

ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโซเดียมไคคาร์บอกซิเลตโคทรานสปอร์เตอร์-1 ใน
ผู้ป่วยไทยโรคนิวไต



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Sequence variations of the *Sodium-Dicarboxylate Cotransporter-1 (NaDC-1)* gene in
Thai patients with renal stones

Miss Pattarin Udomsilp



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโซเดียมไดคาร์บอกซิเลตโคทรานสปอร์เตอร์-1 ในผู้ป่วยไทยโรคนี้ว่า
โดย	นางสาวภัทริน อุดมศิลป์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อชฌาสัย ศิริตันติก)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม)

ภัทริน อุดมศิลป์ : ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโซเดียมไดคาร์บอกซิเลตโคทรานสปอร์ตเตอร์-1 ในผู้ป่วยไทยโรคนิ่วไต (Sequence variations of the *Sodium-Dicarboxylate Cotransporter-1 (NaDC-1)* gene in Thai patients with renal stones) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ศ.ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 65 หน้า.

ซิเทรตในปัสสาวะเป็นสารป้องกันการก่อผลึกนิ่วที่สำคัญ ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำเป็นปัจจัยเสี่ยงที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคนิ่วไตในประเทศไทย การดุกกลับของซิเทรตเกิดขึ้นที่บริเวณท่อไตส่วนต้นโดยอาศัยการทำงานของโปรตีน NaDC-1 การศึกษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตชาวญี่ปุ่นพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิด rs11567842 ในยีน *NaDC-1* สัมพันธ์กับการมีภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยไทยโรคนิ่วไตและความสัมพันธ์กับระดับของซิเทรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และโซเดียมในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนิ่วไต สำหรับงานวิจัยนี้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 158 ราย (อายุ 23-82 ปี, เพศชาย ร้อยละ 68.4) ที่เข้ารับการรักษาที่คลินิกศัลยกรรมทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ทำการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนของเม็ดเลือดขาวมาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ แล้วทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน coding regions ทั้งหมดของยีน *NaDC-1* ด้วยวิธี PCR-sequencing สำหรับสารประกอบในปัสสาวะ ได้แก่ ครีเอตินีน ซิเทรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และ โซเดียม ได้ทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีมาตรฐาน การศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์พบความหลากหลาย (single nucleotide polymorphism, SNP) เพียงหนึ่งตำแหน่ง ได้แก่ rs11567842 (c.1716A>G; p.I550V) ใน exon 12 โดยมีความถี่ของอัลลีล A และ G เท่ากับ 0.73 และ 0.27 ตามลำดับ ความถี่ของจีโนไทป์ AA, AG และ GG เป็นร้อยละ 51.9, 41.8 และ 6.3 ตามลำดับ ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ GG พบว่ามีระดับซิเทรต (158.41 vs 61.88 mg/gCr) โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และโซเดียมในปัสสาวะสูงกว่าจีโนไทป์ AA นอกจากนี้ ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.018) งานวิจัยนี้สรุปได้ว่า SNP rs11567842 (c.1716A>G) ของยีน *NaDC-1* สัมพันธ์กับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำของผู้ป่วยไทยโรคนิ่วไต

ภาควิชา ชีวเคมี

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674059230 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: NADC-1 / POLYMORPHISM / CITRATE / RENAL STONE PATIENTS

PATTARIN UDOMSILP: Sequence variations of the *Sodium-Dicarboxylate Cotransporter-1* (*NaDC-1*) gene in Thai patients with renal stones. ADVISOR: PROF.PIYARATANA TOSUKHOWONG, CO-ADVISOR: PROF.VORASUK SHOTELERSUK, M.D., 65 pp.

Citrate plays an important role in the prevention of renal stone formation. Hypocitraturia is a major metabolic stone risk factor in Thai renal stone patients. Regards that citrate is reabsorbed at renal proximal tubules via sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1), NaDC-1 activity is important for urinary citrate regulation. A previous study in a Japanese population suggested that a polymorphism, rs11567842, in *NaDC-1* gene was associated with hypocitraturic phenotype in recurrent kidney stone formers. We, here, investigated the sequence variations of *NaDC-1* and evaluated the association of its variations with the urinary citrate, potassium, magnesium, calcium and sodium levels in Thai renal stone patients. In this study, 158 Thai renal stone patients (aged 23-82 years old, 68.4% males) visited the Urology Clinic, Sunpasit Prasong Hospital, Ubon Ratchathani province were recruited. Blood and 24 hours urine were collected. The leukocyte genomic DNA was extracted and the sequence variation of *NaDC-1* was determined by PCR-sequencing. Urine parameter associated with stone formation including creatinine, citrate, potassium, magnesium, sodium, and calcium were measured using standard methods. PCR-sequencing the entire coding regions of *NaDC-1* identified only one polymorphism, rs11567842 (c.1716A>G; p.I550V) located in exon 12. The frequencies of the A and G alleles were 0.73 and 0.27, respectively. Of all 158 subjects, the AA, AG and GG genotypes were 51.9%, 41.8% and 6.3%, respectively. Kidney stone patients with GG genotype had higher urinary citrate levels than AA (wild-type) genotype (158.41 vs 61.88 mg/gCr). Moreover, patients with GG genotype also had higher levels of urinary potassium, magnesium, calcium and sodium excretions. The AA genotype in renal stone patients was significantly associated with the hypocitraturic phenotype ($P = 0.018$). In conclusion, the SNP rs11567842 (c.1716A>G) of *NaDC-1* gene was associated with citraturia in Thai patients with renal stones.

Department: Biochemistry

Field of Study: Medical Biochemistry

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาและอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ นายแพทย์ วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอนอย่างยิ่งเพื่อให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ที่สุด

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ที่ยินดีเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัชฌาสัย ศิริตันติกร อาจารย์ประจำภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อ.ดร. นพ. ฐิติณัฐ ดิษยบุตร และ ดร.รุ่งนภา อธิวิฑูมิ นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเวชพันธุศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และที่ทุกคนในห้องปฏิบัติการสำหรับความรู้และให้คำแนะนำปรึกษาที่มีประโยชน์มาโดยตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณะแพทย์ และพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพประสิทธิ์ ประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการคัดกรองผู้เข้าร่วมโครงการ และการเก็บสารตัวอย่างสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

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

ขอขอบพระคุณคุณพวงศักดิ์ พันธุ์สิน นักเทคนิคการแพทย์ หน่วยโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ช่วยในการวิเคราะห์ระดับครีเอตินินและแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะ

ขอขอบพระคุณ นางสาวชญานัฐ โพธิ์นอก นักวิเคราะห์สถิติ ฝ่ายบัญชีศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้ความรู้และคำปรึกษาการวิเคราะห์สถิติในงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านทั้งในและนอกภาควิชาชีวเคมี ที่ช่วยเหลือ ให้ความเมตตา ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ขอขอบพระคุณ ทุนการศึกษาระหว่างเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ ทุนอุดหนุน การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณเพื่อนๆในห้องทดลองทุกคน ที่คอยให้คำปรึกษาและให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	5
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	5
1.5 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	5
1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย	6
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.8 วิธีดำเนินการวิจัย.....	7
1.9 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
บทที่ 2	8
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 โรคนิ่วไต (Renal stone disease หรือ nephrolithiasis)	8
2.2 ซิเตรต (citrate).....	10
2.3 Sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1)	13

2.4 ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรคนี้ว่าไต	15
บทที่ 3	19
วิธีดำเนินการวิจัย	19
3.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population).....	19
3.2 ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size).....	21
3.3 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	21
3.4 การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ	23
3.5 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	24
3.5.1 การสกัด genomic DNA จากสารตัวอย่าง buffy coat	24
3.5.2 การเพิ่มปริมาณยีน <i>NaDC-1</i> โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	25
3.5.3 การตรวจสอบ PCR products โดยวิธี Agarose gel electrophoresis	28
3.5.4 การวิเคราะห์หาลำดับเบส (DNA sequencing)	28
3.5.5 การหาความแตกต่างของลำดับเบส.....	28
3.5.6 การตรวจวัดระดับซีเทรตในปัสสาวะ	28
3.5.7 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในปัสสาวะ	29
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	29
บทที่ 4	32
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	32
4.1 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา	32
4.2 ผลการวิเคราะห์ Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.....	33
4.3 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนี้ว่าไต	35
4.4 ผลการวิเคราะห์ความชุกของปัจจัยเสี่ยงต่างๆของโรคนี้ว่าไตในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ว่าไต	35

4.5 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NaDC-1</i> ในผู้ป่วยไทย โรคนิวไทด์.....	36
4.6 ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของ rs11567842 ใน กลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไทด์	37
4.7 ผลการวิเคราะห์ระดับของซีเทรตในปัสสาวะตามจีโนไทป์ของ rs11567842.....	38
4.8 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะซีเทรตใน ปัสสาวะต่ำ	39
4.9 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NaDC-1</i> (rs11567842) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ.....	39
4.10 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างซีเทรตกับแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะ	40
4.11 ผลการวิเคราะห์ระดับของแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะตามจีโนไทป์ของ rs11567842	42
4.12 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะความผิดปกติ ทางแม่แทบอลิกต่างๆ.....	43
4.13 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NaDC-1</i> กับระดับของแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนิวไทด์ (rs11567842).....	46
4.14 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NaDC-1</i> (rs9890678) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ	49
บทที่ 5	51
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	51
5.1 สรุปผลการวิจัย	51
5.2 อภิปรายผล	52
5.3 ข้อเสนอแนะ	56
รายการอ้างอิง	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	65

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	21
ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	22
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน <i>NaDC-1</i>	26
ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการทำ PCR.....	27
ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR.....	27
ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยโรคนิวไทและคนปกติสำหรับการวิเคราะห์ ROC.....	33
ตารางที่ 7 แสดงปริมาณซีเทรตในปัสสาวะและความชุกของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ	33
ตารางที่ 8 แสดงค่าวินิจฉัยตามค่า cut off ของปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ.....	34
ตารางที่ 9 ความเสี่ยงของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนิวไท.....	35
ตารางที่ 10 แสดงความชุกของความผิดปกติทางเมแทบอลิกในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไท และค่า cut off	36
ตารางที่ 11 แสดงการกระจายตัวของความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของ rs11567842 ในกลุ่ม ผู้ป่วยโรคนิวไท	38
ตารางที่ 12 แสดงจีโนไทป์และระดับของซีเทรตในปัสสาวะ (mg/gCr).....	38
ตารางที่ 13 แสดงความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ...	39
ตารางที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NaDC-1</i> (rs11567842) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ.....	40
ตารางที่ 15 จีโนไทป์และระดับของแร่ธาตุในปัสสาวะ (mg/gCr).....	43
ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะความ ผิดปกติทางเมแทบอลิกต่างๆ.....	45
ตารางที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NaDC-1</i> (rs11567842) กับภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกต่างๆ	48
ตารางที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>NaDC-1</i> (rs9890678) กับภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกต่างๆ	50

ตารางที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบค่าความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของ rs11567842 ของยีน

NaDC-1 54



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงถึงโครงสร้างโมเลกุลของกรดซิทริกและโมเลกุลของซิเทรต.....	11
ภาพที่ 2 แสดงถึงการดูดซึมและเมแทบอลิซึมของซิเทรตบริเวณ proximal tubule.....	12
ภาพที่ 3 การกระจายตัวตามเนื้อเยื่อต่างๆของ SLC13 dicarboxylate/citrate transporters	14
ภาพที่ 4 ภาพจำลองโครงสร้างสองมิติของ NaDC1.....	15
ภาพที่ 5 กราฟ ROC เกิดจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราผลบวกจริงและอัตราผลบวกเท็จ ..	31
ภาพที่ 6 แสดงกราฟ ROC ของระดับซิเทรตในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตจำนวน 158 คน และคนปกติจำนวน 128 คน	34
ภาพที่ 7 DNA sequencing profile	37
ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับของซิเทรตและแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะ.....	41



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคนิ่วไต (Kidney stones, Renal stones, Renal calculi, หรือ Nephrolithiasis) เป็นโรคที่เกิดจากการตกผลึกของสารก่อนิ่วบริเวณเนื้อไต กรวยไต และท่อไต อุบัติการณ์ของการเกิดโรคนิ่วไตนั้นมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆทั่วทุกภูมิภาคของโลกโดยพบความชุกของโรคนิ่วไตในประชากรทั่วโลกตั้งแต่ร้อยละ 1 – 20 (1-6) ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของโรคนิ่วไตสูงถึงร้อยละ 16.9 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (7) โดยที่สำคัญนั้นโรคนิ่วไตยังเป็นโรคที่มีอัตราการเกิดซ้ำสูง (recurrent stone) ภายหลังจากการเข้ารับการรักษาทั้งการสลายนิ่วหรือการผ่าตัดโดยมีโอกาสดังกล่าวซ้ำร้อยละ 10 ภายในปีแรก ร้อยละ 50 ภายใน 10 ปี และร้อยละ 95 ภายใน 25 ปี (8) การที่มีนิ่วอยู่ในระบบทางเดินปัสสาวะสามารถทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนอื่นๆตามมา เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การทำงานของไตเสื่อมลง และอาจเกิดภาวะไตวายเรื้อรังได้ในที่สุด (9) ดังนั้นโรคนิ่วไตจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ

สำหรับปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิก (metabolic risk factor) ที่ทำให้เกิดโรคนิ่วไตเกิดจากความผิดปกติของสมดุลสารก่อนิ่ว (stone promoters/ lithogenic substances) และสารยับยั้งนิ่ว (stone inhibitors/ stone modulators) ภาวะที่มีสารก่อนิ่วซึ่งมีอยู่ในปัสสาวะตามปกติปริมาณมากเกินไปโดยสารก่อนิ่วเหล่านี้ได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาเลต กรดยูริก โซเดียม และโปรตอน เป็นต้น หรือภาวะที่มีสารยับยั้งการก่อนิ่วปริมาณน้อย ซึ่งสารยับยั้งการก่อนิ่วจะลดโอกาสในการเกิดผลึกและลดการเกิดนิ่วได้ สารยับยั้งการก่อนิ่วเหล่านี้ ได้แก่ กลุ่มสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เช่น ซิเตรต แมกนีเซียม โพแทสเซียม และ ไพรอเฟอเฟต เป็นต้น หรือสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ไกลโคโปรตีน เป็นต้น ร่วมกับปัจจัยเสริมคือ ปริมาตรของปัสสาวะน้อย และ pH ต่ำจะส่งผลให้เกิดภาวะอิ่มตัวของสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่วโดยเฉพาะเกลือแคลเซียม และเมื่อมีปริมาณสารมากเกินไปกว่าจุดอิ่มตัวทำให้เกิดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) ของสารก่อนิ่วเหล่านี้ในปัสสาวะ ทำให้สามารถรวมตัวกันเกิดผลึกนิ่วขนาดเล็ก และมีการรวมกลุ่มของผลึกจนกลายเป็นก้อนผลึกแข็ง และมีขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่วอุดตันที่บริเวณต่างๆของทางเดินปัสสาวะ (10) โดยภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคนิ่วไตในต่างประเทศแถบทวีปยุโรปและสหรัฐอเมริกา มักจะพบภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) และภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) (11) ในทางกลับกันหลาย

การศึกษาในประเทศไทยกลับพบ 2 ภาวะในอัตราต่ำกว่าที่มีรายงานในต่างประเทศ ในผู้ป่วยโรคนี้วัด
ในประเทศไทยกลับพบภาวะที่มีการลดลงของสารยับยั้งนี้วในปีสภาวะในอัตราที่สูงกว่า ได้แก่ ภาวะ
ซีเทรตในปีสภาวะต่ำ (hypocitraturia) และภาวะโพแทสเซียมในปีสภาวะต่ำ (hypokaliuria) พบ
มากกว่าร้อยละ 80 และภาวะแมกนีเซียมในปีสภาวะต่ำ (hypomagnesiuria) พบมากกว่าร้อยละ 60
(12, 13)

ความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยโรคนี้วัดในประเทศไทย ได้แก่ ภาวะ
ซีเทรตในปีสภาวะต่ำ (hypocitraturia) ซึ่งคือภาวะที่มีการลดลงของระดับของซีเทรตในปีสภาวะ โดย
เป็นภาวะที่ปริมาณการขับออกของซีเทรตในปีสภาวะน้อยกว่า 320 มิลลิกรัมต่อวัน (1.67 มิลลิโมลต่อ
วัน) ในชาวตะวันตก (14) และน้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวันในประชากรไทย (15) แต่อย่างไรก็ตาม
ค่า normal range หรือ cut off ของปริมาณซีเทรตในปีสภาวะมีความแปรผันไปตามแต่ละห้อง
ปฏิบัติการวิจัย อุบัติการณ์ของภาวะซีเทรตในปีสภาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนี้วัดสำหรับการเกิดนิ่วชนิด
แคลเซียมมีรายงานในต่างประเทศมีความแปรผันตั้งแต่ร้อยละ 20-60 (16) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่าน
มาของกลุ่มวิจัยโรคนี้วัดคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยร่วมกับคณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่นพบว่าผู้ป่วยโรคนี้วัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีภาวะ
hypocitraturia หรือมีระดับของซีเทรตในปีสภาวะต่ำกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน สูงถึงร้อยละ 92 (17)
และเมื่อเร็ว ๆ นี้ในการศึกษาคลินิกระยะที่ 2 ก็ยังพบสูงถึงร้อยละ 85 นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะซีเทรต
ในปีสภาวะต่ำยังสัมพันธ์กับการเกิดนิ่วไตซ้ำ (12, 18, 19) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าภาวะซีเทรตในปีสภาวะต่ำ
เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในผู้ป่วยโรคนี้วัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และยังไม่
มีรายงานการศึกษาถึงสาเหตุที่แท้จริง (idiopathic) ของการเกิดภาวะซีเทรตในปีสภาวะต่ำในผู้ป่วยโรค
นี้วัด

ซีเทรตที่พบในปีสภาวะนั้นจัดเป็นสารป้องกันการก่อผลึกนิ่วที่สำคัญ จากโครงสร้างของ
โมเลกุลซีเทรตที่เป็น tricarboxylic มีประจุลบ 3 จึงสามารถจับเป็นสารเชิงซ้อนกับแคลเซียมแล้วทำ
ให้เกิด calcium citrate complex ที่สามารถละลายน้ำได้ดี ทำให้มีแคลเซียมอิสระเหลือน้อยที่จะไป
จับกับออกซาเลตและฟอสเฟต ส่งผลทำให้ไปยับยั้งการเกิดภาวะอิมตัวยวดยิ่งของแคลเซียมและ
ป้องกันการเกิดผลึกนิ่วขนาดเล็ก (nucleation) ของแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟต (20)
ซีเทรตที่ผ่านการกรองจากโกลเมอรูลัสเข้าสู่ท่อไต (tubular lumen) จาก citrate³⁻ จะถูก
protonate กลายเป็น citrate²⁻ แล้วจะถูกดูดกลับเข้าเซลล์ท่อไต (tubular cell) ผ่านโปรตีนขนส่ง
sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1) ที่มีการแสดงออกบริเวณ apical
membrane ของ proximal tubule ทำหน้าที่ขนส่งซีเทรตในรูป citrate²⁻ เข้าเซลล์ร่วมกับโซเดียม
(Na⁺) โดยนำซีเทรตเข้าเซลล์หนึ่งโมเลกุลพร้อมกับโซเดียม 3 โมเลกุล (1 citrate²⁻ : 3 Na⁺) การขับ

ออกของซิเทรตในปัสสาวะนั้นขึ้นกับการทำหน้าที่ของโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ถ้าสามารถดูดซิเทรตกลับ (reabsorption) เข้าสู่เซลล์บุท่อไตเพิ่มขึ้น ผลก็คือซิเทรตในปัสสาวะจะลดต่ำลง

