDC-1* จะได้ PCR product ขนาด 520 bp และการใช้เอนไซม์ตัด จำเพาะ *Bcl-I* จะสามารถจำแนกจีโนไทป์ AA AG และ GG ได้เมื่อนำมาวิ่งผ่านสนามไฟฟ้าโดย เทคนิค agarose gel electrophoresis เอนไซม์ *Bcl-I* สามารถตัด A allele ได้ แต่ G allele ไม่ สามารถตัดได้ ดังนั้นจีโนไทป์ AA จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาด 354 และ 166 bp จีโนไทป์ AG จะพบ 3 แถบมีขนาด 520, 354 และ 166 bp และจีโนไทป์ GG จะพบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาด 520 bp

ผลการตรวจสอบ rs11567842 polymorphism ในผู้ป่วยโรคนิวไตและคนปกติ

ทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ forward primer : 5'-AAC GGG AGG ACT TCC CAG AG-3' และ reverse primer : 5'-GAG CTT GGA GCT TGG AGC TT-3' จะได้ PCR product ขนาด 520 bp แล้วแยกจีโนไทป์ของ rs11567842 SNP (AA, AG, GG) ด้วย เทคนิค RFLP โดยการนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bcl-I* ซึ่งสามารถตัดอัลลีล A ได้เป็น 2 แถบ มีขนาด 358 bp และ 162 bp ส่วนอัลลีล G เอนไซม์ *Bcl-I* ไม่สามารถตัดได้จึงจะมีขนาด 520 bp เท่าเดิม (รูปที่ 8) ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Bcl-I* ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis รูปที่ 9 แสดงผลของ PCR-RFLP เพื่อจำแนกจีโนไทป์ของ rs11567842 SNP

จากรูปที่ 9 จะเห็นว่าจีโนไทป์ AA จะพบแถบ DNA ขนาด 354 bp และ 162 bp (homozygous cut) จีโนไทป์ AG จะพบแถบ DNA ทั้ง 3 ขนาด คือ 520 bp, 354 bp, และ 162 bp (heterozygous) ส่วนจีโนไทป์ GG จะพบแถบ DNA เพียงขนาดเดียวคือ 520 bp (homozygous uncut)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing (รูปที่ 7) ยืนยันว่าวิธี PCR-RFLP ที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถจำแนกจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) ทั้ง 3 แบบ คือ AA, AG และ GG ได้อย่างถูกต้อง สารตัวอย่าง RKT01 ทดสอบ PCR-RFLP พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 354 และ 166 bp และผลจาก direct sequencing พบว่าเป็น homozygous AA สารตัวอย่าง RKT04 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 520 bp จาก PCR-RFLP และจากผลของ sequencing ยืนยันว่าเป็น homozygous GG สำหรับสารตัวอย่าง RKT20 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ (520, 354 และ 166 bp) จาก PCR-RFLP และพบว่ามีจีโนไทป์เป็น heterozygous AG จากผล direct sequencing ดังนั้นสรุปว่า การตรวจสอบจีโนไทป์ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน การศึกษานี้จึงใช้ PCR-RFLP สำหรับจำแนกจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) ในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้น เนื่องจากทั้งสะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายน้อยกว่า



รูปที่ 9 ตัวอย่างเจลแสดงผลการจำแนกจีโนไทป์ของ rs11567842 SNP โดยวิธี PCR-RFLP ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ AA ได้แก่ RKT01, 12, 17, 21 และ 22 จีโนไทป์ AG ได้แก่ RKT06, 20 และ 23 และจีโนไทป์ GG ได้แก่ RKT04, 08, 10 และ 16

ความสัมพันธ์ของ rs11567842 (A/G) polymorphism กับโรคนี้วไต

งานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบ rs11567842 SNP ในกลุ่มประชากรตัวอย่างทั้งหมด 176 ราย แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตจำนวน 114 ราย และกลุ่มคนปกติจำนวน 62 ราย ความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) และความถี่อัลลีล (allele frequency) แสดงไว้ในตารางที่ 15 พบว่าการกระจายตัวของ rs11567842 (A/G) genotype ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตและคนปกติอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.557$ และ $P = 0.958$ ตามลำดับ) ไม่พบความสัมพันธ์

อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการกระจายตัวของ rs11567842 (A/G) genotype กับการเกิดโรคนิ่วไต (P = 0.368)

ความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.384) โดยพบความถี่อัลลีล A ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติมีค่าเท่ากับ 0.895 และ 0.935 ตามลำดับ ส่วนความถี่อัลลีล G มีค่าเท่ากับ 0.105 และ 0.065 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สรุปได้ว่าอัลลีล A เป็นอัลลีลหลัก (major allele) ที่พบในประชากรไทยทั้งสองกลุ่ม

ตารางที่ 15 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของ rs11567842 SNP ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ

Genotype	Nephrolithiasis patients		Healthy controls		Total	
	Observed (%)	Expected	Observed (%)	Expected	Observed (%)	Expected
rs11567842 (A/G)						
AA	57(50)	51.3	31(50)	30.5	88(50)	81.8
AG	39(34.2)	50.3	25(40.3)	26.0	64(36.4)	76.4
GG	18(15.8)	12.3	6(9.7)	5.5	24(13.6)	17.8
Total	114(100)		62(100)		176(100)	
Hardy-Weinberg equilibrium test	P = 0.557		P = 0.958		P = 0.100	
Probability of genotype distribution (nephrolithiasis vs. healthy)	$\chi^2 = 2.000$		P = 0.368			
Allele frequency						
A allele	0.895		0.935		P = 0.384*	
G allele	0.105		0.065			

*Proportion test of allele prevalence (nephrolithiasis vs. healthy)

จากการคำนวณค่า odds ratio (OR) เพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่วของแต่ละ rs11567842 (A/G) genotype โดยใช้ logistic regression ตารางที่ 16 แสดงค่า crude OR และ adjusted OR ของแต่ละ rs11567842 (A/G) genotype ในลักษณะการถ่ายทอดแบบ codominance, dominance และ recessive inheritances ผลการวิเคราะห์พบว่า rs11567842

(A/G) polymorphism ไม่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนิ่วไต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า rs11567842(A/G) polymorphism ไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงในการเป็นโรคนิ่วไตได้

ตารางที่ 16 ความเสี่ยงของจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) ต่อโรคนิ่วไต ตามลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

Model of inheritance	Crude OR (95%CI)	P value	Adjusted OR (95%CI)*	P value
G codominance, A major allele				
- AA	1.00	-	1.00	-
- AG	0.851.06(0.44-1.65)	0.629	1.01(0.47-2.15)	0.981
- GG	1.63(0.59-4.53)	0.348	1.37(0.42-4.46)	0.600
G dominance, A major allele				
- AA	1.00	-	1.00	-
- AG and GG	1.00(0.54-1.86)	1.00	1.08(0.53-2.20)	0.826
G recessive, A major allele				
- AA and AG	1.00	-	1.00	-
- GG	1.75(0.66-4.67)	0.264	1.36(0.44-4.24)	0.603

ค่า OR และ 95% confidence intervals (95%CI) คำนวณจาก logistic regression
* adjusted for age and gender

ความสัมพันธ์ของ rs11567842 (A/G) polymorphism กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

เพื่อพิสูจน์ว่า rs11567842 (A/G) polymorphism ในยีน *NaDC-1* สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำหรือไม่ การศึกษานี้ให้นิยามภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ คือ มีค่าซีเทรตในปัสสาวะ <200 mg/day (ตารางที่ 11) ตารางที่ 17 แสดงระดับการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะเปรียบเทียบในแต่ละจีโนไทป์ ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis) กลุ่มคนปกติ (healthy) และทั้งสองกลุ่มรวมกัน (total) ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับของซีเทรตในปัสสาวะต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญในทุกจีโนไทป์ rs11567842(A/G) ยกเว้นผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG พบว่ามีระดับซีเทรตในปัสสาวะไม่ต่างจากกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบระดับซีเทรตในปัสสาวะระหว่างจีโนไทป์ AA, AG และ GG ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มคนปกติ และรวมทั้งสองกลุ่ม อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ GG มีแนวโน้มการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะสูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ AG และ AA ตามลำดับ

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเมื่อเปรียบเทียบระดับซีเทรตในปัสสาวะระหว่างจีโนไทป์ GG กับ AA และ AG (GG vs. AA+AG) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ GG มีระดับซีเทรตสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA หรือ AG อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 17) เมื่อรวมกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AG และ GG แล้วเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA (GG+AG vs. AA) พบว่าระดับซีเทรตในปัสสาวะของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 17 ระดับการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ จำแนกตามจีโนไทป์ rs11567842 (A/G)

rs11567842(A/G) genotype	Urinary citrate (mg/day)		
	Nephrolithiasis	Healthy	Total
n	114	62	176
Genotype	100 (152) ^a	271 (245)	148 (198)
- AA	78 (97) ^a	284 (282)	123 (191)
- AG	105 (131) ^a	248 (183)	146 (186)
- GG	222 (139)	341 (132)	236 (143)
- AA+AG	85 (119) ^{a,b}	263 (244)	136 (188)
- AG+GG	124 (165) ^a	270 (242)	168 (196)

เนื่องจากการกระจายของข้อมูลไม่เป็นแบบปกติจึงแสดงเป็นค่า median (IQR)

a : $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับคนปกติ (Mann-Whitney test)

b : $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับ GG ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Mann-Whitney test)