ในมนุษย์ยีน *NaDC-1* อยู่บนโครโมโซมที่ 17 (chr 17p13.2) ประกอบด้วย 12 exons ความยาวของ mRNA เท่ากับ 1952 เบส (NM_003984) ซึ่งแปลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 593 กรดอะมิโน ประกอบด้วย 11 transmembrane domains ในปัจจุบันนี้มีรายงานศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single nucleotide polymorphism, SNP) ในยีน *NaDC-1* พบทั้งหมด 125 SNPs แต่มีเพียง 8 SNPs เท่านั้นที่อยู่ในส่วนของ coding regions ซึ่งรวมไปถึง p.I550V polymorphism (rs11567842) โดยคาดว่า polymorphism เหล่านี้จะทำให้การทำงานของโปรตีน NaDC-1 เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้ความเข้มข้นของซิเทรตและซักซิเนตในปัสสาวะเกิดความผิดปกติไป ดังนั้นผลของ physiological ที่ตามมาในภายหลังนั้นอาจจะทำให้นิ่วไตเกิดการพัฒนามากยิ่งขึ้น (21) จาก SNPs ทั้งหมดนี้มีรายงานการศึกษาของ Okamoto และคณะ พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน *NaDC-1* ที่ exon 12 ได้แก่ p.I550V polymorphism สัมพันธ์กับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะ (22)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำและผลต่อการทำงานของโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ที่สูงขึ้น (high activity) ได้แก่ ความผิดปกติทางเมแทบอลิก (metabolic abnormalities) หลายอย่าง ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะ เช่น ภาวะกรดเกิน (metabolic acidosis) (23) ภาวะที่มีโพแทสเซียมลดลง (potassium depletion) (24) และภาวะการขาดอาหาร (starving) (25) แต่อย่างไรก็ตามยังพบภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำอย่างเดี่ยวในผู้ป่วยโรคนิ่วไตชนิดที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (calcium stone) โดยที่ไม่พบความผิดปกติทางเมแทบอลิกอื่นได้ (26) นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำนั้นมีรายงานการศึกษาว่ามาจากการอาหารที่บริโภคได้แก่การกินอาหารที่มีซิเทรตและโพแทสเซียมต่ำ กินคาร์โบไฮเดรตสูงและกินไขมันต่ำ แต่อย่างไรก็ตามในหลายการศึกษานั้นทำการวัดปริมาณซิเทรตในปัสสาวะโดยที่มีการควบคุมอาหารแล้วก็ยังพบว่าในผู้ป่วยโรคนิ่วไตก็ยังคงมีระดับของซิเทรตในปัสสาวะที่ต่ำกว่าคนปกติ (26-28) จากงานวิจัยของศาสตราจารย์ปิยะรัตน์และคณะพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคนิ่วไตทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยร้อยละ 31.94 ($P < 0.001$) มีประวัติการเป็นนิ่วของคนในครอบครัว (29) นอกจากนี้จากการศึกษาวิจัยของสุชายและคณะ พบว่าความเสี่ยงของการเป็นโรคนิ่วไตจะสูงขึ้นในครอบครัวที่มีประวัติการเป็นนิ่วเปรียบเทียบกับครอบครัวที่ไม่มีประวัติการเป็นโรคนิ่วไต โดยในครอบครัวที่มีประวัติการเป็นนิ่วมีค่า first degree relative สูงเป็น 3.18 เท่าของครอบครัวที่ไม่มีประวัติการเป็นโรคนิ่วไต (30) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคนิ่วไต แต่สาเหตุที่แท้จริงของภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำยังไม่ทราบแน่ชัด

มีหลายรายงานการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะนั้นพบว่าเกิดจากหลากหลายปัจจัยทั้งปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมและจากสิ่งแวดล้อม มีการศึกษาพบว่าในชาวตะวันตกจะมีการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะสูงกว่าในชาวเอเชีย (31) นอกจากนี้ยังพบว่าการแนะนำเกี่ยวกับปริมาณโพแทสเซียมซิเทรตที่เหมาะสมในการให้ต่อครั้งสำหรับชาวตะวันตกที่มีภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ เมื่อนำมาใช้แก้ไขภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนี้วไตเชื้อชาติอื่นโดยใช้โพแทสเซียมซิเทรตปริมาณที่เท่ากัน ผลที่ได้กลับไม่สามารถแก้ไขภาวะนี้ได้ในคนเชื้อชาติอื่น (32-34) จนถึงปัจจุบันยังไม่รายงานการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* และปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของผู้ป่วยนี้วไตในประเทศไทย

รายงานการศึกษาพบว่าปริมาณซิเทรตในปัสสาวะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโพแทสเซียมและแมกนีเซียมในปัสสาวะ ซึ่งทั้งสามนี้จัดเป็นสารป้องกันการก่อผลึกนี้วไตที่สำคัญ (17) ในหนูทดลองที่ให้กินอาหารที่มีโพแทสเซียมต่ำ พบว่าระดับการขับออกของซิเทรตลดลงและ *NaDC-1* activity เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการดูดกลับซิเทรตเพิ่มขึ้น (24) นอกจากนี้ภาวะที่มีการขาดแมกนีเซียมสัมพันธ์กับการขับออกของซิเทรตที่ลดลง (13) การให้แมกนีเซียมเพิ่มเติมในผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีภาวะขาดแมกนีเซียมจะทำให้มีการขับออกของซิเทรตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (13) แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างระดับของซิเทรตในปัสสาวะกับแคลเซียมหรือโซเดียมว่ามีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดนี้วไตนั้นยังคงไม่มีผลสรุปที่แน่ชัด

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยไทยโรคนี้วไต เพื่อจะวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* และเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับระดับของซิเทรตและแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม ในผู้ป่วยไทยโรคนี้วไต โดยผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าน่าจะพบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* และความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* น่าจะมีความสัมพันธ์กับระดับของซิเทรตในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนี้วไต ผลการศึกษานั้นอาจทำให้ทราบถึงบทบาทของ *NaDC-1* มากขึ้นซึ่งนำไปสู่การเข้าใจสาเหตุของการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยไทยโรคนี้วไตมากยิ่งขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิก เช่น การประเมินความเสี่ยงทางพันธุกรรมต่อภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ และเป็นประโยชน์ต่อการแนะนำเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การดำเนินชีวิตของผู้ป่วยได้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยไทยโรคนิวไต
2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับระดับของซีเทรตและแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนิวไต

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาว และปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ป่วยโรคนิวไตในโครงการวิจัย เรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรমনาวงต่อการป้องกันการเกิดนิวซ้ในผู้ป่วยโรคนิวไต” ซึ่งยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมืออื่นๆ
2. สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาว และปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ป่วยโรคนิวไตในโครงการวิจัย เรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรมนาวงต่อการป้องกันการเกิดนิวซ้ในผู้ป่วยโรคนิวไต” ยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ

1.5 ข้อจำกัดของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ของตัวอย่างกลุ่มควบคุม จึงทำให้ไม่สามารถเทียบผลที่อาจเกิดขึ้นว่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* นี้เกี่ยวข้องกับการนิวไตหรือไม่

1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Sequence variations คือ ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์
2. Sodium-Dicarboxylate Cotransporter-1 (NaDC-1) คือโปรตีนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ พบมากในเซลล์บุท่อไตส่วนต้น (renal proximal tubular cell) อยู่บนผิวเซลล์ด้านที่สัมผัสกับปัสสาวะ (luminal side/ apical surface) ทำหน้าที่หลักในการขนส่งซิเตรตจากปัสสาวะเข้าสู่เซลล์บุท่อไต
3. Nephrolithiasis หรือ kidney stones หรือ renal stones คือโรคนิ่วไต ซึ่งมีก้อนนิ่วอยู่บริเวณตำแหน่งที่กรวยไต (renal pelvis) และสูงกว่ากรวยไตขึ้นไป
4. Hypocitraturia คือ ภาวะที่มีซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน ในคนไทย หรือภาวะที่มีซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่า 320 มิลลิกรัมต่อวัน ในชาวตะวันตก
5. DNA sequencing คือ การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับระดับของซิเตรตและแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะของผู้ป่วยไทยโรคนิ่วไต
2. เพื่อให้เข้าใจการบทบาทของ *NaDC-1* มากขึ้นซึ่งนำไปสู่การเข้าใจสาเหตุของการเกิดภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยไทยโรคนิ่วไตมากยิ่งขึ้น
3. เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิก เช่น ประเมินความเสี่ยงทางพันธุกรรมต่อภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ และเป็นประโยชน์ต่อการแนะนำเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมดำเนินชีวิตของผู้ป่วยได้ต่อไปในอนาคต

1.8 วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้าร่วมในแผนงานวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาจากมะนาวผงของไทยเพื่อการรักษาโรคนิ่วไต” (Research and development of lime powder regimen for medical treatment of kidney stone disease) ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผงต่อการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” (Phase III clinical trial of lime powder regimen in patients with kidney stone for prevention of recurrent stone formation) ของ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และคณะ ประชากรผู้ป่วยโรคนิ่วไต ทั้งหมดจำนวน 158 ราย ทำการรวบรวมสารตัวอย่างเม็ดเลือดขาว และปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โดยตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NaDC-1 โดยใช้วิธี direct sequencing ส่วนตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจะนำมาวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในปัสสาวะ ได้แก่ ซีเทรต และครีเอตินิน โปแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม โดยใช้วิธีมาตรฐาน

1.9 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์
2. จัดทำนิพนธ์ต้นฉบับ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) ส่วนหนึ่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ และอีกส่วนหนึ่งตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารยูโร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคนิ่วไต (Renal stone disease หรือ nephrolithiasis)

อุบัติการณ์ของการเกิดโรคนิ่วไตนั้นมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆทั่วทุกภูมิภาคของโลกโดยพบความชุกของโรคนิ่วไตในประชากรทั่วโลกตั้งแต่ร้อยละ 1 – 20 (4) ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของโรคนิ่วไตสูงถึงร้อยละ 16.9 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (7) ที่สำคัญโรคนิ่วไตนั้นยังเป็นโรคที่มีอัตราการเกิดซ้ำสูง ภายหลังจากการเข้ารับการรักษาทั้งการสลายนิ่วหรือการผ่าตัด ดังนั้นโรคนิ่วไตจึงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ

โรคนิ่วไตนั้นมีหลายชนิดสามารถจำแนกได้ตามสารเคมีหรือแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของผลึกในก้อนนิ่วโดยแบ่ง 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่

1. นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (calcium stones) เป็นนิ่วที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบหลักโดยแคลเซียมนั้นจะไปรวมตัวกับสารที่มีประจุลบเกิดเป็นสารประกอบได้หลายชนิด โดยสารประกอบต่างๆเหล่านี้จะเกิดการตกผลึกและรวมตัวเป็นก้อนนิ่วได้หลายชนิดเมื่อปัสสาวะเกิดการอิ่มตัวยิ่งยวด โดยนิ่วชนิดนี้พบมากที่สุดทั่วโลกประมาณร้อยละ 80 ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate, CaOx) นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate, CaP) รวมทั้งนิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟต และนิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก
2. นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (non-calcium stones) ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (uric acid stone) นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือนิ่วสตรูไวท์ (infection stone หรือ struvite) และนิ่วซิสทีน (cystine stone) เป็นต้น

นอกจากพบสารอนินทรีย์ที่อยู่ในผลึกซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่มีประมาณร้อยละ 95 ยังพบสารประกอบอินทรีย์เรียกว่า stone matrix หรือ organic matrix ซึ่งมีประมาณร้อยละ 2-5 ของน้ำหนักแห้งของก้อนนิ่ว สารอินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรืออาจอยู่ในรูปของไกลโคโปรตีนและไกลโคลิปิด เป็นต้น สารเหล่านี้พบได้ในระบบทางเดินปัสสาวะซึ่งอาจมีแหล่งกำเนิดทั้งจากพลาสมาและจากเซลล์ไตสร้าง

ขึ้นเอง โดยพบว่าสารอินทรีย์ในก้อนนิ่วจะมีปริมาณแตกต่างกันตามชนิดของนิ่ว โดยทั่วไปพบว่าสารชีวโมเลกุลทั้งใน stone matrix ของก้อนนิ่วหรือบริเวณด้านนอกของก้อนนิ่ว ได้แก่ prothrombin fragment 1 (UPTF1), osteopontin, albumin, Tamm-Horsfall protein และ glycosaminoglycans เป็น hyaluronic acid, chondroitin sulphate, heparin sulphate เป็นต้น สารโมเลกุลใหญ่เหล่านี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดผลึกนิ่วและส่วนน้อยกระตุ้นให้เกิดผลึกนิ่ว

กลไกการเกิดนิ่วไต (stone formation) เกิดขึ้นจากผลึกในปัสสาวะ โดยผลึกนั้นเกิดการอิมัลชันของสารก่อนิ่ว และเกิดการตกผลึกของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ผลึกบางส่วนนั้นสามารถขับออกไปทางปัสสาวะได้ แต่ผลึกอีกส่วนจะถูกนำเข้าสู่เซลล์บุท่อไต (internalization/endocytosis) สารก่อนิ่วและผลึกนิ่วสามารถทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุท่อไตให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเช่น reactive oxygen species (ROS) ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เนื่องจากเซลล์บุท่อไตถูกทำลายจาก ROS ที่เกิดขึ้น ROS ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลอื่นๆภายในเซลล์บุท่อไต ทำให้เกิดการติดค้างของผลึกในท่อไต (crystal retention/ crystal deposit) จนผลึกรวมตัวกันมากขึ้น (crystal aggregation) และกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการอักเสบ (inflammation) และภาวะ renal fibrosis ตามมาอีกด้วย ภายหลังจากนั้นจะทำให้ไตสูญเสียการทำงาน (renal dysfunction)

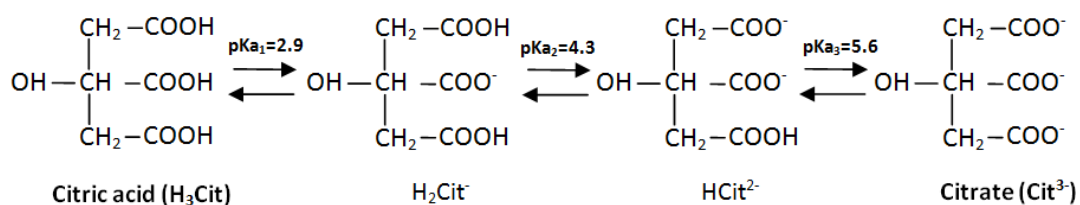
โรคนิ่วไตเป็นโรคที่ซับซ้อน (complex disease) มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยโดยปัจจัยเสี่ยงของโรคนิ่วไตเหล่านี้มีผลต่ออุบัติการณ์การเกิดนิ่วซ้ำและความชุกของการเกิดโรคนิ่วไต ปัจจัยเสี่ยงภายใน (intrinsic factors) ได้แก่ พันธุกรรม เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย (Body Mass Index; BMI) เชื้อชาติ (race/ ethnicity) เป็นต้น ปัจจัยเสี่ยงภายนอก (extrinsic factors) ได้แก่ อาหาร ภูมิอากาศ อาชีพ ยาบางชนิด ความเครียด เป็นต้น ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิก (metabolic risk factor) เกิดจากความผิดปกติของสมดุลสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ การที่มีสารก่อนิ่วในปัสสาวะมากขึ้น เช่น ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (hyperuricosuria) ภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง (hyperphosphaturia) และการที่มีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะลดลง เช่น ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) ภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypomagnesiuria) ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) และภาวะสมดุลของกรดต่างๆที่ผิดปกติ ความผิดปกติทางเมแทบอลิกเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อการอิมัลชันของสารก่อนิ่วในปัสสาวะจนเกิดภาวะอิมัลชัน และเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกขึ้นในปัสสาวะ (crystaluria) โดยภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคนิ่วไตในประเทศไทย คือ การลดลงของสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ ภาวะซิเตรตใน

ปัสสาวะต่ำ และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (15) ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมทั้งหมดนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งในการก่อให้เกิดนิ่วโดยอาจพบความผิดปกติภาวะเดียวและความผิดปกติหลายภาวะร่วมกันได้

สาเหตุหลักที่สำคัญของการเกิดนิ่วไตนั้นเกิดได้จากภาวะที่มีปริมาณสารก่อนิ่วมากผิดปกติ หรือมีปริมาณสารยับยั้งนิ่วน้อย และมีปัจจัยเสริมคือ ปริมาตรของปัสสาวะน้อย หรือมีทั้ง 3 ภาวะร่วมกัน ส่งผลให้เกิดภาวะอิ่มตัววดยิ่งของสารก่อนิ่วเหล่านี้ในปัสสาวะทำให้สามารถรวมตัวกันจนกลายเป็นก้อนผลึกแข็งและมีขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่วอุดตันที่บริเวณต่างๆของทางเดินปัสสาวะ อย่างไรก็ตามความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมในผู้ป่วยโรคนี้ในประเทศไทยจะแตกต่างจากความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบในต่างประเทศที่มีรายงานพบว่าความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบได้บ่อยคือภาวะที่มีปริมาณสารก่อนิ่วผิดปกติ ซึ่งได้แก่ ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง และภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง โดยพบมากกว่าร้อยละ 50 และร้อยละ 20-30 (35) ตามลำดับ แต่ในทางกลับกันในประเทศไทยจะพบภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง และภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง ที่ต่ำกว่าโดยพบเพียงร้อยละ 5.9 และร้อยละ 8.8 ตามลำดับ (15) แต่พบการลดลงของสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะคือ ภาวะซิเตรต และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำมากกว่าร้อยละ 80 และภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำมากกว่าร้อยละ 60 (12, 13, 15)

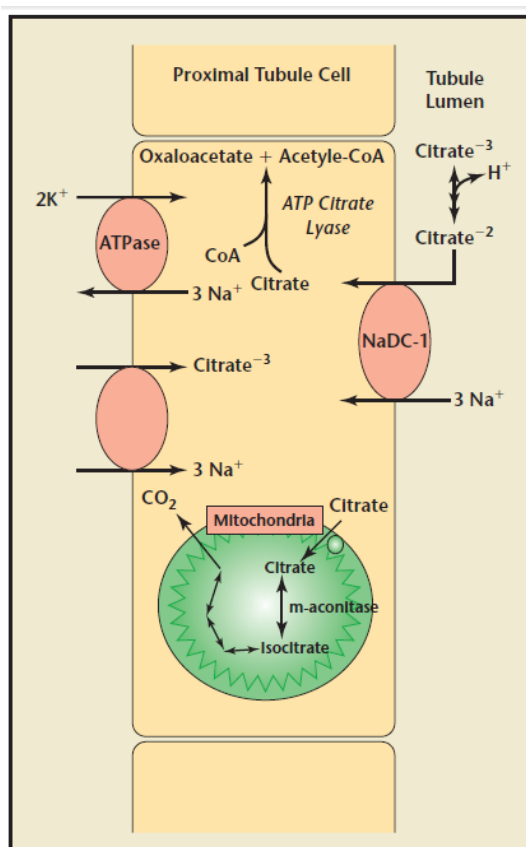
2.2 ซิเตรต (citrate)

ซิเตรต เป็นเกลือของกรดซิทรिक (citric acid) (รูปที่ 1) มีน้ำหนักโมเลกุล 192 โมเลกุลของกรดซิทรिकประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) 3 หมู่ (tricarboxylic acid) และมีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ (monohydroxyl) โดยหมู่คาร์บอกซิลิกทั้ง 3 หมู่จะมีค่าการแตกตัวต่างกันดังนี้ $pK_{a1} = 2.9$, $pK_{a2} = 4.3$ และ $pK_{a3} = 5.6$ เนื่องจากในพลาสมามีค่า pH เท่ากับ 7.4 และปัสสาวะในคนปกติมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 8.0 ดังนั้นกรดซิทรिकจึงแตกตัวเต็มที่เป็นซิเตรตซึ่งจะอยู่ในรูปที่ไม่มีโปรตอนจับอยู่ และส่งผลให้มีประจุสุทธิส่วนใหญ่เท่ากับ -3 สามารถที่จะจับรวมกับสารประจุบวกต่างๆในของเหลวของร่างกาย ได้แก่ โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ได้อย่างมีประสิทธิภาพและทำให้ละลายน้ำได้ดีมาก (36) ดังนั้นซิเตรตจึงมีบทบาทที่สำคัญในการยับยั้งการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะ ซิเตรตที่พบในปัสสาวะนั้นจัดเป็นสารป้องกันการก่อผลึกนิ่วที่สำคัญโดยซิเตรตจะจับเป็นสารเชิงซ้อนกับแคลเซียมซึ่งจะไปยับยั้งการเกิดภาวะอิ่มตัววดยิ่งของแคลเซียมและป้องกันการเกิดผลึกนิ่วขนาดเล็กของแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟต (20)



ภาพที่ 1 แสดงถึงโครงสร้างโมเลกุลของกรดซิตริกและโมเลกุลของซิเตรต

กลไกการดูดซึมซิเตรตในระบบปัสสาวะที่เซลล์บุท่อไตนั้นเริ่มจากซิเตรตที่ผ่านการกรองจากโกลเมอรูลัส เมื่อมาสู่ยังท่อไตจาก citrate³⁻ จะถูก protonate กลายเป็น citrate²⁻ แล้วจะถูกดูดกลับเข้าเซลล์บุท่อไตผ่านโปรตีนขนส่ง sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1) ที่มีการแสดงออกบริเวณ apical membrane ของ proximal tubule ทำหน้าที่ขนส่งซิเตรตในรูป citrate²⁻ เข้าเซลล์ร่วมกับโซเดียม (Na⁺) โดยนำซิเตรตเข้าเซลล์หนึ่งโมเลกุลพร้อมกับโซเดียม 3 โมเลกุล (1 citrate²⁻ : 3 Na⁺) ผลรวมสุทธิของประจุเท่ากับประจุบวก 1 ต่อ 1 cycle เมื่อซิเตรตผ่านเข้ามาในเซลล์บุท่อไต ซิเตรตจะเกิดเมแทบอลิซึมขึ้นที่ไมโทคอนเดรียและบริเวณไซโตซอล ในไมโทคอนเดรียซิเตรตจะถูกขนส่งผ่าน mitochondrial citrate carrier ผ่านวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) หรือ วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) เพื่อนำไปสลายให้เกิดเป็น ATP และ CO₂ นอกจากนี้การเกิดเมแทบอลิซึมของซิเตรตบริเวณไซโทซอล (cytosolic citrate metabolism) เอนไซม์ ATP citrate lyase (ACL) จะสลายซิเตรตได้เป็น acetyl CoA และ oxaloacetate (OAA) โดย oxaloacetate ส่วนใหญ่จะถูกเอนไซม์ phosphoenolpyruvate carboxylase เปลี่ยนเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) เข้าสู่กระบวนการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) ส่วน acetyl CoA จะถูกใช้สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid) และโคเลสเตอรอล (cholesterol) (37) (รูปที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงถึงการดูดซึมและเมแทบอลิซึมของซิเตรตบริเวณ proximal tubule (CoA, coenzyme A; ATP, adenosine triphosphate) (38)

อุบัติการณ์ของภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำสำหรับการเกิดนิ่วชนิดแคลเซียมในต่างประเทศมีความแปรผันตั้งแต่ร้อยละ 20-60 (16) การศึกษาของ Domrongkitchaiporn และคณะรายงานผลการวิจัยในผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมไทยจำนวน 83 ราย พบภาวะ hypocitraturia (citrate < 300 มิลลิกรัมต่อวัน หรือ citrate < 1.43 มิลลิโมลต่อวัน) ร้อยละ 50.6 (19) การศึกษาของ Yungjermchan และคณะศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไตไทย จำนวน 34 ราย พบภาวะ hypocitraturia (< 250 มิลลิกรัมต่อวัน) ร้อยละ 100 (15) และกลไกการเกิดภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไตยังไม่ทราบแน่ชัด

ปัจจัยที่มีผลต่อการขับออกของซิเตรตในปัสสาวะนั้นอาจเกิดจากหลากหลายปัจจัย โดยเฉพาะการบริโภคอาหารนั้นมีผลอย่างมากกับการขับออกของซิเตรตทางปัสสาวะโดยการบริโภคอาหารที่มีโปรตีนจากสัตว์สูงนั้นมีความสัมพันธ์กับภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำและอาหารที่ไม่มีเนื้อสัตว์นั้นมีความสัมพันธ์กับภาวะซิเตรตในปัสสาวะสูง (39, 40) นอกจากการบริโภคอาหารที่ทำให้เกิดการสร้างกรดซึ่งส่งผลกับการขับออกของซิเตรตนำไปสู่การเกิดภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำแล้วนั้นยังมีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องได้แก่ 1) ภาวะสมดุลกรด-เบส เช่น renal tubular acidosis ท้องร่วงเรื้อรัง

การดูดซึมผิดปกติ การออกกำลังกาย และ การอดอาหาร 2) การขาดโพแทสเซียม เมื่อเกิดภาวะกรดเกินหรือมีการขาดโพแทสเซียมจะทำให้มีการดูดกลับซิเตรตมากขึ้นทำให้การขับออกของซิเตรตลดลง 3) การขนส่งสารในวัฏจักรซิเตรตถูกรบกวน เช่น สารพวกซัคซิเนต มาเลต และพิวมาเรต 4) กระบวนการเมแทบอลิซึมถูกยับยั้ง เช่น สารฟลูออโรซิเตรต มาโลเนต มาลีเอต และ 5) การใช้ยา รักษาโรคบางชนิด เช่น acetazolamide (36)

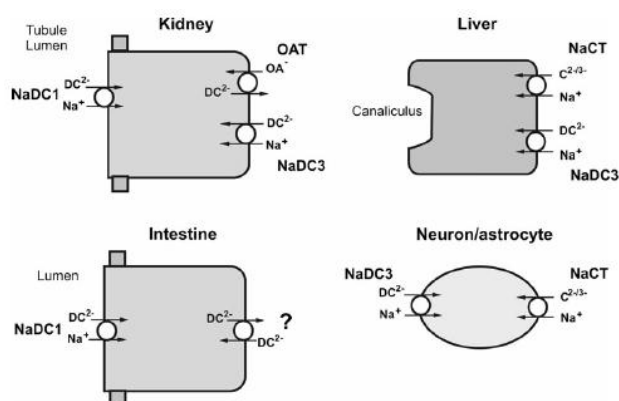
จากผลงานวิจัยของ Aruga และคณะ ที่ศึกษาในหนูที่ทำให้เกิดภาวะกรดเกินพบว่ามีการแสดงออกของยีน *NaDC-1* เพิ่มขึ้นและการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าโปรตีน *NaDC-1* มีประสิทธิภาพการทำงานสูงขึ้น (increased activity) ในภาวะที่เป็นกรด (23) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และคณะ ซึ่งพบว่าการแสดงออกของโปรตีน *NaDC-1* ที่บริเวณ apical membrane ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ *NaDC-1* activity ที่บริเวณ brush border membrane เพิ่มขึ้น โดยจากการเพิ่มการแสดงออกและ activity ของ โปรตีน *NaDC-1* จะทำให้โปรตีน *NaDC-1* และ *NaDC-1* mRNA ภายในเซลล์ทั้งหมดเพิ่มมากขึ้น (41) มีรายงานการศึกษาในหนูที่เป็นนิ่วร่วมกับภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitrauric urolithic rats) พบระดับการแสดงออกของ *NaDC-1* mRNA และ *NaDC-1* protein สูงขึ้นเช่นเดียวกัน (42) นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Chuaypen และคณะ (43) พบว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มี acidic urine pH มีการแสดงออกของ *NaDC-1* ที่เพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อไต และใน HK-2 cells จากการตรวจวัดโดย immunohistochemistry และ western blot ตามลำดับ จากงานวิจัยทั้งหมดนั้นแสดงว่าในสภาวะที่เป็นกรดนั้นจะทำให้โปรตีน *NaDC-1* แสดงออกเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อหนูได้รับอาหารที่เป็นเบส (alkali feeding) ไม่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลง ปริมาณของ *NaDC-1* mRNA, *NaDC-1* protein และ *NaDC-1* activity (23)

2.3 Sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (*NaDC-1*)

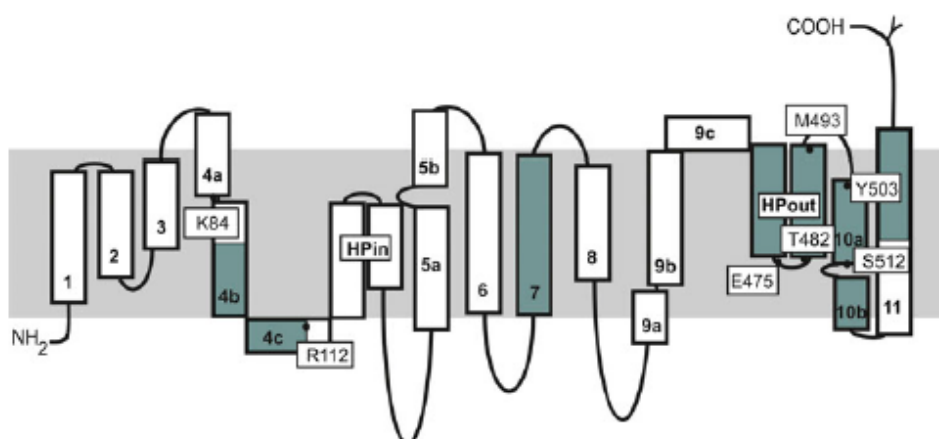
Sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (*NaDC-1*) เป็นโปรตีนขนส่งจัดอยู่ใน SLC13 family ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม SLC13 family ประกอบไปด้วยสมาชิกที่เป็น sodium-coupled transporters สำหรับสารอนูมูลลบ (anionic substrates) ทั้งหมด 5 ชนิดสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 di- และ tricarboxylates transporters มี 3 ชนิด ได้แก่ *NaDC1*, *NaDC3*, และ *NaCT* และกลุ่มที่ 2 sulfate transporters มี 2 ชนิด ได้แก่ *NaS1* and *NaS2* (44) สำหรับโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ขนส่งสารที่เป็นพวก metabolic intermediates จากกระบวนการ citric acid cycle เช่น citrate, succinate และ α -ketoglutarate สำหรับ SLC13 transporters นี้มีความสำคัญในการควบคุมระดับของ intermediates เหล่านี้ในพลาสมา ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อ

Sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1) พบบริเวณ apical membranes ของ renal proximal tubule และ small intestinal cells (รูปที่ 3) NaDC-1 แปรรหัสมาจากยีน *SLC13A2* บนโครโมโซมที่ 17 ประกอบด้วย 12 exons ความยาวของ mRNA เท่ากับ 1952 เบส (NM_003984) ซึ่งแปรรหัสได้โปรตีน NaDC-1 ที่มีขนาด 593 กรดอะมิโน สำหรับการทำงานของ NaDC-1 ที่ไต NaDC-1 จะมีการดูดซึมสาร intermediates ของ citric acid cycle เช่น citrate และ α -ketoglutarate จาก tubular lumen นอกจากนี้ NaDC-1 ยังควบคุมความเข้มข้นของซิเตรตในปัสสาวะอีกด้วย ซึ่งมีความสำคัญต่อการเป็นสารคีเลต (Chelating agents) ของแคลเซียม และมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่วในไต (26)

หน้าที่หลักของ NaDC-1 ที่บริเวณ renal proximal tubule คือขนส่งซิเตรตในรูป citrate²⁻ เข้าเซลล์ร่วมกับโซเดียม (Na⁺) โดยนำซิเตรตเข้าเซลล์หนึ่งโมเลกุลพร้อมกับโซเดียม 3 โมเลกุล (1 citrate²⁻ : 3 Na⁺) การขับออกของซิเตรตในปัสสาวะนั้นขึ้นกับการทำหน้าที่ของโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ถ้าสามารถดูดซิเตรตกลับเข้าสู่เซลล์ท่อไตเพิ่มขึ้น ผลก็คือซิเตรตในปัสสาวะจะลดต่ำลง โดยซิเตรตมีความสำคัญต่อการเป็นสารคีเลตของแคลเซียม เมื่อซิเตรตจับกับแคลเซียมจะส่งผลให้เหลือแคลเซียมอิสระลดลงทำให้แคลเซียมอิสระที่จะไปจับกับออกซาเลตและฟอสเฟตลดลงจึงทำให้การเกิดนิ่วลดลงตามไปด้วย ในผู้ป่วยโรคนี้ไตมักจะมีภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ ซึ่งส่วนมากมักจะเกี่ยวข้องกับภาวะกรดเกิน (26) ภาวะกรดเกินจะกระตุ้นการทำงานของ NaDC-1 ในการขนส่งซิเตรตซึ่งส่งผลต่อปริมาณซิเตรตในท่อไตที่ลดลงในสภาวะที่มี pH ต่ำ (Acidic pH) จะกระตุ้นการขนส่งซิเตรตเนื่องจากทำให้ citrate²⁻ เพิ่มมากขึ้น (45) นอกจากนี้ในภาวะกรดเกินอย่างรุนแรงจะทำให้ยีน *SLC13A2* มีการแสดงออกมากขึ้นส่งผลให้โปรตีน NaDC-1 เพิ่มมากยิ่งขึ้นตามไปด้วย (23)



ภาพที่ 3 การกระจายตัวตามเนื้อเยื่อต่างๆของ SLC13 dicarboxylate/citrate transporters (DC²⁻ dicarboxylate, OA⁻ organic anion, C^{2-/3-} di or tricarboxylate) (44)



ภาพที่ 4 ภาพจำลองโครงสร้างสองมิติของ NaDC1 (44)

2.4 ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรคนิวไต

มีรายงานในต่างประเทศพบว่าบุคคลที่มีประวัติครอบครัวมีผู้เป็นโรคนิวไตจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิวไตคิดเป็นร้อยละ 16-37 ซึ่งสูงกว่าบุคคลที่ไม่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคนิวไต โดยในครอบครัวที่มีประวัติการเป็นนิวไตนั้นมีความเสี่ยงสูงเป็น 2.57 เท่าเมื่อเทียบกับครอบครัวที่ไม่มีประวัติการเป็นโรคนิวไต (46) ส่วนในประเทศไทยนั้นจากงานวิจัยของศาสตราจารย์ปิยะรัตน์และคณะพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคนิวไตทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยร้อยละ 31.94 ($P < 0.001$) มีประวัติการเป็นนิวไตของคนในครอบครัว (29) นอกจากนี้การศึกษาวินิจฉัยของสุชายและคณะพบว่าความเสี่ยงของการเป็นโรคนิวไตจะสูงขึ้นในครอบครัวที่มีประวัติการเป็นนิวไตเปรียบเทียบกับครอบครัวที่ไม่มีประวัติการเป็นโรคนิวไต โดยในครอบครัวที่มีประวัติการเป็นนิวไตมีความเสี่ยงสูงเป็น 3.18 เท่าของครอบครัวที่ไม่มีประวัติการเป็นโรคนิวไต (30) การพบความเสี่ยงของการเป็นนิวไตในครอบครัวนั้นอาจเกิดจากมีความผิดปกติทางพันธุกรรม และมีปัจจัยเสริมจากการดำเนินชีวิตสิ่งแวดล้อม และการบริโภคอาหารที่คล้ายคลึงกันมาส่งเสริมให้เกิดโรคนิวไตในครอบครัวเดียวกัน จากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าความเสี่ยงที่พบนั้นปัจจัยเสี่ยงภายนอก (extrinsic factors) อาจมีผลส่งเสริมต่อปัจจัยเสี่ยงภายใน (intrinsic factors) แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยทางด้านพันธุกรรมที่เป็นผลต่อการเกิดโรคนิวไตนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

มีหลายรายงานการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรคนิวไตซึ่งพบว่าปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมส่งผลต่อความเสี่ยงในการเป็นโรคนิวไต เช่น รายงานการวิจัยของ Monga และคณะทำการศึกษาในแฝดแท้ที่ไม่มีประวัติเป็นนิวไตมาก่อนและไม่สูบบุหรี่ โดยมีการควบคุมอาหารที่รับประทาน (พลังงาน 2,500 กิโลแคลอรี, โซเดียม 170 มิลลิกรัม, แคลเซียม 1,000 มิลลิกรัม

และโปรตีนจากสัตว์ 0.8 กรัมต่อกิโลกรัม) แต่ไม่มีการควบคุมการบริโภคน้ำดื่ม เป็นเวลา 5 วันแล้วทำการวัดค่าปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง พบว่าเมแทบอลิท์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต และซิเทรต มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะการขับออกของแคลเซียม ออกซาเลต และซิเทรต ซึ่งมีค่า H^2 หรือค่า heritability coefficient (%) เท่ากับร้อยละ 94, 94 และ 95 ตามลำดับ และจากค่า H^2 ในการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่าปริมาณการขับออกของสารเมแทบอลิท์ในร่างกายมีความเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมเป็นอย่างมาก (47) นอกจากนี้สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนิ่วไต โดยทำการศึกษา genetic variations กับความสัมพันธ์ของโรคนิ่วไตในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยทำการ genotyping ทั้งหมด 67 SNPs ใน 8 ยีนดังนี้ *TFF1*, *S100A8*, *S100A9*, *S100A12*, *AMBP*, *SPP1*, *UMOD* และ *F2* โดยทั้งหมดเป็นยีนที่แปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการก่อผลึกในปัสสาวะ (stone inhibitor proteins) ได้แก่ trefoil factor 1, calgranulins (A, B, และ C), bikunin, osteopontin, tamm-Horsfall protein และ urinary prothrombin fragment 1 ตามลำดับ พบว่า minor allele frequencies และ homozygous genotype frequencies ของ 8 จากทั้งหมด 10 SNPs ที่กระจายอยู่ในยีน *F2* ซึ่งยีนนี้แปลรหัสได้โปรตีน prothrombin fragment 1 (UPTF1) นั้นสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า haplotypes จำนวน 2 haplotypes ในยีน *F2* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนิ่วไตในผู้หญิง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า variations ในยีน *F2* ดังกล่าวนี้อาจมีความเสี่ยงในการเป็นโรคนิ่วไตในผู้ป่วยเพศหญิงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย (48) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาต่อระหว่างความหลากหลายในยีน *F2* พบว่า prothrombin variant (T165M) มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่วไตในผู้ป่วยเพศหญิงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย (49)

สำหรับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำของผู้ป่วยโรคนิ่วไตในต่างประเทศ ได้แก่ รายงานวิจัยของ Shah และคณะในปี 2005 ศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมและอาหารที่มีผลต่อการขับออกของซิเทรตในผู้ป่วยนิ่วไตชนิดแคลเซียมออกซาเลตกับคนปกติที่ไม่มีประวัติการเป็นโรคนิ่ว (กลุ่มละ 101 คน) แบ่งกลุ่มทดลองเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งได้รับอาหารตามสูตรของยี่ห้อ Ensure® (ไขมัน 11 กรัม, คอเลสเตอรอล 10 มิลลิกรัม, โฟแทสเซียม 500 มิลลิกรัม, คาร์โบไฮเดรต 50 กรัม, ไฟเบอร์ 3 กรัม, น้ำตาล 22 กรัม, โปรตีน 13 กรัม และอื่นๆ รวมทั้งซิเทรต) ส่วนอีกกลุ่มนั้นเลือกรับประทานอย่างอิสระ ผลการทดลองพบว่าคนที่เป็นนี้อาจจะมีค่าการขับซิเทรตออกต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.0001$) และพบว่าผู้หญิงที่บริโภคอาหารตามสูตร Ensure® มีการขับซิเทรตออกมามากกว่าผู้ชายทั้งในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ ($P < 0.001$) (34)