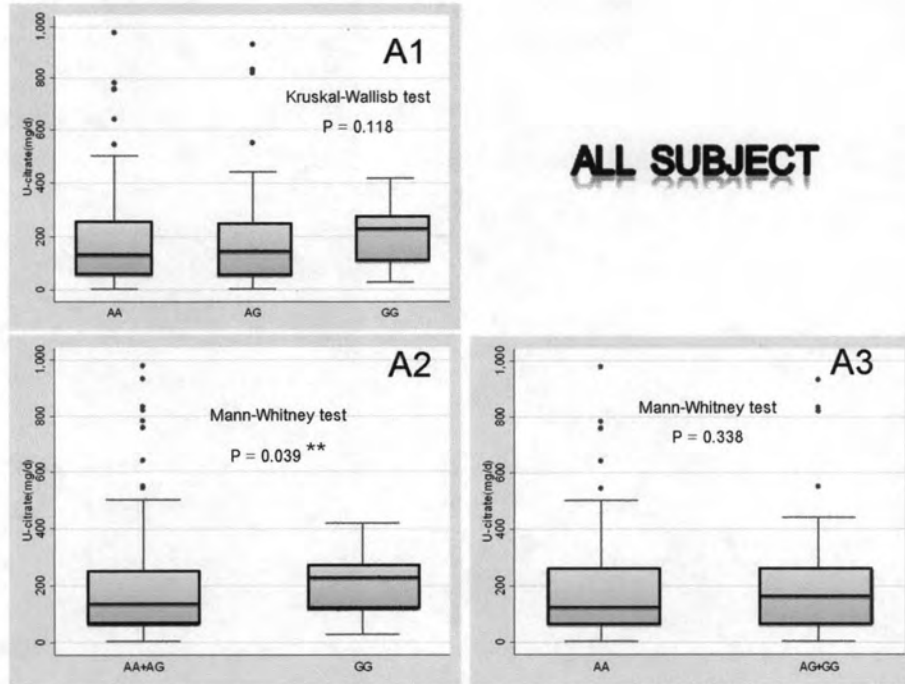
รูปที่ 10 Box-Whisker plot เปรียบเทียบระดับการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะในแต่ละ rs11567842 (A/G) genotype ในการรวมทุกกลุ่ม (panel A) กลุ่มคนปกติ (panel B) และกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (panel C) โดยแยกเป็นการเปรียบเทียบระหว่างจีโนไทป์ AA, AG และ GG (A1, B1, C1) (G codominance mode) เปรียบเทียบระหว่าง AA+AG กับ GG (A2, B2, C2) (G recessive mode) และเปรียบเทียบระหว่าง AA กับ AG+GG (A3, B3, C3) (G dominance mode)

เมื่อพิจารณาในประชากรทั้งหมดผู้ที่มีจีโนไทป์ AA, AG และ GG มีแนวโน้มการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะจากต่ำไปหาสูงตามลำดับ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.118$) (รูปที่ 10A1) และในกรณีที่รวมผู้ที่มีจีโนไทป์ AA และ AG เทียบกับผู้ที่มีจีโนไทป์ GG (AA+AG vs.

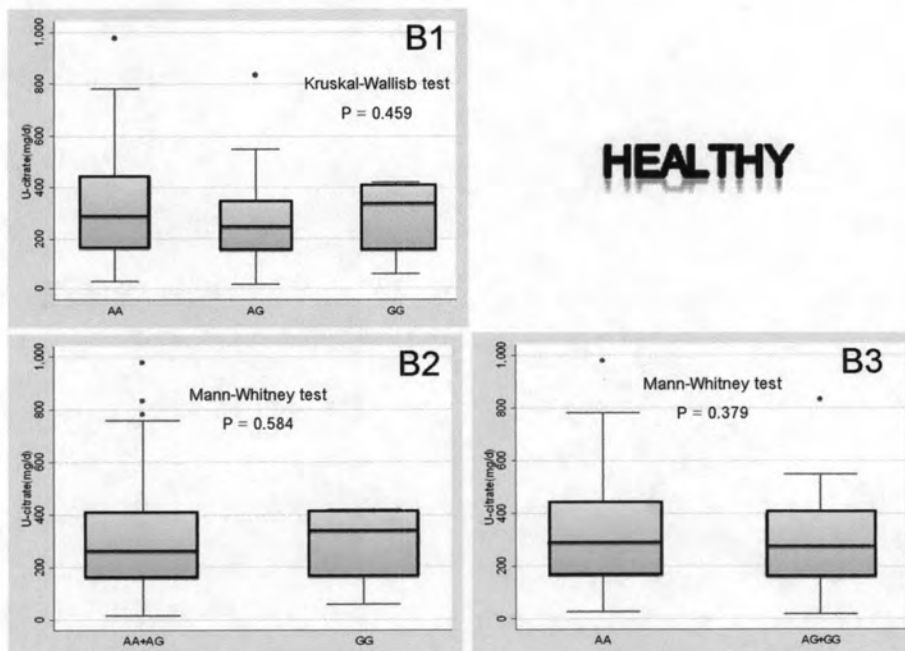
GG) (รูปที่ 10A2) พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติของระดับการขับออกซิเทรตในปัสสาวะ ($P = 0.039$) แต่เมื่อรวมกลุ่มผู้ที่มีจีโนไทป์ AG และ GG เทียบกับกลุ่ม AA (AA vs. AG+GG) (รูปที่ 10A3) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการขับออกซิเทรตในปัสสาวะ ($P = 0.339$)