รายงานวิจัยของ Pajor และคณะ ทำการศึกษาโดยเลือก SNPs ทั้งหมดจำนวน 8 SNPs มาจาก NCBI SNP database ได้แก่ L44F, M45L, V117I, F254L, A310P, P385S, V477M และ I550V ได้ทำการศึกษาผลของ nonsynonymous SNPs ของ hNaDC1 ต่อคุณสมบัติในการทำงาน (functional properties) และศึกษาโดยใช้ COS-7 cell heterologous expression system พบว่าความหลากหลายส่วนใหญ่สามารถลด transport activity ของโปรตีน NaDC-1 ซึ่งเป็นผลจากการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ที่ลดลง หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลง transport kinetics และ substrate selectivity โดยความหลากหลายเหล่านี้ น่าจะเป็นผลให้เกิดการดูดซึมสาร intermediates ของ citric acid cycle ลดลงที่ลำไส้เล็กและไต ซึ่งทำให้สาร metabolites เหล่านี้ ถูกขับออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น จากการศึกษาดังกล่าวนี้พบว่าความหลากหลายเหล่านี้ของ NaDC-1 ไม่มีแนวโน้มที่สัมพันธ์กับการลดลงของซิเทรตในปัสสาวะ แต่อาจจะเป็นไปได้ว่ายังมีความหลากหลายอื่นๆที่อยู่บริเวณ regulatory regions ของยีน *NaDC-1* ส่งผลให้ *NaDC-1* มีการแสดงออกมากขึ้น และมีโปรตีน NaDC-1 เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำตามมา แต่ SNPs เหล่านี้ยังไม่ได้มีการศึกษา (21)

รายงานวิจัยของ Okamoto และคณะ ซึ่งทำการตรวจสอบ single nucleotide polymorphism (SNP) ใน exon 12 ของยีน *NaDC-1* ได้แก่ rs11567842 (I550V, SNP ที่ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 550 ในโปรตีน NaDC-1 เปลี่ยนแปลงจากไอโซลิวซีนเป็นวาเลอีน) ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต 105 ราย และในคนปกติ 107 ราย คณะวิจัยดังกล่าวได้จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอัลลีล A กับอัลลีล G ความถี่ของอัลลีล A (0.591 vs. 0.556) และอัลลีล G (0.409 vs. 0.444) ระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตกับคนปกติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\chi^2 = 0.51$, $P = 0.47$) แต่พบว่าจีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับระดับซิเทรตต่ำในปัสสาวะทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ งานวิจัยนี้สรุปว่า A allele ของ I550V polymorphism ในยีน *NaDC-1* อาจจะสัมพันธ์กับการขับออกที่ลดลงของซิเทรตในปัสสาวะ ซึ่งจะส่งผลต่อการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ และความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วไต (22)

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้นนี้เกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรคนิ่วไตนั้น สามารถสรุปได้ว่าโรคนิ่วไตส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับหลายยีน (polygenic) และยังคงไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) มีสาเหตุจากหลายปัจจัยทั้งจากโภชนาการ พฤติกรรมการดำเนินชีวิต สิ่งแวดล้อม และความผิดปกติทางด้านพันธุกรรม ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่พบจะเป็นยีนเดี่ยว (monogenic) มีน้อยกว่าร้อยละ 2 (47) เช่น ภาวะออกซาเลตสูงในปัสสาวะ (hyperoxaluria) ภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะ (hypercalciuria) และภาวะซิสทีนสูงในปัสสาวะ (cystinuria) เป็นต้น สำหรับสาเหตุของการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซิเทรต

ต่ำในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วัดในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยไทยโรคนี้วัด เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* และเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับระดับของซีเทรตในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนี้วัดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิก เช่น ประเมินความเสี่ยงทางพันธุกรรมต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ และเป็นประโยชน์ต่อการให้คำแนะนำเพื่อเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมลดการดำเนินชีวิตของผู้ป่วยได้ต่อไปในอนาคต



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

กลุ่มตัวอย่างคือผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Renal stone patients) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานีและกลุ่มควบคุม (control group) ซึ่งเป็นคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคนิ่วไต

กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Renal stone patients)

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Inclusion Criteria)

ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคนิ่วไตและมีคุณสมบัติดังนี้

- Ages 18-70 years old, both sexes
- Solitary stone of any size, in any locations in the kidney (except ureters, lower urinary stones)
- Calcium stone
- Radiology of any modality proving the existence of the stone (ultrasound, computed tomography, intravenous pyelogram, kidney-ureter-bladder (KUB) x-ray)
- For clinical trial, patients' kidneys must be stone-free evaluated at 1 month after operation by KUB x-ray or ultrasound.

เกณฑ์การแยกอาสาสมัครออกจากโครงการ (Exclusion Criteria)

- Ages < 18 years old , Age > 70 years old
- Suspected pregnant women, all women who has last menstrual period > 1 month
- Any malignancies
- Autoimmune disease that may affect renal function (e.g. Systemic lupus erythematosus)
- Renal impairment
- Renal transplant

- Renal anatomic anomalies
- GI disorders: Inflammatory bowel disease, short bowel
- Hypercalcemic disorders (hyperparathyroidism, sarcoidosis, Paget's disease)
- Renal tubular acidosis
- History of HIV infection or treatment
- History of bleeding disorders or abnormal preoperative lab
- Unable to provide informed consent
- Anyone in the opinion of the investigator who would be inappropriate

กลุ่มคนปกติ (control group)

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Inclusion Criteria)

- เป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีทั้งเพศหญิงและชาย มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี โดยต้องมีเพศและอายุใกล้เคียงกันกับผู้ป่วยคัดเลือกเข้าศึกษา ทำการตรวจวิเคราะห์โดยการทำ ultrasound แล้วไม่พบว่ามีก้อนนิ่ว ไม่เคยมีประวัติว่าได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคนิ่วไตมาก่อน นอกจากนี้ต้องไม่พบว่ามีประวัติการเป็นนิ่วในครอบครัว ตรวจปัสสาวะก็ไม่พบว่ามีความผิดปกติโดยต้องไม่พบว่ามีเลือดปนมาในปัสสาวะ (ตรวจโดยการใช้ urine strip test) อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกลุ่มประชากรตัวอย่าง และยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างเม็ดเลือดขาวและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงในโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจ และลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม

เกณฑ์การแยกอาสาสมัครออกจากโครงการ (Exclusion Criteria)

- ไม่สามารถช่วยเหลือตนเองได้ หรือ มีความผิดปกติใดๆ ที่เป็นผลให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้
- เป็นโรคไตวายเรื้อรังตั้งแต่ระดับที่ 3 ขึ้นไป ตามเกณฑ์การวินิจฉัยของ WHO ($GFR < 60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{ m}^2$)
- ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจโต ขาดเลือด หรือผิดปกติอื่นๆ ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย
- เป็นโรคที่มีความผิดปกติทางกายวิภาคของไต และความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะอื่นนอกเหนือจากโรคไต เช่น urinary tract infection , polycystic kidney,

persistent uretic obstruction, horseshoe kidney, neurogenic bladder, urinary tract malignancy, renal dysfunction และ renal tubular acidosis

3.2 ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size)

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่เข้าร่วมในแผนงานวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาายาจากมะนาวผงของไทยเพื่อการรักษาโรคนิ่วไต” (Research and development of lime powder regimen for medical treatment of kidney stone disease) ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกในระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผงต่อการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” (Phase III clinical trial of lime powder regimen in patients with kidney stone for prevention of recurrent stone formation) โดยโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข (ที่ RLC0041/57) ลงวันที่ 16 พฤษภาคม 2557

3.3 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1. Autoclave	HVE-25, Dublin, Ireland
2. Automatic adjustable micropipette 10,100, 200, 1000 μ l และ tips	Biorad, California, USA
3. Balance	Sartorius Co., Ltd.
4. Centrifuge tubes 15 ml	CORNING, New York, USA
5. Cuvettes (Plastic and Quartz)	Thermo Scientific, Ohio, USA
6. Distilled water maker	-
7. Freezer (-80 $^{\circ}$ C)	-
8. Glassware	-
9. Gel Doc™ XR	Bio-RAD

10. Hot air oven	MEMMERT, Schwabach, Germany
11. Mastercycler® pro	Eppendorf, Hamburg, Germany
12. Microtube 1.5 ml	Corning, New York, USA
13. Microcentrifuge	Eppendorf, Germany
14. Microwave	-
15. NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
16. Parafilm	American National Can, USA
17. PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-RAD
18. Spectrophotometer	Thermo Scientific, Ohio, USA
19. Vortex	Scientific Industry, USA
20. Water baths	GFL, Burgwedel, Germany

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี (Chemical substance)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1. 10X PCR buffer with KCl	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
2. citrate lyase kit	r-biopharm, Germany
3. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
4. Ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
5. ExoSAP-IT	USP Corporation, Cleveland, OH, USA
6. Magnesium chloride	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
7. Primers	Operon, Alabama, USA
8. RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	Intron biotechnology, Inc
9. Taq DNA polymerase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
10. QIAamp DNA Blood Mini Kits	QIAGEN, Valencia, CA, USA

3.4 การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ

สารตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต คือ สารตัวอย่างเลือด และสารตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

วิธีการเก็บสารตัวอย่างเลือด

ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกในระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผงต่อการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” (Phase III clinical trial of lime powder regimen in patients with kidney stone for prevention of recurrent stone formation) ในโครงการวิจัยนี้ผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะถูกเก็บตัวอย่างเลือด ซึ่งจะถูกรวบรวมเมื่อผู้ป่วยตอบรับเข้าร่วมโครงการ และลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยเก็บตัวอย่างก่อนทำการผ่าตัดนำนิ่วออกจากผู้ป่วย เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำของคนไข้บริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน heparized tube ที่ได้จัดเตรียมไว้ให้ มีการใช้เฮพารินเพื่อเป็นสารกันเลือดแข็ง จากนั้นเก็บสารตัวอย่างเลือดใส่ตู้เย็นช่องธรรมดา (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะกระทำโดยทีมแพทย์และพยาบาล ฝ่ายศัลยศาสตร์ ที่ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จากนั้นตัวอย่างเลือดที่ได้จะถูกส่งต่อไปยังผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถาวร สุภาพรม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ แก้ว อุดมศิริชาคร อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งเป็นผู้ให้ความช่วยเหลือในการติดต่อประสานงาน ปั่นแยกเลือด โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บตัวอย่างพลาสมา เม็ดเลือดแดง และ buffy coat แล้วจึงแยกส่วนของพลาสมาเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์ส่วนเม็ดเลือดขาว (buffy coat) และเม็ดเลือดแดง (Red blood cell) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทีมวิจัยจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี จะทำการจัดส่งสารตัวอย่างมายังภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งในการทำวิจัยนี้ทางผู้วิจัยจะใช้เพียงเม็ดเลือดขาวซึ่งจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์

วิธีการเก็บสารตัวอย่างปัสสาวะ

ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกในระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผงต่อการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” (Phase III clinical trial of lime powder regimen in patients with kidney stone for prevention of recurrent stone formation) ในโครงการวิจัยนี้ผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะถูกเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ซึ่งจะถูกรวบรวมเมื่อผู้ป่วยตอบรับเข้าร่วมโครงการ และลงลายมือ

ชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ปัสสาวะ 24 ชั่วโมงถูกเก็บก่อนทำการ ผ่าตัดนำนิ่วออกจากผู้ป่วยโดยใช้ไทมอลเพื่อเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยทีมแพทย์ และพยาบาล ฝ่ายศัลยศาสตร์ ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จากนั้น ตัวอย่างปัสสาวะที่ได้จะถูกส่งต่อไปยังผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถาวร สุภาพรม และผู้ช่วย ศาสตราจารย์แก้ว อุดมศิริชาคร อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งเป็นผู้ให้ความช่วยเหลือในการติดต่อประสานงาน ปั่นแยกสารตัวอย่าง ปัสสาวะและตรวจวัดปริมาตรปัสสาวะ โดยจะดำเนินการในการวัดปริมาตรปัสสาวะทั้งหมด และเขย่า ปัสสาวะให้เข้ากันดี แล้วจึงทำการแบ่งปัสสาวะออกมาประมาณ 500 มิลลิลิตรเพื่อการปั่นเพื่อแยก เซลล์และน้ำปัสสาวะออกจากกัน ทำโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 4000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยปัสสาวะเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นทีมวิจัย จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี จะทำการจัดส่งสารตัวอย่างมายังภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อจากนั้นคณะผู้วิจัยจะนำปัสสาวะเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ ในการวิเคราะห์

3.5 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

3.5.1 การสกัด genomic DNA จากสารตัวอย่าง buffy coat

ทำการสกัด genomic DNA จากเม็ดเลือดขาวของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดโดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN, USA) มีขั้นตอนดังนี้

1. เติมน้ำ red blood cell lysis buffer I 2-3 เท่าของตัวอย่าง buffy coat กลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเท สารละลายส่วนใสทิ้งจะเห็นตะกอนขาว (ถ้ายังเห็นเม็ดเลือดแดงอยู่ให้ทำซ้ำโดยใช้ red blood cell lysis buffer I 3 เท่า)
2. เติมน้ำ Proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ buffer AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex หลังจากนั้นนำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที

3. เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายใน collection tube ที่ทิ้ง
4. เติม buffer AW1 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายใน collection tube ที่ทิ้ง แล้วเติม buffer AW2 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนสารละลายใน collection tube ที่ทิ้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด buffer ที่ยังตกค้างออกให้หมด แล้วทำการย้ายใส่ไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่
5. เติม buffer AE 200 ไมโครลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะเอาส่วนของดีเอ็นเอที่ยึดเกาะกับคอลัมน์ออกมา จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สำหรับ genomic DNA ที่สกัดได้จะนำไปวัดความเข้มข้นของ DNA โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) โดยใช้โปรแกรมวัดสัดส่วน 260/280

3.5.2 การเพิ่มปริมาณยีน *NaDC-1* โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน exons ของยีน *NaDC-1* จาก genomic DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง buffy coat ของผู้ป่วยโรคนี้ไว้โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *NaDC-1* ดังตารางที่ 3 ผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ตามตารางที่ 4 โดยให้ใส่ DNA เป็นลำดับสุดท้าย ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ แล้วลดปริมาณน้ำลงในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของ DNA ที่เพิ่มขึ้น นำส่วนผสมทั้งหมดเขย่าปั่นตก แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR ตั้งโปรแกรมดังตารางที่ 5 โดยปรับค่า annealing temperature ตาม primers ที่ใช้

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *NaDC-1* (ใช้ข้อมูล mRNA จาก NM_003984)

Exons	Primer name	Sequences (5'→3')	Primer sizes	Product sizes (bp)
1	NaDC1_ex1-F	5'-ATA TAA GCC TGC CAC CTG CC-3'	20	295
	NaDC1_ex1-R	5'-AAG TTA TGC TGG ATC CTA AGG ATG-3'	24	
2	NaDC1_ex2-F	5'-CAA ATG GCC TGG TTT GTC TG-3'	20	303
	NaDC1_ex2-R	5'-TCC TTT GTC AAC AAG GGC TG-3'	20	
3, 4	NaDC1_ex3,4-F	5'-GAA TGC CAG TCT GTG GGA ATG T-3'	22	659
	NaDC1_ex3,4-R	5'-CCA AAG GCT CCA AGA TGA CC-3'	20	
5, 6	NaDC1_ex5,6-F	5'-CCT GGA GAC ATC CTC TGT CCT C-3'	22	759
	NaDC1_ex5,6-R	5'-TTT GCG CAT CTG TGA AAT GG-3'	20	
7, 8	NaDC1_ex7,8-F	5'-CCT CAG CCT TTA GAT GGT AGG-3'	21	705
	NaDC1_ex7,8-R	5'-CCA AGT GTG GTG GAA GGT ACA T-3'	22	
9	NaDC1_ex9-F	5'-ACG CGT TAA GCT CCA AAA GG-3'	20	316
	NaDC1_ex9-R	5'-CCT CTG TGG GAC AGA AGC AGG-3'	21	
10	NaDC1_ex10-F	5'-ACC AGG GAG ATG TTA GCA GG-3'	20	355
	NaDC1_ex10-R	5'-AAG ACA GGA TAC TCT GCC CAG-3'	21	
11	NaDC1_ex11-F	5'-GTT GTT CCC CAG AGA AGC AG-3'	20	345
	NaDC1_ex11-R	5'-GGA CCC GCT CAA CTC TGA GA-3'	20	
12	NaDC1_ex12-F	5'-AAC GGG AGG ACT TCC CAG AG-3'	20	390
	NaDC1_ex12-R	5'-GAG CTT GGA GCT TGG AGC TT-3'	20	

ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการทำ PCR

PCR mixture	$\mu\text{l}/\text{reaction}$	final concentration
dH ₂ O	13.5	-
25 mM MgCl ₂	1.20	1.5 mM
10X PCR buffer	2.0	1X
10 mM dNTPs mixture	0.4	0.2 mM
10 μM Forward primer	0.4	0.2 μM
10 μM Reverse primer	0.4	0.2 μM
Taq DNA polymerase (5 U/ μl)	0.1	0.025 U/ μl
DNA template	2	-
Total volume	20	-

ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR

Step	Temp.(°C)	Time
Initiation	94°C	5 min
denaturation		
Cycles (35)		
- Denaturing	94°C	30 sec
- Annealing	55°C (exon11/12) or 59°C (exon5,6/7,8) or 62°C(exon1/2/10) or 64°C (exon3,4/9)	30 sec
- Extension	72°C	30 sec
Final extension	72°C	5 min
Holding	15°C or 4°C	∞

3.5.3 การตรวจสอบ PCR products โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1.5% โดยทำการชั่งผง agarose 1.50 กรัม แล้วทำการละลาย ด้วย 1X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยการใช้ความร้อนช่วยละลาย หลังจากผงเจลละลายแล้วให้หยดสารละลาย RedSafe™ ประมาณ 3 ไมโครลิตร (ในการเตรียมเจล 100 มิลลิลิตร) เทสารละลาย agarose gel ลงในถาดเตรียมเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เมื่อเตรียมเจลเสร็จแล้วนำไปวางใน electrophoresis chamber ที่มี TBE running buffer จากนั้นหยอด (load) PCR product mixture (PCR product และ loading dye) ลงในแต่ละหลุม (well) ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เวลา 40 นาที แล้วนำไปถ่ายภาพเจลโดยใช้เครื่อง Gel Doc (BIO-RAD, California, USA)

3.5.4 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

หลังจากการทำ electrophoresis แล้ว นำ PCR product ที่ได้ไปทำให้สะอาดขึ้น (PCR clean up) โดยใช้ ExoSAP kit เพื่อกำจัด oligonucleotide และ ไพรมเมอร์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาที่ปนอยู่โดยใช้ ExoSAP reagent 1 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง PCR product แล้วใส่ dH₂O 3 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงทำการส่งเพื่อ sequencing (1st BASE, Malaysia)

3.5.5 การหาความแตกต่างของลำดับเบส

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ sequencing มาทำการ alignment เทียบกับ reference โดยใช้โปรแกรม mutation surveyor เพื่อจะสามารถตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *NaDC-1* ในแต่ละตัวอย่างได้ในโดยหาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆของยีน *NaDC-1*

3.5.6 การตรวจวัดระดับซีเทรตในปัสสาวะ

สำหรับการตรวจวัดระดับของซีเทรตในตัวอย่างปัสสาวะโดยใช้ citrate lyase kit (r-biopharm, Germany) ทำการปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 900 ไมโครลิตร เติมน้ำ solution 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (glycylglycine buffer pH 7.8; L-malate dehydrogenase 136 U; L-lactate dehydrogenase 280 U; NADH 5 mg) จากนั้นปิเปตตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดใส่นิวคลีโอไทด์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นทำการจับเวลาเป็นเวลา 3 นาทีเมื่อครบกำหนดเวลา ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A_{340}) แล้วจึงเริ่ม

ปฏิกิริยาโดยการเติมเอนไซม์ citrate lyase ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นทำการจับเวลาเป็นเวลา 3 นาทีเมื่อครบกำหนดเวลา ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A_2) แล้วจึงนำไปคำนวณระดับของซีเทรตในปัสสาวะโดยคำนวณจากผลต่างของการดูดกลืนแสง

3.5.7 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในปัสสาวะ

ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในปัสสาวะได้แก่ ครีเอตินีน โปแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม และแคลเซียม โดยปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีเอนไซม์ (enzymatic method) และปริมาณอิเล็กโทรไลต์ ได้แก่ โปแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม และแคลเซียม ทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Ion-selective-electrode (ISE) ด้วยเครื่อง COBAS INTEGRA 400 plus (PerkinElmer) ในการวิเคราะห์นั้นจะส่งตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงไปวิเคราะห์ที่หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ในการนำเสนอข้อมูลโดยข้อมูลเชิงคุณภาพแสดงข้อมูลเป็น frequency และ percentage และข้อมูลเชิงปริมาณแบ่งเป็น 2 กรณี

- 1) กรณีที่ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) แสดงข้อมูลเป็น $\text{mean} \pm \text{SD}$ หรือ $\text{mean} \pm \text{SE}$
- 2) กรณีข้อมูลเชิงปริมาณที่มีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (nonnormal distribution) แสดงข้อมูลเป็น median \pm IQR โดยนำเสนอข้อมูลในรูปแบบกราฟและตาราง

ใช้สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม SPSS version 17.0 (Chicago, IL) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

1. ใช้สถิติ Independent-samples t-test สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน

หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ตรงตามข้อตกลงเบื้องต้น (assumptions) ของ parametric tests ที่กล่าวมาข้างต้น จะใช้ non-parametric tests ที่เหมาะสมแทนดังต่อไปนี้

1. ใช้สถิติ Chi-square test ใช้ทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรที่เป็นกลุ่ม ได้แก่การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีปริมาณซิเทรต, โปแทสเซียม, แมกนีเซียม, โซเดียม และแคลเซียมปกติและต่ำ
2. ใช้สถิติ Kruskal-Wallis Test และ Wilcoxon rank sum (Mann-Whitney) test สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับปริมาณซิเทรต โปแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม
3. ใช้สถิติ Spearman correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร ได้แก่ การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซิเทรตและปริมาณแร่ธาตุต่างๆได้แก่ โปแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม
4. ใช้สถิติ Logistic regression

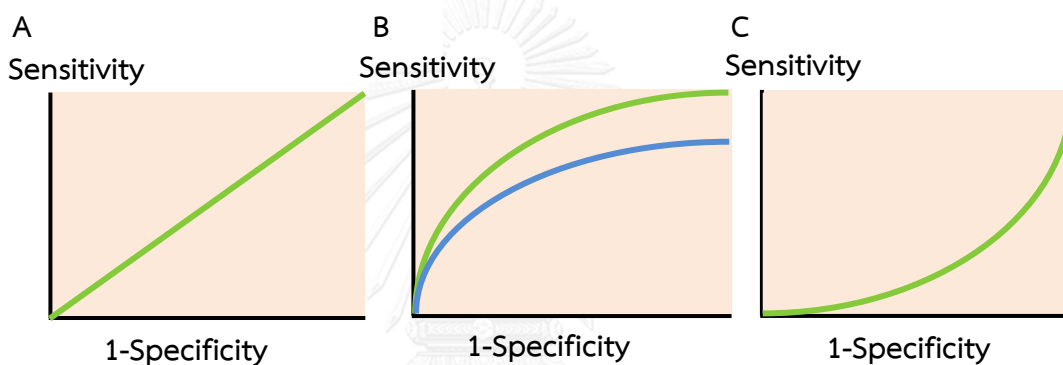
นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์การนำเสนอคุณสมบัติด้านการวินิจฉัยโรคโดยใช้กราฟ ROC (Receiver-operating characteristic curve ดังแสดงในภาพที่ 5 โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ STATA version 12.0 (College station, TX, USA) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ROC curve ใช้เพื่อประเมินว่าการทดสอบนั้นสามารถจำแนกระหว่างผู้ป่วยกับคนปกติได้ดีมากน้อยเพียงใด และสามารถประเมินได้ว่าค่าอ้างอิง (cut off) ที่แตกต่างกันมีผลอย่างไรต่อความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) และเลือกค่า cut off ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น diagnostic marker โดยค่า sensitivity specificity และ accuracy

สามารถคำนวณ sensitivity specificity และ accuracy ได้ดังต่อไปนี้

	Diseased subjects	Non-diseased subjects	Total
Positive result	a (true positive)	b (false positive)	a + b
Negative result	c (false negative)	d (true negative)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

$$\text{Sensitivity} = \frac{a}{a + c} \quad \text{Specificity} = \frac{d}{b + d} \quad \text{Accuracy} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$



ภาพที่ 5 กราฟ ROC เกิดจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราผลบวกจริง (sensitivity) และอัตราผลบวกเท็จ (specificity) วิธีการตรวจวินิจฉัยที่ดีมีประโยชน์ ผลบวกจริงย่อมมากกว่าผลบวกเท็จ A: การตรวจวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกจริงเท่ากับผลเท็จ ย่อมไม่ให้ประโยชน์กับผู้ป่วย B: การตรวจวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกจริงมากกว่าผลบวกเท็จวิธีการใดที่ให้โค้ง ROC สูงกว่า ย่อมเป็นการวินิจฉัยที่ดีกว่า C: การวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกเท็จมากกว่าผลบวกจริง วิธีการตรวจวินิจฉัยนี้จึงให้ผลเสียและเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาเป็นผู้ป่วยโรคไตจำนวน 158 รายและคนปกติจำนวน 128 ราย ดังแสดงในตารางที่ 6 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตแบ่งออกได้เป็นเพศชายจำนวน 108 คน คิดเป็นร้อยละ 68.4 และเพศหญิงจำนวน 50 คนคิดเป็นร้อยละ 31.6 ส่วนกลุ่มคนปกติแบ่งออกได้เป็นเพศชายจำนวน 81 คน คิดเป็นร้อยละ 63.3 และเพศหญิงจำนวน 47 คนคิดเป็นร้อยละ 36.7 สำหรับกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 50.06 ± 11.02 ปี และกลุ่มคนปกติมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 47.13 ± 15.13 ปี ผู้ป่วยโรคไตมีค่า BMI เฉลี่ยเท่ากับ $22.54 \pm 3.85 \text{ kg/m}^2$ และกลุ่มคนปกติมีค่า BMI เฉลี่ยเท่ากับ $23.47 \pm 3.99 \text{ kg/m}^2$ จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่าเพศ อายุ และ BMI ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคไตและคนปกติไม่แตกต่างกัน ($P = 0.368$ $P = 0.069$ และ $P = 0.090$ ตามลำดับ) ในส่วนของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีการวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของไต (eGFR) เฉลี่ย $74.15 \pm 28.26 \text{ mL/min}$ นอกจากนี้จากการวัดปริมาณซีเทรตในปัสสาวะดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีค่าปริมาณซีเทรตเฉลี่ย 76.64 mg/gCr และกลุ่มคนปกติมีค่าปริมาณซีเทรตเฉลี่ย 266.44 mg/gCr ซึ่งพบว่าค่าซีเทรตในปัสสาวะระหว่างสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อพิจารณาถึงความชุกของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำพบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำจำนวน 123 คน คิดเป็นร้อยละ 77.8 และกลุ่มคนปกติมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำจำนวน 39 คน คิดเป็นร้อยละ 30.5 จะเห็นได้ว่าเมื่อทดสอบทางสถิติความชุกของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$)

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติสำหรับการวิเคราะห์ ROC

	Renal stone patients	Healthy Control	P Value
Total number (n)	158	128	
Male gender	108 (68.4%)	81 (63.3%)	0.368 ^a
Age (years)	50.06 ± 11.02	47.13 ± 15.13	0.069 ^b
BMI (kg/m ²)	22.54 ± 3.85	23.47 ± 3.99	0.090 ^c
eGFR (mL/min)	74.15 ± 28.26	-	-

Data are given as mean±SD (continuous variables) or numbers (%). BMI: Body mass index, eGFR: estimated glomerular filtration rate, SD: Standard deviation, ^aChi-square test, ^bIndependent-samples t-test, ^cMann-Whitney test

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณซิเตรตในปัสสาวะและความชุกของภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ

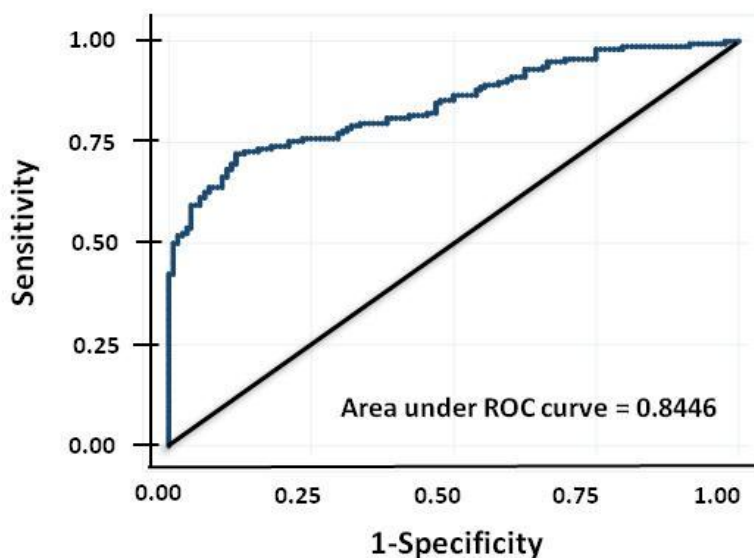
	Renal stone patients	Healthy Control	P Value
Urinary citrate (mg/gCr)			<0.001 ^a
- Median (P ₂₅ , P ₇₅)	76.64 (37.31,168.10)	266.44 (176.59,454.28)	
Hypocitraturia n (%)	123 (77.8)	39 (30.5)	<0.001 ^b

^aMann-Whitney U test, ^bChi-square test, P₂₅: 25th percentile; P₇₅: 75th percentile

4.2 ผลการวิเคราะห์ Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีค่า cut off ที่เหมาะสมของระดับซิเตรตในปัสสาวะในหน่วย mg/gCr สำหรับผู้ป่วยไทยโรคนิ่วไต ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis โดยใช้ STATA version 12.0 (College Station, TX, USA) เพื่อจะหาค่า cut off ที่เหมาะสมของระดับซิเตรตในปัสสาวะ และประเมินค่าของการตรวจวัดระดับซิเตรตในปัสสาวะ สำหรับใช้ในการจำแนกระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับคนปกติ จากการวิเคราะห์โดยใช้ ROC พบว่า ROC curve ที่ได้นั้นมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) เท่ากับ 0.8446 (95% CI; 0.8003-0.888) (ภาพที่ 6) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกค่า cut off เพื่อจะคำนวณค่าวินิจฉัย

(diagnostic values) ที่ cut off สำหรับผล positive เท่ากับ ≤ 200 mg/gCr มีค่า accuracy คิดเป็นร้อยละ 74.13%, sensitivity คิดเป็นร้อยละ 77.85, specificity คิดเป็นร้อยละ 69.53, positive predictive value คิดเป็นร้อยละ 75.93, negative predictive value คิดเป็นร้อยละ 71.77, false positive rate คิดเป็นร้อยละ 24.07 และ false negative rate คิดเป็นร้อยละ 28.23 (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 6 แสดงกราฟ ROC ของระดับซีเทรตในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 158 คน และคนปกติจำนวน 128 คน

ตารางที่ 8 แสดงค่าวินิจฉัยตามค่า cut off ของปริมาณซีเทรตในปัสสาวะเพื่อจำแนกระหว่างผู้ป่วยกับคนปกติ

Diagnostic values (%)	Urinary citrate cut off (mg/gCr) for positive result
Sensitivity	77.85
Specificity	69.53
Positive predictive value	75.93
Negative predictive value	71.77
False positive rate	24.07
False negative rate	28.23
Accuracy of test	74.13

4.3 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนี้วไต

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่าภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำสัมพันธ์กับโรคนี้วไต ในการอธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าว จึงทำการวิเคราะห์ด้วย Binary logistic regression เพื่อคำนวณ odds ratio (OR) ของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนี้วไต

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์แต่ละตัวแปรในการพยากรณ์การเป็นโรคนี้ว พบว่าค่า OR ของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia) เท่ากับ 8.02 (CI: 4.71-13.65, $P < 0.001$) กล่าวคือผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำมีความเสี่ยงของการเป็นโรคนี้วไตเป็น 8.02 เท่าของผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะปกติ (Normocitarturia) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์โดยคำนึงถึงเพศและอายุ พบว่าค่า adjusted OR ของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเท่ากับ 9.36 (CI: 5.24-16.71, $P < 0.001$) กล่าวคือผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำมีความเสี่ยงของการเป็นโรคนี้วไตเป็น 9.36 เท่าของผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะปกติ (ตารางที่ 9) ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ที่ได้ยืนยันได้ว่าภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำจะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคนี้วไต

ตารางที่ 9 ความเสี่ยงของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนี้วไต

Independent variables	OR (95%CI)	P-value	Adjusted OR (95%CI)	P-value
Normocitarturia	1.00		1.00	
Hypocitraturia	8.02 (4.71,13.65)	<0.001	9.36 (5.24,16.71)	<0.001

4.4 ผลการวิเคราะห์ความชุกของปัจจัยเสี่ยงต่างๆของโรคนี้วไตในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไต

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตเมื่อพิจารณาถึงภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกต่างๆในปัสสาวะพบความชุกของภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกดังนี้ ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) พบเป็นจำนวน 123 คน คิดเป็นร้อยละ 77.84 ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) พบเป็นจำนวน 111 คน คิดเป็นร้อยละ 70.25 ภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypomagnesiuria) พบเป็นจำนวน 97 คน คิดเป็นร้อยละ 61.39 ภาวะโซเดียมในปัสสาวะสูง (hypematriuria) พบเป็นจำนวน 72 คน คิดเป็นร้อยละ 45.57 และภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) พบเป็น

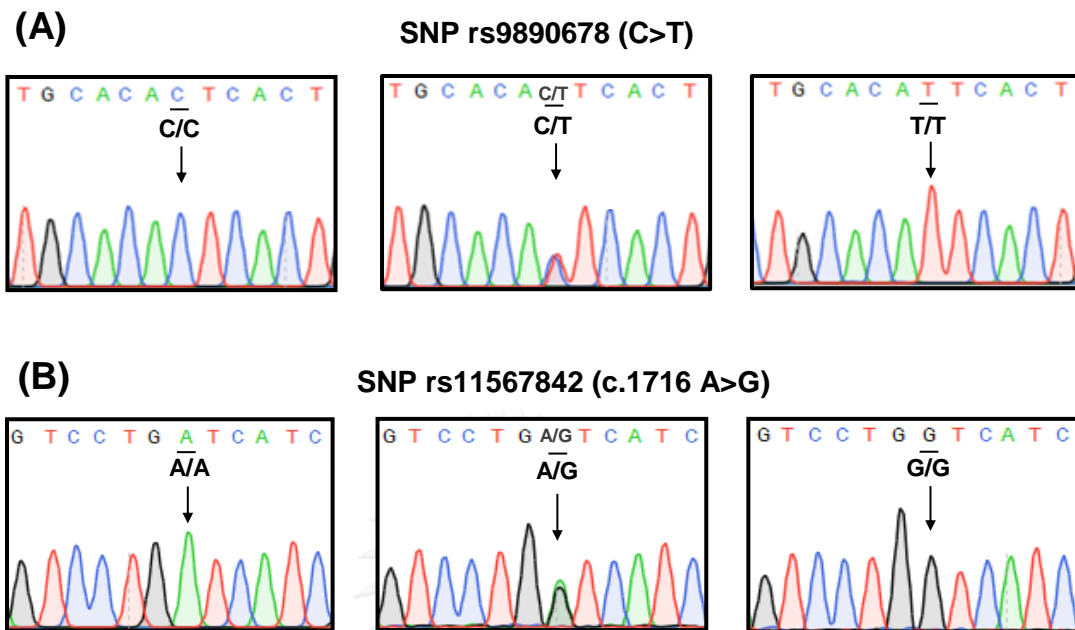
จำนวน 11 คน คิดเป็นร้อยละ 6.96 (ตารางที่ 10) ดังเห็นได้ว่าความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคไตในประเทศไทย คือ การลดลงของสารยั้งนัวในปัสสาวะได้แก่ ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ และภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ

ตารางที่ 10 แสดงความชุกของความผิดปกติทางเมแทบอลิกในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคไต และค่า cut off (50-52)

Urinary metabolic disorder	Prevalence n (%)	Cut off value
Hypocitraturia	123 (77.84)	≤ 200 mg/gCr
Hypokaliuria	111 (70.25)	≤ 1170 mg/gCr
Hypomagnesiuria	97 (61.39)	≤ 48.6 mg/gCr
Hypernatruria	72 (45.57)	> 2300 mg/gCr
Hypercalciuria	11 (6.96)	> 200 mg/gCr

4.5 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยไทยโรคไต

จากการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน exons ของยีน *NaDC-1* จาก genomic DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง buffy coat ของผู้ป่วยโรคไตจำนวน 126 รายโดยใช้เทคนิค Sanger sequencing พบความหลากหลาย (SNP) ที่อยู่ในส่วนของ intron จำนวน 1 SNP ได้แก่ rs9890678 ซึ่งเป็น SNP ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T บริเวณ intron 5 (ภาพที่ 7A) สำหรับ SNP ที่อยู่ในส่วนของ exon พบเพียงหนึ่ง SNP ได้แก่ rs11567842 ซึ่งเป็น SNP ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ที่ตำแหน่ง 1716 บริเวณ exon 12 (c.1716 A>G) โดยส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก codon ATC (isoleucine, I) เป็น GTC (valine, V) ที่กรดอะมิโนตัวที่ 550 (p.I550V) สำหรับ wild-type genotype ของ rs11567842 ได้แก่ AA ส่วน variants นั้นได้แก่ AG หรือ homozygous GG (ภาพที่ 7B) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มปริมาณ DNA เฉพาะส่วน exon 12 ซึ่งมี SNP ที่สนใจทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคไตอีกจำนวน 32 ราย



ภาพที่ 7 DNA sequencing profile แสดง SNP rs9890678 (C>T) บริเวณ intron 5 (A) แสดง SNP rs11567842 (c.1716A>G) บริเวณ exon 12 ส่งผลให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก isoleucine (I) เป็น valine (V) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 550 (p.I550V) (B)

4.6 ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของ rs11567842 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไต

สำหรับการวิเคราะห์การกระจายตัวของความถี่ของจีโนไทป์ (genotype frequencies) และความถี่ของอัลลีล (allele frequencies) ของ rs11567842 ในยีน *NaDC-1* ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไต (ตารางที่ 11) พบว่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลของประชากรนั้นอยู่ในภาวะสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy – Weinberg Equilibrium หรือ HWE) ($P = 0.746$ และ $P = 0.556$) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตทั้งหมดมีความถี่ของอัลลีล A เป็น 0.728 และความถี่ของอัลลีล G เป็น 0.272 สำหรับค่าความถี่ของจีโนไทป์ (AA, AG และ GG) ของผู้ป่วยโรคนิ้วไตทั้งหมดเป็นร้อยละ 51.9, 41.8 และ 6.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 11 แสดงการกระจายตัวของความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของ rs11567842 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต

Population	Genotype			Allele frequency	
	AA (%)	AG (%)	GG (%)	A	G
All subjects (n = 158)	82 (51.9)	66 (41.8)	10 (6.3)	0.728	0.272

Data are given as numbers (%), n=number of subjects. Genotype and allele frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P = 0.746$ and $P = 0.556$ respectively).

4.7 ผลการวิเคราะห์ระดับของซีเทรตในปัสสาวะตามจีโนไทป์ของ rs11567842

สำหรับผลของการจำแนกผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่มตามจีโนไทป์ได้แก่ AA AG และ GG เพื่อที่จะเปรียบเทียบระดับของซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 12) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Kruskal–Wallis test พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการกระจายตัวของ rs11567842 genotype กับระดับของซีเทรตในปัสสาวะ สำหรับระดับของซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 61.88, 78.22 และ 158.41 mg/gCr ตามลำดับ

เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Mann–Whitney U test เพื่อทำการเปรียบเทียบระดับของซีเทรตในปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG โดยแยกคิดทีละกลุ่มพบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG จะมีระดับซีเทรตในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AG (158.41 vs 78.22 mg/gCr) และ AA (158.41 vs 61.88 mg/gCr) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 12 แสดงจีโนไทป์และระดับของซีเทรตในปัสสาวะ (mg/gCr)

	rs11567842		
	AA (n=82)	AG (n=66)	GG (n=10)
Citrate (mg/gCr)	61.88 (34.40,139.30)	78.22 (43.89,225.53)	158.41 (117.56,322.28) ^{a,b}

^a $P < 0.05$ vs. AA genotype, ^b $P < 0.05$ vs. AG genotype, Data are given as median (25th percentile, 75th percentile). n=number of subjects. P value evaluated using Mann–Whitney U test.