ในกลุ่มคนปกติ ระดับซิเทรตในปัสสาวะระหว่างผู้ที่มีจีโนไทป์ AA, AG และ GG ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.459$) (รูปที่ 10B1) แต่พบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ GG มีระดับซิเทรตในปัสสาวะสูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์อื่นๆ ไม่พบความแตกต่างของระดับซิเทรตในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกรณีที่รวมผู้ที่มีจีโนไทป์ AA และ AG เทียบกับผู้ที่มีจีโนไทป์ GG ($P = 0.584$) (รูปที่ 10B2) และการรวมผู้ที่มีจีโนไทป์ AG และ GG เทียบกับผู้ที่มีจีโนไทป์ AA ($P = 0.379$) (รูปที่ 10B3)

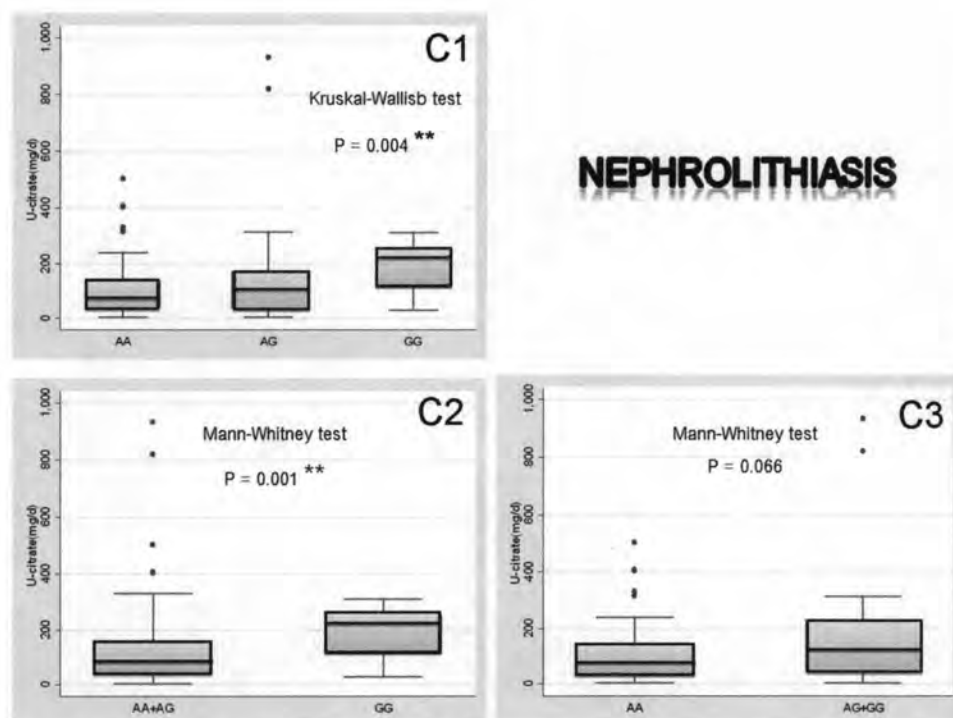
ในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจ พบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ AA มีระดับซิเทรตในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ AG และต่ำกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ GG ตามลำดับ และระดับซิเทรตในปัสสาวะของทั้ง 3 กลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.004$) (รูปที่ 10C1) เมื่อรวมผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA และ AG เทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG (AA+AG vs. GG) พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG มีระดับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA รวมกับ AG อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.001$) (รูปที่ 10C2) ในขณะที่การรวมผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AG และ GG เทียบกับ AA (AA vs. AG+GG) พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA มีระดับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AG รวมกับ GG แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.066$) (รูปที่ 10C3)



รูปที่ 10A Box-Whisker plot เปรียบเทียบระดับซิเทรตในปัสสาวะระหว่างจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด (A1 = AA vs. AG vs. GG, A2 = AA+AG vs. GG, A3 = AA vs. AG+GG)



รูปที่ 10B Box-Whisker plot เปรียบเทียบระดับซิเทรตในปัสสาวะระหว่างจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) ในกลุ่มคนปกติ (B1 = AA vs. AG vs. GG, B2 = AA+AG vs. GG, B3 = AA vs. AG+GG)



รูปที่ 10C Box-Whisker plot เปรียบเทียบระดับซิเตรตในปัสสาวะระหว่างจีโนไทป์ rs11567842 (AG) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (C1 = AA vs. AG vs. GG, C2 = AA+AG vs. GG, C3 = AA vs. AG+GG)