4.8 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

จากการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (ตารางที่ 13) ผลการวิเคราะห์พบว่าค่า adjusted OR ของจีโนไทป์ AG เท่ากับ 0.35 (CI: 0.15-0.81, P = 0.014) กล่าวคือผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ AG จะลดความเสี่ยงของการมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำลง 65% เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ AA และ ค่า adjusted OR ของจีโนไทป์ GG เท่ากับ 0.26 (CI: 0.06-1.07, P = 0.062) กล่าวคือผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ GG จะลดความเสี่ยงของการมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำลง 74% เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ AA หรือกล่าวอีกทางหนึ่งได้ว่า ผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ AA จะมีค่า adjusted OR เท่ากับ 3.85 (1.00/0.26) เมื่อผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ GG มีค่า adjusted OR เป็น 1.00 นั่นคือ ผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ AA มีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ สูงกว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีจีโนไทป์ GG 3.85 เท่า ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าจีโนไทป์ GG เป็นปัจจัยป้องกัน (protective factor) ต่อการมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

ตารางที่ 13 แสดงความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

	Crude OR (95%CI)	P value	Adjusted OR* (95%CI)	P Value
AA	1.00		1.00	
AG	0.36 (0.16-0.81)	0.014	0.35 (0.15-0.81)	0.014
GG	0.23 (0.06-0.96)	0.043	0.26 (0.06-1.07)	0.062

Odds ratios(OR) and 95% confidence intervals (95%CI) evaluated using logistic regression

*adjusted for age and sex

4.9 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NaDC-1 (rs11567842) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

เมื่อแบ่งกลุ่มประชากรทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับซีเทรตในปัสสาวะ ได้เป็น กลุ่ม hypocitraturia (การขับออกของซีเทรตในปัสสาวะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 200 mg/gCr) และ กลุ่ม normocitraturia (การขับออกของซีเทรตในปัสสาวะมากกว่า 200 mg/gCr) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) กับจีโนไทป์ rs11567842 (ตารางที่ 14) พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ AA AG และ GG ในกลุ่ม hypocitraturia คิดเป็นร้อยละ

57.7, 37.4 และ 4.9 ตามลำดับ และ normocitraturia คิดเป็นร้อยละ 31.4, 57.1 และ 11.4 ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของการกระจายตัวของ rs11567842 genotype ระหว่างกลุ่ม hypocitraturia และ normocitraturia ($\chi^2 = 8.020$, $P = 0.018$) อาจจะสามารถกล่าวได้ว่าจีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ระดับของซีเทรตในปัสสาวะ ความถี่ของอัลลีล A ในกลุ่ม hypocitraturia และ normocitraturia เป็น 0.764 และ 0.600 ตามลำดับ ความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่ม hypocitraturia และ normocitraturia แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.006$) อาจจะสามารถกล่าวได้ว่าความถี่ของอัลลีลสัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

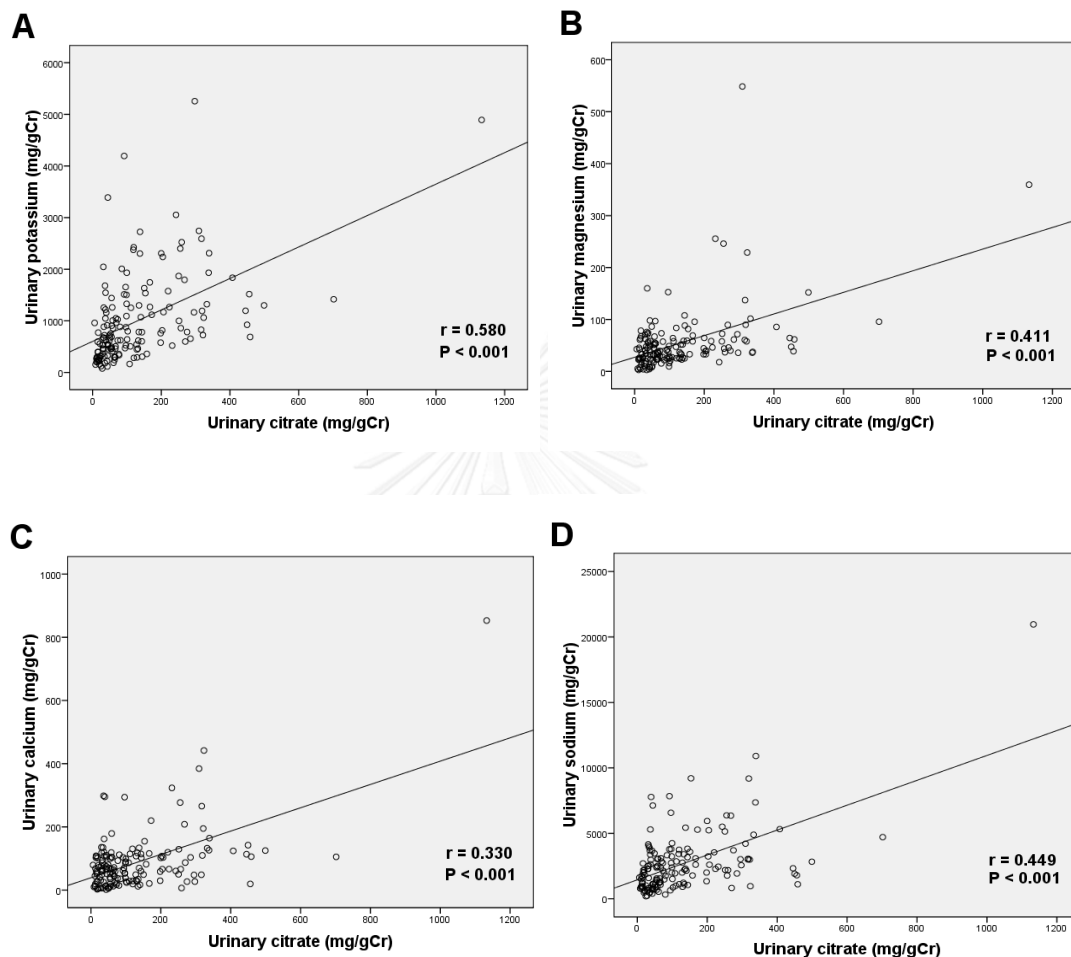
ตารางที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* (rs11567842) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

Population	Genotype			Allele frequency	
	AA (%)	AG (%)	GG (%)	A	G
urinary citrate					
Hypocitraturia (n = 123)	71 (57.7)	46 (37.4)	6 (4.9)	0.764	0.236
Normocitraturia (n = 35)	11 (31.4)	20 (57.1)	4 (11.4)	0.600	0.400
	$(\chi^2 = 8.020, P = 0.018)$			$(\chi^2 = 7.420, P = 0.006)$	

Data are given as numbers (%), n=number of subjects. P value evaluated using chi-square test and all P value are two tailed. Genotype and allele frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P = 0.746$ and $P = 0.556$ respectively).

4.10 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างซีเทรตกับแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตกับแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าระดับของซีเทรตในปัสสาวะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโพแทสเซียมในปัสสาวะ ($r=0.580$, $P<0.001$) (ภาพที่ 8A) แมกนีเซียมในปัสสาวะ ($r=0.411$, $P<0.001$) (ภาพที่ 8B) แคลเซียมในปัสสาวะ ($r=0.330$, $P<0.001$) (ภาพที่ 8C) และโซเดียมในปัสสาวะ ($r=0.449$, $P<0.001$) (ภาพที่ 8D) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) แสดงให้เห็นระดับของซีเทรตในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับโพแทสเซียมในปัสสาวะมากที่สุด



ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับของซิเตรตและแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะ
 A: ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของซิเตรตและโพแทสเซียม ($r=0.580, P<0.001$) B: ความสัมพันธ์
 ระหว่างระดับของซิเตรตและแมกนีเซียม ($r=0.411, P<0.001$) C: ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ
 ซิเตรตและแคลเซียม ($r=0.330, P<0.001$) D: ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของซิเตรตและโซเดียม
 ($r=0.449, P<0.001$)

4.11 ผลการวิเคราะห์ระดับของแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะตามจีโนไทป์ของ rs11567842

จากการที่เห็นได้ว่าระดับของซีเทรตในปัสสาวะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม ดังนั้นจึงทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* (rs11567842) กับโพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียมในปัสสาวะ

สำหรับผลของการจำแนกผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่มตามจีโนไทป์ได้แก่ AA AG และ GG เพื่อที่จะเปรียบเทียบระดับของ urinary inhibitory factors (ตารางที่ 15) ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Kruskal–Wallis test พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการกระจายตัวของ rs11567842 genotype กับ stone inhibitory factors (โพแทสเซียม และแมกนีเซียม) สำหรับระดับของโพแทสเซียมในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 661.69, 761.13 และ 1689.67 mg/gCr ตามลำดับ และระดับของแมกนีเซียมในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.94, 39.73 และ 65.87 mg/gCr ตามลำดับ ในทางกลับกันการกระจายตัวของ rs11567842 genotype กับ urinary lithogenic factors (โซเดียม และแคลเซียม) ไม่แตกต่างกัน ระดับของแคลเซียมในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 65.34, 67.38 และ 115.26 mg/gCr ตามลำดับ ระดับของโซเดียมในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1858.63, 2306.84 และ 3071.91mg/gCr ตามลำดับ

เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Mann–Whitney U test เพื่อทำการเปรียบเทียบระดับของ urinary inhibitory factors ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม ระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG โดยแยกคิดทีละกลุ่ม พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG จะมีระดับโพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียมที่สูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG จะมีระดับโพแทสเซียมสูงกว่าผู้ป่วยที่มี AG (1689.67 vs 761.13 mg/gCr) และ AA (1689.67 vs 661.69 mg/gCr) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG จะมีระดับแมกนีเซียมสูงกว่าผู้ป่วยที่มี AG (65.87 vs 39.73 mg/gCr)

และ AA (65.87 vs 37.94 mg/gCr) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับระดับโซเดียมในปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยโรคไตที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG จะมีระดับโซเดียมสูงกว่าผู้ป่วยที่มี AA (3071.91 vs 1858.63 mg/gCr) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับระดับแคลเซียมในปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยโรคไตที่มีจีโนไทป์ AA AG และ GG พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG จะมีระดับแคลเซียมสูงกว่าผู้ป่วยที่มี AA (115.26 vs 65.34 mg/gCr) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 15 จีโนไทป์และระดับของแร่ธาตุในปัสสาวะ (mg/gCr)

	rs11567842		
	AA (n=82)	AG (n=66)	GG (n=10)
Potassium (mg/gCr)	661.69 (331.66,1166.67)	761.13 (460.88,1274.06)	1689.67 (886.83,2466.98) ^{a,b}
Magnesium (mg/gCr)	37.94 (25.30,58.36)	39.73 (23.34,61.98)	65.87 (52.45,107.89) ^{a,b}
Sodium (mg/g Cr)	1858.63 (1052.10,3184.78)	2306.84 (1204.30,3344.74)	3071.91 (2148.09,4645.18) ^a
Calcium (mg/g Cr)	65.34 (27.42,101.60)	67.38 (36.91,117.96)	115.26 (49.02,163.26) ^a

^a $P < 0.05$ vs. AA genotype, ^b $P < 0.05$ vs. AG genotype, Data are given as median (25th percentile, 75th percentile). n=number of subjects. P value evaluated using Mann-Whitney U test.

4.12 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกร่างกาย

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ต่อภาวะโพแทสเซียมและแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (ตารางที่ 16) พบว่า GG เป็นปัจจัยป้องกัน (protective factor) ต่อการมีภาวะโพแทสเซียมและแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยผลการวิเคราะห์ของภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำพบว่าค่า adjusted OR ของจีโนไทป์ GG เท่ากับ 0.15 (CI: 0.03-0.62, $P = 0.009$) กล่าวคือผู้ป่วยโรคไตที่มีจีโนไทป์ GG จะลดความเสี่ยงของการมีภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำลง 85% เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคไตที่มีจีโนไทป์ AA หรือกล่าวอีกทางหนึ่งได้ว่า ผู้ป่วย

โรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ AA จะมีค่า adjusted OR เท่ากับ 6.67 (1.00/0.15) เมื่อผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ GG มีค่า adjusted OR เป็น 1.00 นั่นคือ ผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ AA มีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำสูงกว่าผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ GG 6.67 เท่า ในส่วนของผลการวิเคราะห์ของภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ พบว่าค่า adjusted OR ของจีโนไทป์ GG เท่ากับ 0.14 (CI: 0.03-0.70, P = 0.017) กล่าวคือผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ GG จะลดความเสี่ยงของการมีภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำลง 86% เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ AA หรือกล่าวอีกทางหนึ่งได้ว่า ผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ AA จะมีค่า adjusted OR เท่ากับ 7.14 (1.00/0.14) เมื่อผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ GG มีค่า adjusted OR เป็น 1.00 นั่นคือ ผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ AA มีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำสูงกว่าผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ GG 7.14 เท่า

ในทางกลับกันผลของการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ต่อภาวะแคลเซียมและโซเดียมในปัสสาวะสูงมีแนวโน้มว่า จีโนไทป์ AG และ GG เป็นปัจจัยที่ทำให้มีความเสี่ยง (risk factor) ต่อการมีภาวะแคลเซียมและโซเดียมในปัสสาวะสูง ผลการวิเคราะห์ของภาวะโซเดียมในปัสสาวะต่ำ พบว่าค่า adjusted OR ของจีโนไทป์ GG เท่ากับ 3.55 (CI: 0.85-14.87, P = 0.084) กล่าวคือ ผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ GG มีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะโซเดียมในปัสสาวะต่ำสูงกว่าผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ AA 3.55 เท่า ในส่วนของผลการวิเคราะห์ของภาวะแคลเซียมในปัสสาวะต่ำพบว่า ค่า adjusted OR ของจีโนไทป์ GG เท่ากับ 4.84 (CI: 0.75-31.21, P = 0.098) กล่าวคือ ผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ GG มีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะโซเดียมในปัสสาวะต่ำสูงกว่าผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่มีจีโนไทป์ AA 4.84 เท่า แต่อย่างไรก็ตามผลของการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ต่อภาวะแคลเซียมและโซเดียมในปัสสาวะสูงไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงของแต่ละจีโนไทป์ของ rs11567842 ต่อภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมต่างๆ

	Crude OR (95%CI)	P value	Adjusted OR* (95%CI)	P Value
A. Hypokaliuria				
AA	1.00		1.00	
AG	0.74 (0.36-1.54)	0.421	0.74 (0.36-1.55)	0.430
GG	0.14 (0.03-0.59)	0.007	0.15 (0.03-0.62)	0.009
B. Hypomagnesiuria				
AA	1.00		1.00	
AG	0.96 (0.49-1.88)	0.900	0.97 (0.49-1.90)	0.921
GG	0.14 (0.03-0.69)	0.016	0.14 (0.03-0.70)	0.017
C. Hypernatriuria				
AA	1.00		1.00	
AG	1.56 (0.81-3.01)	0.182	1.54 (0.80-2.97)	0.200
GG	3.65 (0.88-15.14)	0.075	3.55 (0.85-14.87)	0.084
D. Hypercalciuria				
AA	1.00		1.00	
AG	1.60 (0.41-6.21)	0.498	1.58 (0.41-6.14)	0.511
GG	4.88 (0.77-30.90)	0.093	4.84 (0.75-31.21)	0.098

Odds ratios(OR) and 95% confidence intervals (95%CI) evaluated using logistic regression

*adjusted for age and sex

4.13 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับระดับของแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนิวไต (rs11567842)

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับระดับของแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนิวไต (rs11567842) จะทำการแบ่งกลุ่มประชากรทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับของแร่ธาตุในปัสสาวะได้แก่โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม (ตารางที่ 17) ดังนี้

A) เมื่อแบ่งกลุ่มประชากรทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะ ได้เป็น กลุ่ม hypokaliuria (การขับออกของโพแทสเซียมในปัสสาวะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1170 mg/gCr) และ กลุ่ม normokaliuria (การขับออกของโพแทสเซียมในปัสสาวะมากกว่า 1170 mg/gCr) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) กับจีโนไทป์ rs11567842 พบว่าความถี่ของอัลลีล A ในกลุ่ม hypokaliuria และ normokaliuria เป็น 0.766 และ 0.638 ตามลำดับ ความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่ม hypokaliuria และ normokaliuria แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.020$) นอกจากนี้พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ AA AG และ GG ในกลุ่ม hypokaliuria คิดเป็นร้อยละ 55.9, 41.4 และ 2.7 ตามลำดับ และ normokaliuria คิดเป็นร้อยละ 42.6, 42.6 และ 14.9 ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของการกระจายตัวของ rs11567842 genotype ระหว่างกลุ่ม hypokaliuria และ normokaliuria ($\chi^2 = 8.889$, $P = 0.012$) กล่าวคือความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลสัมพันธ์กับภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

B) เมื่อแบ่งกลุ่มประชากรทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะ ได้เป็น กลุ่ม hypomagnesiuria (การขับออกของแมกนีเซียมในปัสสาวะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 48.6 mg/gCr) และ กลุ่ม normomagnesiuria (การขับออกของแมกนีเซียมในปัสสาวะมากกว่า 48.6 mg/gCr) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypomagnesiuria) กับจีโนไทป์ rs11567842 พบว่าความถี่ของอัลลีล A ในกลุ่ม hypomagnesiuria และ normomagnesiuria เป็น 0.763 และ 0.672 ตามลำดับ ความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่ม hypomagnesiuria และ normomagnesiuria ไม่แตกต่างกัน ($P = 0.078$) นอกจากนี้พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ AA AG และ GG ในกลุ่ม hypomagnesiuria คิดเป็นร้อยละ 54.6, 43.3 และ 2.1 ตามลำดับ และ normomagnesiuria คิดเป็นร้อยละ 47.5, 39.3 และ 13.1 ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของการกระจายตัวของ rs11567842 genotype ระหว่างกลุ่ม

hypomagnesiuria และ normomagnesiuria ($\chi^2 = 7.732$, $P = 0.021$) กล่าวคือความถี่ของจีโนไทป์สัมพันธ์กับภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

C) เมื่อแบ่งกลุ่มประชากรทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับโซเดียมในปัสสาวะ ได้เป็น กลุ่ม normonatriuria (การขับออกของโซเดียมในปัสสาวะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2300 mg/gCr) และ กลุ่ม hypernatriuria (การขับออกของโซเดียมในปัสสาวะมากกว่า 2300 mg/gCr) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะโซเดียมในปัสสาวะสูง (hypernatriuria) กับจีโนไทป์ rs11567842 พบว่าระดับของโซเดียมในปัสสาวะ ความถี่ของอัลลีล A ในกลุ่ม normonatriuria และ hypernatriuria เป็น 0.773 และ 0.674 ตามลำดับ ความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่ม normonatriuria และ hypernatriuria แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.047$) นอกจากนี้พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ AA AG และ GG ในกลุ่ม normonatriuria คิดเป็นร้อยละ 54.6, 43.3 และ 2.1 ตามลำดับ และ hypernatriuria คิดเป็นร้อยละ 47.5, 39.3 และ 13.1 ตามลำดับ พบว่าการกระจายตัวของ rs11567842 genotype ระหว่างกลุ่ม normonatriuria และ hypernatriuria ไม่แตกต่างกัน ($\chi^2 = 4.345$, $P = 0.114$) กล่าวคือความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลไม่สัมพันธ์กับภาวะโซเดียมในปัสสาวะสูง

D) เมื่อแบ่งกลุ่มประชากรทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับแคลเซียมในปัสสาวะ ได้เป็น กลุ่ม normocalciuria (การขับออกของแคลเซียมในปัสสาวะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 200 mg/gCr) และ กลุ่ม hypercalciuria (การขับออกของแคลเซียมในปัสสาวะมากกว่า 200 mg/gCr) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) กับจีโนไทป์ rs11567842 พบว่าระดับของแคลเซียมในปัสสาวะ ความถี่ของอัลลีล A ในกลุ่ม normocalciuria และ hypercalciuria เป็น 0.773 และ 0.674 ตามลำดับ ความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่ม normocalciuria และ hypercalciuria ไม่แตกต่างกัน ($P = 0.135$) นอกจากนี้พบว่าความถี่ของจีโนไทป์ AA AG และ GG ในกลุ่ม normocalciuria คิดเป็นร้อยละ 53.1, 41.5 และ 5.4 ตามลำดับ และ hypercalciuria คิดเป็นร้อยละ 36.4, 45.5 และ 18.2 ตามลำดับ พบว่าการกระจายตัวของ rs11567842 genotype ระหว่างกลุ่ม normocalciuria และ hypercalciuria ไม่แตกต่างกัน ($\chi^2 = 3.213$, $P = 0.201$) กล่าวคือความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลไม่สัมพันธ์กับภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง

ตารางที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* (rs11567842) กับภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกต่างๆ

Population	Genotype			Allele frequency	
	AA (%)	AG (%)	GG (%)	A	G
A: urinary potassium					
Hypokaliuria (n = 111)	62 (55.9)	46 (41.4)	3 (2.7)	0.766	0.234
Normokaliuria (n = 47)	20 (42.6)	20 (42.6)	7 (14.9)	0.638	0.362
	$(\chi^2 = 8.889, P = 0.012)$			$(\chi^2 = 5.417, P = 0.020)$	
B: urinary magnesium					
Hypomagnesiuria (n = 97)	53 (54.6)	42 (43.3)	2 (2.1)	0.763	0.237
Normomagnesiuria (n = 61)	29 (47.5)	24 (39.3)	8 (13.1)	0.672	0.328
	$(\chi^2 = 7.732, P = 0.021)$			$(\chi^2 = 3.114, P = 0.078)$	
C: urinary sodium					
Normonatriuria (n = 86)	50 (58.1)	33 (38.4)	3 (3.5)	0.773	0.227
Hypernatruria (n = 72)	32 (44.4)	33 (45.8)	7 (9.7)	0.674	0.326
	$(\chi^2 = 4.345, P = 0.114)$			$(\chi^2 = 3.929, P = 0.047)$	
D: urinary calcium					
Normocalciuria (n = 147)	78 (53.1)	61 (41.5)	8 (5.4)	0.738	0.262
Hypercalciuria (n = 11)	4 (36.4)	5 (45.5)	2 (18.2)	0.591	0.409
	$(\chi^2 = 3.213, P = 0.201)$			$(\chi^2 = 2.239, P = 0.135)$	

Data are given as numbers (%), n=number of subjects. P value evaluated using chi-square test and all P value are two tailed. Genotype and allele frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P = 0.746$ and $P = 0.556$ respectively).

4.14 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* (rs9890678) กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความหลากหลาย (SNP) ที่อยู่ในส่วนของ intron จำนวน 1 SNP ได้แก่ rs9890678 ซึ่งเป็น SNP ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T บริเวณ intron 5 ของยีน *NaDC-1*

สำหรับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ของจีโนไทป์ (genotype frequencies) และความถี่ของอัลลีล (allele frequencies) ของ rs9890678 ในยีน *NaDC-1* และระดับของซีเทรต และแร่ธาตุในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (ตารางที่ 18) พบว่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลของประชากรนั้นอยู่ในภาวะสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy – Weinberg Equilibrium หรือ HWE) ($P = 0.662$ และ $P = 0.524$) สำหรับค่าความถี่ของจีโนไทป์ (CC, CT และ TT) ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้งหมดเป็นร้อยละ 47.7, 40.2 และ 12.1 ตามลำดับ เมื่อพิจารณากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตตามค่าซีเทรตและแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ โพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ แมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ โซเดียมในปัสสาวะสูงและแคลเซียมในปัสสาวะสูงกับจีโนไทป์ rs9890678 พบว่าการกระจายตัวของ rs9890678 genotype ระหว่างกลุ่มต่างๆไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรืออาจกล่าวได้ว่าความถี่ของจีโนไทป์และอัลลีลของ rs9890678 ไม่สัมพันธ์กับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ โพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ แมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ โซเดียมในปัสสาวะสูงและแคลเซียมในปัสสาวะสูง

ตารางที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* (rs9890678) กับภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกต่างๆ

Population	Genotype			Allele frequency	
	CC (%)	CT (%)	TT (%)	C	T
All subjects (n = 132)	63 (47.7)	53 (40.2)	16 (12.1)	0.678	0.322
A: urinary citrate					
Hypocitraturia (n = 106)	52 (49.1)	40 (37.7)	14 (13.2)	0.679	0.321
Normocitraturia (n = 26)	11 (42.3)	13 (50.0)	2 (7.7)	0.673	0.327
	$(\chi^2 = 1.505, P = 0.471)$			$(\chi^2 = 0.007, P = 0.933)$	
B: urinary potassium					
Hypokaliuria (n = 102)	48 (47.1)	41 (40.2)	13 (12.7)	0.672	0.328
Normokaliuria (n = 30)	15 (50.0)	12 (40.0)	3 (10.0)	0.700	0.300
	$(\chi^2 = 0.186, P = 0.911)$			$(\chi^2 = 0.172, P = 0.678)$	
C: urinary magnesium					
Hypomagnesiuria (n = 85)	37 (43.5)	36 (42.4)	12 (14.1)	0.647	0.353
Normomagnesiuria (n = 47)	26 (55.3)	17 (36.2)	4 (8.5)	0.734	0.266
	$(\chi^2 = 1.955, P = 0.376)$			$(\chi^2 = 2.098, P = 0.147)$	
D: urinary sodium					
Normonatriuria (n = 79)	41 (51.9)	28 (35.4)	10 (12.7)	0.696	0.304
Hypernatriuria (n = 53)	22 (41.5)	25 (47.2)	6 (11.3)	0.651	0.349
	$(\chi^2 = 1.851, P = 0.396)$			$(\chi^2 = 0.595, P = 0.440)$	
E: urinary calcium					
Normocalciuria (n = 124)	57 (46.0)	51 (41.1)	16 (12.9)	0.665	0.335
Hypercalciuria (n = 8)	6 (75.0)	2 (25.0)	0 (0)	0.875	0.125
	$(\chi^2 = 2.846, P = 0.241)$			$(\chi^2 = 3.027, P = 0.082)$	

Data are given as numbers (%), n=number of subjects. P value evaluated using chi-square test and all P value are two tailed. Genotype and allele frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P = 0.662$ and $P = 0.524$ respectively).

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยไทยโรคนิวไต และเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* กับระดับของซีเทรตและแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียมในปัสสาวะของผู้ป่วยไทยโรคนิวไต

งานวิจัยนี้ได้พบว่าค่า cut off ของระดับซีเทรตในปัสสาวะเป็น 200 mg/gCr สำหรับใช้ในการจำแนกระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับคนปกติ รวมทั้งพบว่าค่าซีเทรตในปัสสาวะระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับคนปกติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงความชุกของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ พบว่าความชุกของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไตสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำต่อการเกิดโรคนิวไต พบว่าผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำมีความเสี่ยงของการเป็นโรคนิวไตเป็น 9.36 เท่าของผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะปกติ

สำหรับผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* พบเพียงหนึ่ง SNP ที่อยู่ในส่วนของ exon ได้แก่ rs11567842 ซึ่งเป็น SNP ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตัวที่ 550 จาก isoleucine เป็น valine (p.I550V) โดยที่อัลลีล A เป็น major allele และอัลลีล G เป็น minor allele ซึ่งมีความถี่ของอัลลีล A และ G เท่ากับ 0.73 และ 0.27 ตามลำดับ พบความถี่ของจีโนไทป์ AA, AG และ GG เป็นร้อยละ 51.9, 41.8 และ 6.3 ตามลำดับ พบว่าผู้ป่วยโรคนิวไตที่มีจีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับภาวะซีเทรต โพแทสเซียม และแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ผู้ป่วยโรคนิวไตที่มีจีโนไทป์ GG จะลดความเสี่ยงของการมีภาวะซีเทรต โพแทสเซียม และแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำลงเมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคนิวไตที่มีจีโนไทป์ AA

จากการวิเคราะห์ระดับของ urinary inhibitory factors ตามจีโนไทป์ของ rs11567842 พบว่าผู้ป่วยโรคนิวไตที่มีจีโนไทป์ GG จะมีระดับซีเทรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และโซเดียมในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตกับแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไต พบว่าระดับของซีเทรตในปัสสาวะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียมในปัสสาวะ

5.2 อภิปรายผล

จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน exons ของยีน *NaDC-1* พบความหลากหลายเพียงหนึ่ง SNP ที่อยู่ในส่วนของ exon ได้แก่ rs11567842 ซึ่งเป็น SNP ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตัวที่ 550 จาก isoleucine เป็น valine (p.I550V) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Pajor AM และคณะ (53)

ในมนุษย์ยีน *NaDC-1* ประกอบไปด้วย 11 transmembrane domains โดยที่กรดอะมิโนตัวที่ 550 นั้นจะอยู่ในส่วนสุดท้ายของ transmembrane domains ซึ่งเป็นส่วนที่ติดกับ C-terminal ได้แก่ transmembrane domains ที่ 11 (ภาพที่ 4) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีน *NaDC-1* ในกระต่ายซึ่งประกอบไปด้วย 11 transmembrane domains เช่นเดียวกับในมนุษย์ โดยพบว่ามีส่วนของกรดอะมิโนที่อยู่ในส่วนของ C-terminal half ซึ่งได้แก่ transmembrane domains ที่ 7-11 มีความเกี่ยวข้องกับ substrate recognition และ cation affinity (54, 55) จากการทำงานของโปรตีนขนส่ง *NaDC-1* ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งซิเทรตที่ผ่านการกรองจากโกลเมอรูลัสเข้าสู่เซลล์บุท่อไต บริเวณ proximal tubule และจาก SNP ที่พบซึ่งอยู่ในส่วนของ exon 12 ได้แก่ rs11567842 เป็น SNP ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตัวที่ 550 จาก isoleucine เป็น valine ดังนั้น rs11567842 อาจจะมีผลเกี่ยวข้องกับหน้าที่ของ *NaDC-1* ในการขนส่งซิเทรตซึ่งแสดงว่า rs11567842 อาจจะมีผลทำให้มีความเปลี่ยนแปลงของอัตราการถอดรหัส (transcription) หรือ stability ของยีน *NaDC-1* โดยจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ที่พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA จะมีระดับซิเทรตในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าจีโนไทป์ AA ของ rs11567842 อาจจะมีผลต่อการ transcription หรือ stability ของยีน *NaDC-1* แล้วทำให้โปรตีน *NaDC-1* มีการทำงานมากยิ่งขึ้นจึงดูดกลับซิเทรตเข้าสู่เซลล์บุท่อไตมากยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้มีระดับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะลดลง ในทางกลับกันผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG ที่มีระดับซิเทรตในปัสสาวะสูงกว่า แสดงว่า rs11567842 ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G แล้วอาจจะส่งผลต่อการ transcription หรือ stability ของยีน *NaDC-1* เช่นเดียวกันแล้วทำให้โปรตีน *NaDC-1* มีการทำงานน้อยลงจึงทำให้การดูดกลับซิเทรตเข้าสู่เซลล์บุท่อไตลดลง ดังนั้นจึงส่งผลให้ระดับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น

ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) เป็นความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่มักพบได้ทั่วไปในผู้ป่วยโรคไต (39, 56-58) โดยภาวะนี้มักเกิดขึ้นร่วมกับภาวะโพแทสเซียมและแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (13, 17, 19, 59) จากผลการศึกษาพบว่าระดับของซิเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยไทยโรคไตไตนั้นมีค่าต่ำกว่าที่มีรายงานการวิจัยในต่างประเทศในแถบทวีปยุโรปและสหรัฐอเมริกา (14)

จากการที่ระดับการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะจะขึ้นอยู่กับอายุและเพศ ดังนั้นในการวัดระดับซีเทรตในปัสสาวะเป็นอัตราส่วนของการขับออกของครีเอตินินในปัสสาวะ (mg/gCr) จะให้ผลการวัดที่ดีกว่าดังเช่นที่มีการใช้ในงานวิจัยหลายๆงานก่อนหน้านี้ (28, 34, 60-62) ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis เพื่อจะหาค่า cut off ที่เหมาะสมของระดับซีเทรตในปัสสาวะในผู้ป่วยไทยโรคนี้ไว้ได้ จากผลของ ROC curve ได้เลือกค่า cut off ที่ 200 mg/gCr เพื่อจะคำนวณค่าวินิจฉัย ผู้วิจัยพบว่าค่า cut off ที่เลือกนั้นสามารถนำมาใช้เป็น diagnostic marker ที่ดีในการบ่งชี้ถึงความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว (sensitivity 77.85%, specificity 69.53% และ negative predictive value 71.77%) ดังนั้นเมื่อเลือกใช้ค่า cut off ที่ 200 mg/gCr จะพบภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำหรือมีซีเทรตต่ำกว่าหรือเท่ากับ 200 mg/gCr คิดเป็นร้อยละ 77.84 ซึ่งสูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่พบประมาณ 70% (30) และสูงกว่าพอสมควรเมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคนี้ไว้เชื้อชาติอื่น (20-60%) (16) อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ MALONEY ME และคณะที่พบว่าในคนเอเชียพบภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำที่สูงกว่าในคนเชื้อชาติอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าระดับของซีเทรตในปัสสาวะของคนเอเชียจะต่ำกว่าในคนเชื้อชาติอื่นๆ (63)

รายงานวิจัยของ He y และคณะพบว่าในผู้ป่วยที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำจะมีการแสดงออกของ NaDC-1 สูงที่บริเวณไต (64) นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Chuaypen และคณะ พบว่าการแสดงออกของ NaDC-1 ที่เพิ่มสูงขึ้นในภาวะที่เป็นกรด สัมพันธ์กับการขับออกของซีเทรตที่ลดลงทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* (43) ที่สำคัญคือจากงานวิจัยของ Okamoto และคณะ พบความสัมพันธ์ระหว่าง p.I550V NaDC-1 polymorphism กับระดับของซีเทรตในปัสสาวะในผู้ป่วยโรคนี้ไว้และคนปกติ (22) งานวิจัยนี้ในผู้ป่วยไทยโรคนี้ไว้ได้มีค่าความถี่ของอัลลลของ A และ G เป็น 0.782 และ 0.272 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างจากผู้ป่วยเชื้อชาติญี่ปุ่น (0.591 และ 0.409 ตามลำดับ) และผู้ป่วยเชื้อชาติ Yucatan (0.403 and 0.597 ตามลำดับ) สำหรับค่าความถี่ของจีโนไทป์ของ rs11567842 ของผู้ป่วยไทยโรคนี้ไว้สอดคล้องกับผลของรายงานศึกษาในประเทศญี่ปุ่นที่ได้รายงานค่าความถี่ของจีโนไทป์ AA, AG และ GG ของผู้ป่วยโรคนี้ไว้เป็นร้อยละ 39.1, 40.0 และ 20.9 ตามลำดับ (22) ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าความถี่ของจีโนไทป์ของ SNP นี้แตกต่างจากเชื้อชาติอื่น ในผู้ป่วยเชื้อชาติ Yucatan ในประเทศ Mexico พบจีโนไทป์ AA ในผู้ป่วยโรคนี้ไว้จำนวน 29 คน (20.86%) จีโนไทป์ AG ในผู้ป่วยโรคนี้ไว้จำนวน 54 คน (38.85%) และจีโนไทป์ GG ในผู้ป่วยโรคนี้ไว้จำนวน 56 คน (40.29%) การกระจายตัวของ rs11567842 genotype ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะ hypocitraturia และ normocitraturia ไม่แตกต่างกัน (65) ที่น่าสนใจคือ

จีโนไทป์ GG พบในผู้ป่วยเชื้อชาติ Yucatan มากกว่าผู้ป่วยไทยและญี่ปุ่น จากผลการศึกษาที่ได้นั้น แสดงให้เห็นว่าความถี่ของ rs11567842 มีการแปรผันไปตามเชื้อชาติที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จาก งานวิจัยนี้พบว่าผลที่ได้สอดคล้องไปกับผลของรายงานวิจัยของ Okamoto และคณะ โดยพบว่าผู้ป่วย ที่มีจีโนไทป์ AA จะมีระดับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าจีโนไทป์ AA มีความสัมพันธ์กับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ

ตารางที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบค่าความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของ rs11567842 ของยีน NaDC-1

Population	Genotype			Allele frequency	
	AA (%)	AG (%)	GG (%)	A	G
Thailand (n = 158)	82 (51.9)	66 (41.8)	10 (6.3)	0.728	0.272
Japanese (n = 105) ⁽²²⁾	41 (39.1)	42 (40.0)	22 (20.9)	0.591	0.409
Yucatan (Mexico) (n = 35) ⁽⁶⁵⁾	29 (20.9)	54 (38.9)	56 (40.3)	0.403	0.597

Data are given as numbers (%), n=number of subjects.