เมื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ (AA, AG, GG) ต่อภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (ระดับซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน) การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างจีโนไทป์ AA, AG, GG กับภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำในกลุ่มคนปกติ แต่พบว่าในคนปกติมีแนวโน้มว่า GG เป็น protective genotype ของภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (ตารางที่ 18)

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าจีโนไทป์ GG ลดความเสี่ยงต่อภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ โดยมีค่า adjusted OR เท่ากับ 0.17 (95%CI, 0.05-0.59) ($P = 0.005$) เมื่อเทียบกับจีโนไทป์ AA (adjusted OR = 1.00) ใน G codominant mode และเมื่อเทียบกับกลุ่มจีโนไทป์ AA และ AG ใน G recessive mode พบว่ามีค่า adjusted OR เท่ากับ 0.16 (95%CI, 0.05-0.49) ($P = 0.002$) (ตารางที่ 18) กล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA เสี่ยงต่อภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำเป็น 5.88 (1/0.17) เท่า เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ GG (G codominant mode) และผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA หรือ AG เสี่ยงต่อภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำเป็น 6.25 (1/0.16) เท่า เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ GG (G recessive mode)

การวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ต่อภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำในทั้งสองกลุ่ม (total) ได้ผลคล้ายกับในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต คือพบว่าจีโนไทป์ GG เป็นปัจจัยป้องกัน (protective

factor) ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ โดยมีค่า adjusted OR เท่ากับ 0.25 (95%CI, 0.09-0.69) (P = 0.007) เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA (adjusted OR = 1.00) ใน G codominant mode ซึ่งหมายความว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA เสี่ยงต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเป็น 4 (1/0.25) เท่า ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ GG ส่วนการวิเคราะห์ใน G recessive mode พบค่า adjusted OR ของกลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG เท่ากับ 0.24 (95%CI, 0.09-0.62) (P = 0.004) เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA หรือ AG (adjusted OR = 1.00) กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA หรือ AG เสี่ยงต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเป็น 4.12 (1/0.24) เท่า ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ GG (G recessive mode) (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ [rs11567842(A/G)] ต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

rs11567842(A/G) genotype :	Nephrolithiasis (n=114)		Healthy (n=62)		Total (n=176)	
	Crude OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)*	Crude OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)*	Crude OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)*
A major allele						
G codominance						
AA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
AG	1.32 (0.44-3.91)	1.32 (0.44-3.96)	1.18 (0.39-3.59)	1.18 (0.38-3.60)	1.09 (0.56-2.14)	1.16 (0.58-2.32)
GG	0.15** (0.05-0.48)	0.17** (0.05-0.59)	0.42 (0.43-4.09)	0.38 (0.04-3.81)	0.29** (0.11-0.74)	0.25** (0.09-0.69)
G dominance						
AA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
AG and GG	0.56 (0.24-1.34)	0.61 (0.25-1.49)	1.00 (0.34-2.90)	0.98 (0.34-2.87)	0.75 (0.41-1.34)	0.77 (0.42-1.43)
G recessive						
AA and AG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
GG	0.14** (0.05-0.40)	0.16** (0.05-0.49)	0.39 (0.04-3.58)	0.36 (0.04-3.32)	0.28** (0.11-0.69)	0.24** (0.09-0.62)

ค่า odds ratios(OR) และ 95% confidence intervals(95%CI) คำนวณโดยใช้ logistic regression

*adjusted for age and sex, ** Statistical significant, P<0.05

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) กับจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) ด้วย chi-square test พบว่าภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำสัมพันธ์กับจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) โดยผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ขณะที่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะปกติ (normocitraturia) (ตารางที่ 19) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG มีโอกาสพบภาวะซีเทรตในปัสสาวะปกติสูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA หรือ AG อย่างมีนัยสำคัญ (AA+AG vs. GG, $P < 0.001$) แต่โอกาสพบภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AG หรือ GG เทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA (G dominance mode) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (AG+GG vs. GG, $P = 0.192$)

ในกลุ่มคนปกติไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ทั้งใน G codominance, G dominance และ G recessive modes (ตารางที่ 19) อย่างไรก็ตามพบแนวโน้มว่าผู้ที่มีการมีจีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ขณะที่ในกลุ่มผู้ที่มีการมีจีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะปกติ การไม่พบนัยสำคัญทางสถิติอาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่น้อย ($n = 62$) เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าจีโนไทป์ GG ในคนปกติสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ หรือจีโนไทป์ AA ในคนปกติเสี่ยงต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำหรือไม่ ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น

ผลการวิเคราะห์รวมทั้งสองกลุ่ม ได้ผลสรุปคล้ายกับในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต คือ จีโนไทป์ rs11567842 (A/G) สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.015$) และโอกาสพบภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ที่มีการมีจีโนไทป์ AA หรือ AG สูงกว่าในผู้ที่มีการมีจีโนไทป์ GG อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.004$) (ตารางที่ 19)

การศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าจีโนไทป์ GG ของ rs11567842 SNP ใน exon 12 ของยีน *NaDC-1* สัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าผู้ที่มีการมีจีโนไทป์ AA เสี่ยงต่อการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำสูงกว่าผู้ที่มีการมีจีโนไทป์ GG และผลการศึกษายังบ่งชี้ว่าลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของอัลลีล G น่าจะเป็นแบบ G recessive inheritance อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์เหล่านี้กับโรคนิ่วไต

ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำกับ rs11567842 (A/G) genotype ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและในคนปกติ

rs11567842(A/G) genotype	N	Citratric status (%)		P value
		Normocitratruria	Hypocitratruria	
Nephrolithiasis	114	28	86	
- AA	57	11(19)	46(81)	< 0.001*
- AG	39	6(15)	33(85)	
- GG	18	11(61)	7(39)	
- AA and AG	96	17(18)	79(82)	< 0.001* (vs. GG)
- AG and GG	57	17(30)	40(70)	0.192 (vs. AA)
Healthy	62	42	20	
- AA	31	21(68)	10(32)	0.661
- AG	25	16(64)	9(36)	
- GG	6	5(83)	1(17)	
- AA and AG	56	37(66)	19(34)	0.390 (vs. GG)
- AG and GG	31	21(68)	10(32)	1.000 (vs. AA)
Total	176	70	106	
- AA	88	32(36)	56(64)	0.015*
- AG	64	22(34)	42(66)	
- GG	24	16(67)	8(33)	
- AA and AG	152	54(36)	98(64)	0.004* (vs. GG)
- AG and GG	88	38(43)	50(57)	0.355 (vs. AA)

P values ได้จาก chi-square test

* มีนัยสำคัญทางสถิติ

การแสดงออกของ intrarenal NaDC-1 mRNA ในผู้ป่วยโรคไต และความสัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

การศึกษานี้ได้ตรวจวัดระดับ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต เพื่อตรวจสอบสมมติฐานว่า ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคไตน่าจะเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน *NaDC-1* ที่สูงขึ้นในเซลล์บุท่อไต ทำให้มีปริมาณโปรตีน NaDC-1 มากขึ้น แล้วส่งผลให้ดูดกลับซีเทรตที่ท่อไตส่วนต้นมากขึ้น ทำให้ปริมาณซีเทรตในปัสสาวะลดลง

ตารางที่ 20 แสดงกลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่ศัลยแพทย์เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (kidney biopsy) หลังการผ่าตัดเอาเนื้องอก ทั้งหมด 31 คน แบ่งเป็นชาย 9 คน (41%) หญิง 22 คน (59%) อายุเฉลี่ย 52 ปี (median: 54, range: 31-72) ค่า BMI เฉลี่ยเท่ากับ 23.3 (median: 23.2, range: 16.8-36.5) ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตที่ได้ถูกเก็บไว้ในสารรักษาสภาพ RNA ก่อนการสกัด total RNA และการตรวจวัดระดับ NaDC-1 mRNA

ตารางที่ 20 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไต

ลักษณะของกลุ่มประชากรศึกษา	กลุ่มผู้ป่วยโรคไต
จำนวนประชากร (n)	31
เพศ	
- ชาย	9 (29%)
- หญิง	22 (71%)
อายุ (ปี) (mean : SD)	52 : 11
(median : min-max)	54 : 31-72
BMI (kg/m ²) (mean : SD)	23.3 : 3.6
(median : min-max)	23.2 : 16.8-36.5

การวัดระดับ NaDC-1 mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตโดยใช้เทคนิค real time RT-PCR (Light Cycler, Roche, Mannheim, Germany) และใช้ β -2 microglobulin (B2M) เป็น reference gene คำนวณ relative mRNA expression ตามสูตร $\text{Relative mRNA expression} = 2^{-\Delta\Delta C_p}$ โดย C_p คือ crossing point ที่คำนวณได้จาก Light Cycler software ซึ่งค่า C_p ต่ำ

แสดงว่ามีระดับ mRNA สูง ผลการตรวจวัดระดับ NaDC-1 mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต แสดงในตารางที่ 21

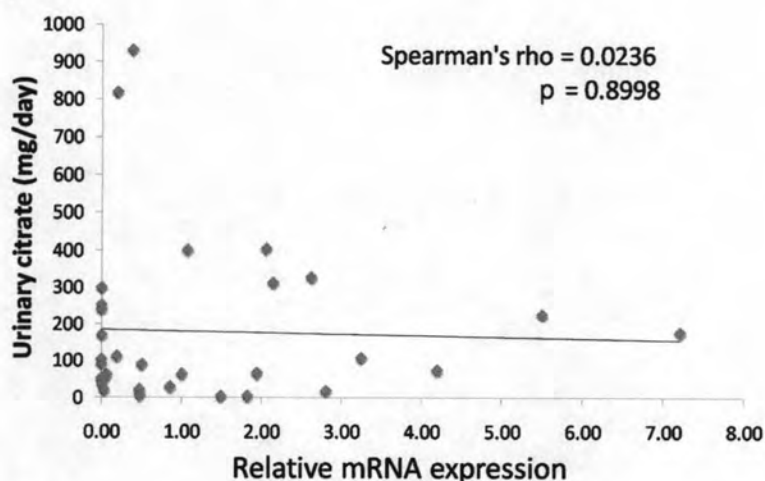
เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตกับระดับการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะ โดยใช้ Spearman's rank correlation test พบว่าระดับ NaDC-1 mRNA กับระดับการขับออกของซีเทรตปัสสาวะไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (Spearman's rho = 0.0236, P = 0.8998) (รูปที่ 11A) และเมื่อแยกพิจารณาเฉพาะผู้ป่วยโรคไตชนิดแคลเซียม พบว่าระดับ NaDC-1 mRNA กับระดับการขับออกของซีเทรตปัสสาวะไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (Spearman's rho = 0.1895, P = 0.4372) (รูปที่ 11B)

ตารางที่ 21 ระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไต
จำนวน 31 ราย

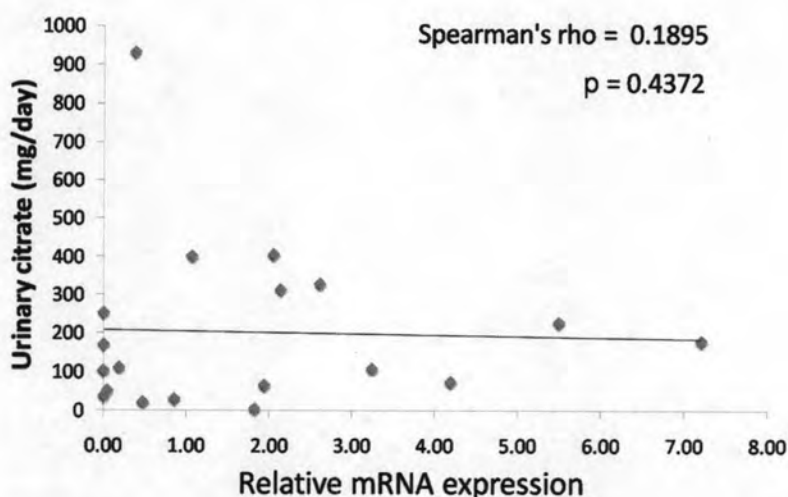
Cases	Age (years)	Gender	Cp values		Δ Cp	$\Delta\Delta$ Cp	Relative mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$)
			NaDC-1	B2M			
RKT-01	59	F	31.81	21.71	10.10	3.89	0.0675
RKT-02	50	F	22.68	16.70	5.98	-0.96	1.9453
RKT-03	54	F	21.40	15.50	5.90	-1.04	2.0562
RKT-04	66	F	24.17	15.58	8.59	2.38	0.1921
RKT-05	63	F	32.97	15.46	17.51	11.30	0.0004
RKT-06	61	F	22.32	17.60	4.72	-1.49	2.8089
RKT-07	61	F	20.85	15.98	4.87	-2.07	4.1989
RKT-08	43	F	23.30	16.87	6.43	0.22	0.8586
RKT-09	31	F	23.52	15.19	8.33	1.39	0.3816
RKT-10	62	F	31.45	16.74	14.71	8.50	0.0028
RKT-11	36	F	23.13	17.29	5.84	-1.10	2.1435
RKT-12	34	M	30.93	16.01	14.92	8.71	0.0024
RKT-13	31	F	20.11	16.02	4.09	-2.85	7.2100
RKT-14	43	F	22.10	16.03	6.07	-0.87	1.8277
RKT-15	50	M	20.44	15.96	4.48	-2.46	5.5022
RKT-16	68	F	31.72	16.89	14.83	8.62	0.0025
RKT-17	45	F	26.94	16.27	10.67	4.35	0.0490
RKT-18	47	M	23.23	15.93	7.30	0.98	0.5070
RKT-19	54	M	22.72	16.98	5.74	-0.58	1.4948
RKT-20	35	M	29.49	15.27	14.22	7.90	0.0042
RKT-21	56	M	21.80	17.18	4.62	-1.70	3.2490
RKT-22	46	F	23.56	17.34	6.22	-0.10	1.0718
RKT-23	51	F	31.46	15.87	15.59	9.27	0.0016
RKT-24	39	F	21.93	17.00	4.93	-1.39	2.6208
RKT-25	55	M	24.04	16.67	7.37	1.05	0.4830
RKT-26	67	F	22.47	15.08	7.39	1.07	0.4763
RKT-27	60	M	35.17	16.58	18.59	12.27	0.0002
RKT-28	60	M	22.56	16.25	6.31	-0.01	1.0070
RKT-29	51	F	24.75	16.08	8.67	2.35	0.1961
RKT-30	58	F	26.40	15.33	11.07	4.75	0.0372
RKT-31	72	F	29.99	16.48	13.51	7.19	0.0068
Median	54	M:F	23.52	16.25	7.37	1.05	0.48
(IQR)	(18)	9:22	(7.67)	(1.02)	(7.67)	(8.23)	(2.05)

M : male, F : female, Cp : crossing point, B2M : β -2 microglobulin

A : All stone types

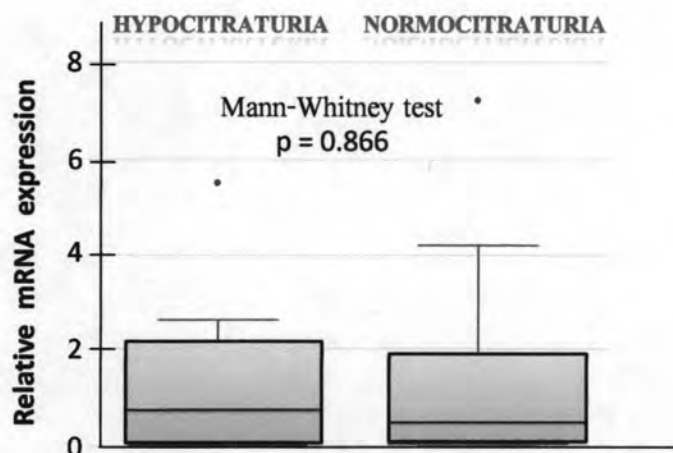


B : Ca stone



รูปที่ 11 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตกับปริมาณซิเตรตในปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต ภาพ A เป็นผลการวิเคราะห์หัตถ์ในทุกชนิด (n=31) ภาพ B เป็นผลการวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มผู้ป่วยนิ่วชนิดที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (n=19) การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตกับปริมาณซิเตรตในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญ

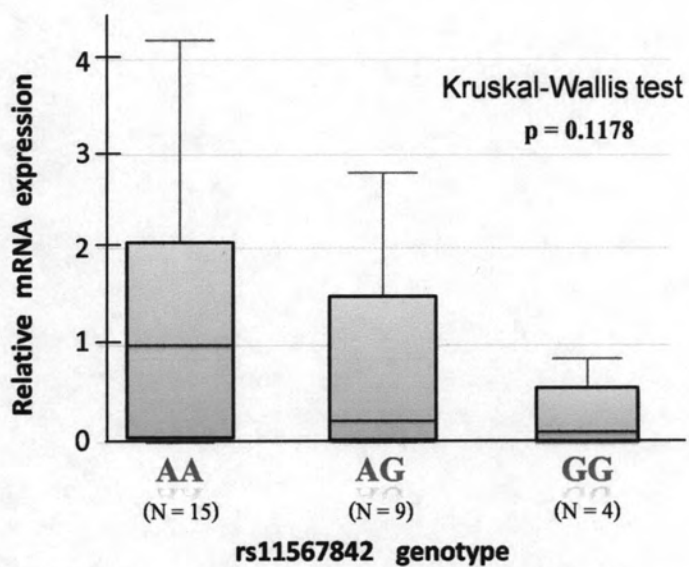
เมื่อเปรียบเทียบระดับ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำและกลุ่มที่มีระดับซิเตรตในปัสสาวะปกติ พบว่าการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีระดับซิเตรตในปัสสาวะปกติต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างนี้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney test, P = 0.866) (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia, n = 21) และกลุ่มที่มีระดับซีเทรตในปัสสาวะปกติ (normocitraturia, n = 10) ระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney test, P = 0.866)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของกับจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) 3 แบบ (รูปที่ 13) พบแนวโน้มว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA สูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AG และ GG ตามลำดับ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis test, P = 0.1178) ซึ่งอาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างน้อยเกินไป หากความสัมพันธ์นี้เป็นจริงในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น อาจสรุปได้ว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA มีผลต่อการแสดงออกของยีน *NaDC-1* ที่สูงขึ้นในท่อไต ทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน NaDC-1 มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการดูดซีเทรตกลับจากปัสสาวะมากขึ้น จนทำให้เกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

งานวิจัยนี้สรุปความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ rs11567842 (A/G) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ได้ว่าจีโนไทป์ AA เสี่ยงต่อการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ จีโนไทป์ GG ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ส่วนจีโนไทป์ AG มีความเสี่ยงปานกลางอยู่ระหว่างจีโนไทป์ AA และ GG



รูปที่ 13 ระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วัดเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA, AG และ GG พบแนวโน้มว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA สูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AG และ GG ตามลำดับ