สำหรับ SNP rs11567842 นั้นสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะ ในผู้ป่วยโรคนี้ไต จากงานวิจัยของ Pajor AM และคณะ จีโนไทป์ AG/GG จะทำให้การ sorting ของ โปรตีนที่จะไปยัง plasma membrane ลดน้อยลง ทำให้จำนวนของ NaDC-1 transporter ที่ plasma membrane ลดจำนวนลงประมาณ 20% ส่งผลต่อ sodium/citrate reabsorption (21) ผลที่ได้นั้นทำให้การขับออกของซิเทรตที่ renal proximal tubular cells ขับออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อ เทียบกับจีโนไทป์ AA (wild-type) ในปัจจุบันนั้นแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานการศึกษาที่แน่ชัดเกี่ยวกับ ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ AA กับการเกิดนี้ไต อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ยืนยันผลที่แน่ชัดว่า พบภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนี้ไต ด้วยเหตุนี้ผู้ป่วยโรคนี้ไตที่มีภาวะซิเทรตในปัสสาวะ ต่ำและมีจีโนไทป์ AA ควรที่จะพิจารณาในการที่จะได้รับซิเทรตเพิ่มเติมอย่างเพียงพอเพื่อที่จะแก้ไข ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำและป้องกันการเกิดนี้ไตซ้ำ

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้สนใจศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน NaDC-1 กับระดับของโพแทสเซียมและแมกนีเซียมในปัสสาวะ จากผลการศึกษา พบว่าจีโนไทป์ GG นั้นสัมพันธ์กับการขับออกที่สูงขึ้นของแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะดังนี้ โพแทสเซียม

แมกนีเซียม แคลเซียม และโซเดียม เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ AA แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาที่อธิบายถึงกลไกที่แน่ชัดเกี่ยวกับความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* และการขับของของแร่ธาตุต่างๆในปัสสาวะ ถึงแม้ว่าการทำงานของ *NaDC-1* ที่มีการขนส่งโซเดียมเข้าด้วยทำให้อาจจะส่งผลทำให้การดูดกลับโซเดียมลดน้อยลงตามไปด้วยจึงทำให้โซเดียมในปัสสาวะมากขึ้น อย่างไรก็ตาม *NaDC-1* ไม่ใช่โปรตีนขนส่งหลักที่จะดูดกลับโซเดียม หากแต่ยังมีโปรตีนขนส่งอีกหลายชนิดที่ทำหน้าที่ดูดกลับโซเดียมมากกว่า ส่วนใหญ่นั้นการดูดกลับของโซเดียมมักเกิดขึ้นที่ epithelial sodium channels โดยการควบคุมของ aldosterone ด้วยเหตุนี้ระดับของโซเดียมในปัสสาวะอาจไม่ได้เป็นผลโดยตรงมาจากการทำงานที่ผิดปกติของ *NaDC-1* สำหรับในเรื่องนี้ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าการขับออกของแร่ธาตุที่เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นผลโดยอ้อมจากความผิดปกติของการทำงานของ *NaDC-1* โดยอาจจะเกิดมาจากการผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นคือจากการที่มีการสูญเสียอิออนออกทางปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น

จากการพบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ GG จะมีการขับออกของอิออนและแร่ธาตุในปัสสาวะที่สูงขึ้นนั้นสมมติฐานของผู้วิจัยที่คาดว่าน่าจะทำให้เกิดการขับออกของแร่ธาตุที่เพิ่มขึ้นอาจมาจากอิออนอิสระในปัสสาวะมีประจุสุทธิเป็นประจุลบส่วนใหญ่เท่ากับ -3 ทำให้สามารถที่จะสร้างพันธะไอออนิกร่วมกับแร่ธาตุต่างๆที่มีประจุบวกในของเหลวของร่างกาย ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และ โพแทสเซียมได้อย่างมีประสิทธิภาพและทำให้ละลายน้ำได้ดีมาก ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการดูดกลับของแร่ธาตุต่างๆและทำให้มีการขับออกของแร่ธาตุในปัสสาวะเพิ่มขึ้น (66) โดยปรากฏการณ์ที่กล่าวมาข้างต้นสามารถพบได้จากการเกิดภาวะ proximal type renal tubular acidosis (Type II RTA) สาเหตุนี้เกิดมาจากการที่ไม่สามารถดูดกลับ bicarbonate กลับเข้ามายังเซลล์ได้ทำให้มี bicarbonate ในปัสสาวะเพิ่มมากยิ่งขึ้น การที่มี bicarbonate สูงในปัสสาวะทำให้มีการจับรวมกับโพแทสเซียมส่งผลให้การดูดกลับของโพแทสเซียมผิดปกติทำให้เกิดภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะเพิ่มสูงได้และอาจทำให้เกิดภาวะโพแทสเซียมในเลือดต่ำ (hypokalemia)

นอกจากนี้อีกหนึ่งสมมติฐานของผู้วิจัยเกี่ยวข้องกับสารสังเคราะห์วิตามิน D ที่เกิดขึ้นบริเวณ proximal tubular cells ในภาวะ intracellular acidosis จะทำให้ *NaDC-1* บริเวณ proximal tubular cells ทำงานเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้มีการดูดกลับอิออนเข้าเซลล์เพิ่มมากยิ่งขึ้น เนื่องจากอิออนนั้นเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง bicarbonate จากการเกิดเมแทบอลิซึมขึ้นที่ไมโทคอนเดรีย (TCA cycle) จึงทำให้ความเป็นกรดภายในเซลล์ลดลง โดยการทำให้ pH มีความเป็นกลางเพิ่มมากขึ้น จากการที่มีจีโนไทป์ AG/GG ซึ่งส่งผลต่อ *NaDC-1* ทำให้การทำงานของ *NaDC-1* ลดน้อยลงอาจจะไปขัดขวางกลไกที่กล่าวมาข้างต้นนี้ และทำให้ยังคงมีภาวะ intracellular acidosis เกิดขึ้น

โดยภาวะ intracellular acidosis จะไปขัดขวางการสร้างวิตามิน D กล่าวคือการเปลี่ยนจาก 25(OH)-calciferol ไปเป็น active vitamin D (67) เนื่องจากการดูดกลับแคลเซียมที่บริเวณไตนั้น ต้องอาศัยวิตามิน D โดยผลของการขาดวิตามิน D ก็จะส่งผลให้การดูดซึมแคลเซียมลดลง ดังนั้นจึงทำให้แคลเซียมในปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามสมมติฐานทั้งหมดของผู้วิจัยนั้นต้องได้รับการศึกษาวิจัยเพิ่มขึ้นต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ที่พบในผู้ป่วยไทยโรคนิวไตได้แก่ p.I550V polymorphism มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับซีเทรตในปัสสาวะซึ่งเป็นสารยับยั้งนิวไตในปัสสาวะที่สำคัญ ดังนั้นคณะผู้วิจัยแนะนำว่า การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำมีความเสี่ยงของการเป็นโรคนิวไตเป็น 9.36 เท่าของผู้ที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะปกติ ดังนั้นคณะผู้วิจัยขอเสนอว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AA ควรได้รับการเสริมด้วยซีเทรตเพื่อลดโอกาสการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ และป้องกันการเกิดนิวไตซ้ำ และงานวิจัยนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคนิวไตที่มีจีโนไทป์ GG มีระดับของแร่ธาตุในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และโซเดียม ดังนั้นผู้ป่วยโรคนิวไตที่มีจีโนไทป์ GG ควรได้รับการติดตามผลของการเกิดโรคนิวไตต่อไปในอนาคต

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NaDC-1* ในงานวิจัยนี้มีจำนวนน้อย จึงควรเก็บจำนวนตัวอย่างของกลุ่มผู้ป่วยเพิ่ม นอกจากนี้ควรศึกษาเพิ่มในตัวอย่างกลุ่มควบคุม เพื่อสามารถเทียบผลที่อาจเกิดขึ้นว่าความหลากหลายนี้เกี่ยวข้องกับโรคนิวไตหรือไม่
2. การศึกษาในขั้นต่อไปคือการศึกษาด้าน exome เพื่อทำการหาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่นๆที่น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมซึ่งนำไปสู่การเกิดนิวไต เพื่อจะหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมที่มีบทบาทชัดเจนต่อการเกิดโรคนิวไต

รายการอ้างอิง

1. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet* 2006;367:333-44.
2. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest* 2005;115:2598-608.
3. Curhan GC. Epidemiology of stone disease. *Urol Clin North Am* 2007;34:287-93.
4. Romero V, Akpinar H, Assimos DG. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol* 2010;12:e86-96.
5. Amato M, Lusini ML, Nelli F. Epidemiology of nephrolithiasis today. *Urol Int* 2004;72 Suppl 1:1-5.
6. Evans K, Costabile RA. Time to development of symptomatic urinary calculi in a high risk environment. *J Urol* 2005;173:858-61.
7. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *Int J Urol* 1997;4:537-40.
8. Evan AP, Coe FL, Lingeman JE, Worcester E. Insights on the pathology of kidney stone formation. *Urol Res* 2005;33:383-9.
9. Jungers P, Joly D, Barbey F, Choukroun G, Daudon M. ESRD caused by nephrolithiasis: prevalence, mechanisms, and prevention. *Am J Kidney Dis* 2004;44:799-805.
10. Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int* 1978;13:361-71.
11. Parmar MS. Kidney stones. *BMJ* 2004;328:1420-4.
12. Tosukhowong P, Borvonpadungkitti S, Prasongwatana V, Tungsanga K, Jutuporn S, Dissayabutr T, et al. Urinary citrate excretion in patients with renal stone: roles of leucocyte ATP citrate lyase activity and potassium salts therapy. *Clin Chim Acta* 2002;325:71-8.

13. Reungjui S, Prasongwatana V, Premgamone A, Tosukhowong P, Jirakulsomchok S, Sriboonlue P. Magnesium status of patients with renal stones and its effect on urinary citrate excretion. *BJU Int* 2002;90:635-9.
14. Pak CY. Citrate and renal calculi: an update. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20:371-7.
15. Yungjermchan P PS, Ratchanon S, Pansin P, Tosukhowong P, Tungsanga K, Boon C. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. *Chula Med J* 2006;50:605-21.
16. Caudarella R, Vescini F. Urinary citrate and renal stone disease: the preventive role of alkali citrate treatment. *Arch Ital Urol Androl* 2009;81:182-7.
17. Sriboonlue P, Prasongwattana V, Tungsanga K, Tosukhowong P, Phantumvanit P, Bejraputra O, et al. Blood and urinary aggregator and inhibitor composition in controls and renal-stone patients from northeastern Thailand. *Nephron* 1991;59:591-6.
18. Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, Yachantha C, Tosukhowong P. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment. *Urol Res* 2005;33:65-9.
19. Domrongkitchaiporn S, Stitchantrakul W, Kochakarn W. Causes of hypocitraturia in recurrent calcium stone formers: focusing on urinary potassium excretion. *Am J Kidney Dis* 2006;48:546-54.
20. Goldberg H, Grass L, Vogl R, Rapoport A, Oreopoulos DG. Urine citrate and renal stone disease. *Cmaj* 1989;141:217-21.
21. Pajor AM, Sun NN. Single nucleotide polymorphisms in the human Na⁺-dicarboxylate cotransporter affect transport activity and protein expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299:F704-11.
22. Okamoto N, Aruga S, Matsuzaki S, Takahashi S, Matsushita K, Kitamura T. Associations between renal sodium-citrate cotransporter (hNaDC-1) gene polymorphism and urinary citrate excretion in recurrent renal calcium stone formers and normal controls. *Int J Urol* 2007;14:344-9.

23. Aruga S, Wehrli S, Kaissling B, Moe OW, Preisig PA, Pajor AM, et al. Chronic metabolic acidosis increases NaDC-1 mRNA and protein abundance in rat kidney. *Kidney Int* 2000;58:206-15.
24. Levi M, McDonald LA, Preisig PA, Alpern RJ. Chronic K depletion stimulates rat renal brush-border membrane Na-citrate cotransporter. *Am J Physiol* 1991;261:F767-73.
25. Windus DW, Cohn DE, Heifets M. Effects of fasting on citrate transport by the brush-border membrane of rat kidney. *Am J Physiol* 1986;251:F678-82.
26. Nicar MJ, Skurla C, Sakhaee K, Pak CY. Low urinary citrate excretion in nephrolithiasis. *Urology* 1983;21:8-14.
27. Rudman D, Kutner MH, Redd SC, 2nd, Waters WCt, Gerron GG, Bleier J. Hypocitraturia in calcium nephrolithiasis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:1052-7.
28. Minisola S, Rossi W, Pacitti MT, Scarnecchia L, Bigi F, Carnevale V, et al. Studies on citrate metabolism in normal subjects and kidney stone patients. *Miner Electrolyte Metab* 1989;15:303-8.
29. Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand : update 2007. *Asian Biomedicine* 2007;1:87-95.
30. Sritippayawan S, Borvornpadungkitti S, Paemane A, Predanon C, Susaengrat W, Chuawattana D, et al. Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urol Res* 2009;37:141-6.
31. Eisner BH, Porten SP, Bechis SK, Stoller ML. The role of race in determining 24-hour urine composition in white and Asian/Pacific Islander stone formers. *J Urol* 2010;183:1407-11.
32. Barcelo P, Wuhl O, Servitge E, Rousaud A, Pak CY. Randomized double-blind study of potassium citrate in idiopathic hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol* 1993;150:1761-4.
33. Pak CY, Fuller C, Sakhaee K, Preminger GM, Britton F. Long-term treatment of calcium nephrolithiasis with potassium citrate. *J Urol* 1985;134:11-9.

34. Shah O, Assimos DG, Holmes RP. Genetic and dietary factors in urinary citrate excretion. *J Endourol* 2005;19:177-82.
35. Coe FL, Parks JH, Asplin JR. The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med* 1992;327:1141-52.
36. Hamm L, Alpern R. Regulation of acid-base balance, citrate, and urine pH. In: Coe FL, Pak CYC, Parks JH, Preminger GM, editors. *Kidney Stones: Medical and Surgical Management* Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:289-302.
37. Cano N. Inter-relationships between renal metabolism (both in physiology and renal dysfunction) and the liver. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:279-85.
38. Zuckerman JM, Assimos DG. Hypocitraturia: pathophysiology and medical management. *Rev Urol* 2009;11:134-44.
39. Hess B, Michel R, Takkinen R, Ackermann D, Jaeger P. Risk factors for low urinary citrate in calcium nephrolithiasis: low vegetable fibre intake and low urine volume to be added to the list. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:642-9.
40. Kok DJ, Iestra JA, Doorenbos CJ, Papapoulos SE. The effects of dietary excesses in animal protein and in sodium on the composition and the crystallization kinetics of calcium oxalate monohydrate in urines of healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:861-7.
41. Liu L, Zacchia M, Tian X, Wan L, Sakamoto A, Yanagisawa M, et al. Acid regulation of NaDC-1 requires a functional endothelin B receptor. *Kidney Int* 2010;78:895-904.
42. He Y, Chen X, Yu Z, Wu D, Lv Y, Shi S, et al. Sodium dicarboxylate cotransporter-1 expression in renal tissues and its role in rat experimental nephrolithiasis. *J Nephrol* 2004;17:34-42.
43. Chuaypen N, Boonla C, Dissayabutra T, Predanon C, Ruangvejvorachai P, Waiwijit U, et al. Increased intrarenal expression of sodium-dicarboxylate cotransporter-1 in nephrolithiasis patients with acidic urine pH. *Asian Biomedicine* 2013;7:571-7.
44. Pajor AM. Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflugers Arch* 2014;466:119-30.

45. Pajor AM. Sequence and functional characterization of a renal sodium/dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 1995;270:5779-85.
46. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1568-73.
47. Monga M, Macias B, Groppo E, Hargens A. Genetic heritability of urinary stone risk in identical twins. *J Urol* 2006;175:2125-8.
48. Rungroj N, Sritippayawan S, Thongnoppakhun W, Paemanee A, Sawasdee N, Nettuwakul C, et al. Prothrombin haplotype associated with kidney stone disease in Northeastern Thai patients. *Urology* 2011;77:249 e17-23.
49. Rungroj N, Sudtachat N, Nettuwakul C, Sawasdee N, Praditsap O, Jungtrakoon P, et al. Association between human prothrombin variant (T165M) and kidney stone disease. *PLoS One* 2012;7:e45533.
50. Squires RD, Huth EJ. EXPERIMENTAL POTASSIUM DEPLETION IN NORMAL HUMAN SUBJECTS. I. RELATION OF IONIC INTAKES TO THE RENAL CONSERVATION OF POTASSIUM. *J Clin Invest* 1959;38:1134-48.
51. Koo HS, Kim YC, Ahn SY, Oh SW, Kim S, Chin HJ, et al. Estimating 24-Hour Urine Sodium Level with Spot Urine Sodium and Creatinine. *J Korean Med Sci* 2014;29:S97-S102.
52. Pak CY, Oata M, Lawrence EC, Snyder W. The hypercalciurias. Causes, parathyroid functions, and diagnostic criteria. *J Clin Invest* 1974;54:387-400.
53. Pajor AM. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney. *Am J Physiol* 1996;270:F642-8.
54. Pajor AM, Sun N, Bai L, Markovich D, Sule P. The substrate recognition domain in the Na⁺/dicarboxylate and Na⁺/sulfate cotransporters is located in the carboxy-terminal portion of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1998;1370:98-106.
55. Kahn ES, Pajor AM. Determinants of substrate and cation affinities in the Na⁺/dicarboxylate cotransporter. *Biochemistry* 1999;38:6151-6.
56. Cupisti A, Morelli E, Lupetti S, Meola M, Barsotti G. Low urine citrate excretion as main risk factor for recurrent calcium oxalate nephrolithiasis in males. *Nephron* 1992;61:73-6.

57. Hamm LL, Hering-Smith KS. Pathophysiology of hypocitraturic nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002;31:885-93, viii.
58. Hodgkinson A. Citric acid excretion in normal adults and in patients with renal calculus. *Clin Sci* 1962;23:203-12.
59. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in men: new insights after 14 years of follow-up. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3225-32.
60. Parks J, Coe F. Urine Citrate and Calcium in Calcium Nephrolithiasis. In: Massry S, Olmer M, Ritz E, editors. *Phosphate and Mineral Homeostasis. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 208: Springer US; 1986. p. 445-9.
61. Nikkila M, Koivula T, Jokela H. Urinary citrate excretion in patients with urolithiasis and normal subjects. *Eur Urol* 1989;16:382-5.
62. Nikkila MT. Urinary glycosaminoglycan excretion in normal and stone-forming subjects: significant disturbance in recurrent stone formers. *Urol Int* 1989;44:157-9.
63. Maloney ME, Springhart WP, Ekeruo WO, Young MD, Enemchukwu CU, Preminger GM. Ethnic background has minimal impact on the etiology of nephrolithiasis. *J Urol* 2005;173:2001-4.
64. He Y, Chen X, Yu Z. [The change of human Na⁺/dicarboxylate co-transporter 1 expression in the kidney and its relationship with pathogenesis of nephrolithiasis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001;81:1066-9.
65. Medina-Escobedo M, Franco-Bocanegra D, Villanueva-Jorge S, González-Herrera L. The I550V polymorphism in the renal human sodium/dicarboxylate cotransporter 1 (hNaDC-1) gene is associated with the risk for urolithiasis in adults from Southeastern, Mexico. *Open Journal of Genetics* 2013;3:59-66.
66. Hamm LL. Renal handling of citrate. *Kidney Int* 1990;38:728-35.
67. Kawashima H, Kraut JA, Kurokawa K. Metabolic acidosis suppresses 25-hydroxyvitamin in D3-1alpha-hydroxylase in the rat kidney. Distinct site and mechanism of action. *J Clin Invest* 1982;70:135-40.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลงานวิทยานิพนธ์ได้รับการพิจารณาตีพิมพ์ลงวารสารยูโร (Thai J Urol) ในหัวข้อเรื่อง
 “Polymorphism of sodium-dicarboxylate cotransporter-1 gene is associated with
 hypocitraturia in patients with nephrolithiasis”



วารสารยูโร The Thai Journal of Urology

วารสารวิชาการของสมาคมศัลยแพทย์ระบบปัสสาวะแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์
 The Thai Urological Association under the Royal Patronage

สำนักงานวารสาร : หน่วยศัลยศาสตร์ระบบปัสสาวะ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตใหญ่ จ.สงขลา 90110
 โทรศัพท์ : (662) 716-6672, 6681-988-8408 โทรสาร : (662) 716-6672 E-Mail :
 thajournalurology@gmail.com

ที่ ศช.0521.1.0610(7)/ 34

วันที่ ๗ กรกฎาคม 2558

เรื่อง การรับลงตีพิมพ์ต้นฉบับในวารสารยูโร

เขียน นางสาวกัทรินทร์ ชุตมศิลป์

ตามที่ท่านกรุณาให้เกียรติส่งบทความเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนโซเดียมไดคาร์บอกซิเลตโคทรานสปอร์เตอร์-1 ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ เพื่อตีพิมพ์ในวารสารยูโรนั้น กองบรรณาธิการวารสารยูโร ได้รับบทความดังกล่าวแล้ว และดำเนินการในขั้นตอนพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ โดยคาดว่าจะนำบทความลงตีพิมพ์ในวารสารยูโร ปีที่ 36 เล่มที่ 2 และหลังจากวารสารฉบับดังกล่าวได้ตีพิมพ์เผยแพร่แล้ว ท่านสามารถเข้าไปอ่านต้นฉบับได้ใน website ของสมาคมศัลยแพทย์ระบบปัสสาวะแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ tuanet.org

กองบรรณาธิการฯ หวังว่า จะได้รับบทความที่น่าสนใจจากท่าน เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสาร ยูโรในโอกาสต่อไป

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงมณฑิรา ตันพานิช)
 บรรณาธิการวารสารยูโร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวภัทริน อุดมศิลป์

(ภาษาอังกฤษ) MISS PATTARIN UDOMSILP

วัน เดือน ปีเกิด : 26 มีนาคม พ.ศ.2534

เพศ : หญิง

อายุ : 24 ปี

สถานภาพ : โสด

ที่อยู่ : 89/162 หมู่บ้าน ชัยพฤกษ์-บางใหญ่ ถนน บางรักใหญ่-บ้านใหม่ ตำบล เสาธง
หิน อำเภอบางใหญ่ นนทบุรี 11140

เบอร์โทรศัพท์ : 0909863351

E-mail : ps_poiz@hotmail.com

การทำงาน : -

ประวัติการศึกษา : พ.ศ. 2552-2556 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนการศึกษา : ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยเพื่อ
เฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา