บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคนิ่วไต (kidney stone disease หรือ nephrolithiasis) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในทุกภูมิภาคทั่วโลก โดยพบความชุกตั้งแต่ร้อยละ 1-20 ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของโรคนิ่วไตสูง (stone belt) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ [1] พบความชุกของโรคนิ่วไตซึ่งตรวจโดยวิธีอัลตราซาวด์ สูงถึงร้อยละ 16.9 ในจังหวัดขอนแก่น นอกจากนี้ยังพบว่ามีอัตราการเกิดนิ่วซ้ำ (recurrent stone) สูงถึงร้อยละ 25 ในปีแรก และร้อยละ 39 ภายในปีที่สอง [2] ผู้ป่วยบางรายเป็นนิ่วซ้ำ 5-6 ครั้งในเวลา 10 ปี ทำให้เสี่ยงต่อภาวะไตวายเรื้อรัง นอกจากผลกระทบต่อสุขภาพโดยตรงแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อวิถีชีวิตและการประกอบอาชีพ รวมทั้งทำให้รัฐต้องสูญเสียงบประมาณในการดูแลรักษาเป็นจำนวนมาก

โรคนิ่วไตมีสาเหตุจากหลายปัจจัย (multifactorial disease) เกี่ยวข้องกับทั้งปัจจัยภายใน (intrinsic factors) เช่น พันธุกรรม ความผิดปกติของกายวิภาคของไต เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย และเชื้อชาติ เป็นต้น และจากปัจจัยภายนอก (extrinsic factors) เช่น การบริโภคน้ำและอาหาร ยา ภูมิอากาศ อาชีพ และความเครียด เป็นต้น [2] ความผิดปกติหรือปัจจัยเสี่ยงดังกล่าวจะส่งผลให้มีความผิดปกติทางเมแทบอลิก (metabolic abnormalities) [3] ได้แก่ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (hyperuricosuria) ภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง (hyperphosphaturia) ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) ภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypomagnesiuria) ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) และภาวะสมดุลของกรดด่างที่ผิดปกติ ความผิดปกติทางเมแทบอลิกเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อการอิ่มตัวของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ทำให้เกิดภาวะอิ่มตัวยวดยิ่ง (superaturation) และเกิดผลึกขึ้นในปัสสาวะ (crystaluria) ภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญมากที่สุด คือ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง และภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ เนื่องจากเป็นภาวะที่ส่งเสริมการรวมกลุ่มของผลึกนิ่วได้สูงกว่าภาวะอื่น [4] ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ คือภาวะที่ปริมาณการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะน้อยกว่า 320 มิลลิกรัมต่อวันในชาวตะวันตก สำหรับในประชากรไทยภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำเป็นปัจจัยเสี่ยงโรคนิ่วไตที่สำคัญที่สุด โดยค่า cutoff ของภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำคือน้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน [5]

องค์ประกอบในปัสสาวะแบ่งตามคุณสมบัติการก่อนิ่ว ได้ 2 กลุ่ม คือ 1) สารก่อนิ่ว (stone promoters) ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริก กรดอะมิโนซีสทีน เป็นต้น และ 2) สารยับยั้งนิ่ว (stone inhibitors) เช่น ซิเทรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม และโปรตีน เป็นต้น

กลไกการเกิดนิ่วเกิดจากการอิ่มตัวยวดยิ่ง (supersaturation) ของสารก่อนิ่วในปัสาวะ ซึ่งเป็นภาวะที่มีสารก่อนิ่วในปัสสาวะในปริมาณเข้มข้นสูงเกินกว่าจะคงสภาพเป็นสารละลายอยู่ได้ จึงตกผลึกของสารก่อนิ่วออกมา (nucleation) ผลึกที่เกิดขึ้นกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (oxidative stress) และการอักเสบ (inflammation) ทำให้เซลล์บุท่อไต (renal tubular epithelial cells) ถูกทำลายและเกิดเป็นตำแหน่งให้ผลึกเกาะติด (adherence) ได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้ผลึกคงค้างอยู่ในท่อไต (crystal retention) เมื่ออยู่ในภาวะนี้เรื้อรัง ผลึกจะรวมตัวกันมากขึ้น เจริญเป็นจุดศูนย์กลางของก้อนนิ่ว (stone nidus) และเจริญกลายเป็นก้อนนิ่ว (stones/ calculi) ในที่สุด อย่างไรก็ตามในคนปกติผลึกเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาในท่อไต แต่ผลึกจะไม่โตขึ้นและสามารถขับออกมาพร้อมกับปัสสาวะได้ เนื่องจากในปัสสาวะของคนปกติมีสารยับยั้งนิ่วมากพอ ดังนั้นภาวะ crystaluria อย่างเดียวไม่สามารถบ่งชี้ความเสี่ยงต่อโรคนิ่วได้ [6]

นิ่วมีหลายชนิดแบ่งตามชนิดของผลึกที่พบในก้อนนิ่วนั้นๆ เช่น นิ่วแคลเซียมออกซาเลต นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต นิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต และนิ่วกรดยูริก เป็นต้น นิ่วที่พบมากที่สุดทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต พบประมาณร้อยละ 73.8 รองลงมา คือ นิ่วกรดยูริก แคลเซียมฟอสเฟต และแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต พบร้อยละ 16, 5.5 และ 4.7 ตามลำดับ [7]

ความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคนิ่วไตไทย คือ hypocitraturia และ hypokaliuria ซิเทรตเป็นสารยับยั้งนิ่วที่มีศักยภาพสูงมาก (potent stone inhibitor) และภาวะ hypocitraturia จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกที่สำคัญที่สุดของการเกิดนิ่วซ้ำ [5] กลไกการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไตยังไม่ทราบแน่ชัด การดูดกลับของซิเทรต (citrate) เกิดขึ้นที่ renal proximal tubulues โดยอาศัยโปรตีนขนส่ง sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1) [8] ทำหน้าขนส่ง $citrate^{2-}$ เข้าเซลล์ร่วมกับโซเดียม (Na^+) ในสัดส่วน 1 $citrate^{2-}$: 3 Na^+ การศึกษาในหนูที่มีภาวะกรดเกิน (metabolic acidosis) พบว่ามีการแสดงออกของยีน *NaDC-1* เพิ่มขึ้น และการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าโปรตีน NaDC-1 มีประสิทธิภาพการทำงาน (activity) สูงขึ้นในภาวะที่เป็นกรด [9] รายงานวิจัยในหนูที่เป็นนิ่วร่วมกับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitrauric urolithic rats) พบระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA และ NaDC-1 protein สูงขึ้นเช่นเดียวกัน [10] เมื่อเร็วๆ นี้ Okamoto และคณะ [11] รายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน *NaDC-1* ที่ exon 12 มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต หลักฐานวิจัยเหล่านี้บ่งชี้ว่ายีน *NaDC-1* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะ hypocitraturia ในโรคนิ่วไต

ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) และระดับการแสดงออกของยีน *NaDC-1* (mRNA expression) น่าจะสัมพันธ์กับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำและความเสี่ยงต่อโรคนิ่วไต โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วน exons ของยีน *NaDC-1* และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตกับระดับการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะ ผลการศึกษาอาจทำให้ทราบปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำที่สามารถประยุกต์ใช้ทางคลินิกในอนาคตได้ และข้อมูลวิจัยที่ได้นี้จะทำให้ทราบกลไกการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในโรคนิ่วไตมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วน exons ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต
2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วน exons ของยีน *NaDC-1* ที่พบกับภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ
3. เพื่อวัดระดับของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต
4. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตกับภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษา ณ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย
2. กลุ่มควบคุม (control) เป็นอาสาสมัครคนปกติที่ไม่มีประวัติการเกิดโรคนิ่วไต ที่มีอายุและเพศตรงกับผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ เป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบคุณภาพ ความแม่นยำ และความเที่ยงตรง ตามมาตรฐานของการทดสอบของเครื่องมือนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ ตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อเป็นลายลักษณ์อักษรในใบยินยอม ภายหลังได้รับ

การชี้แจงให้ทราบรายละเอียดในทุกด้าน รวมถึงความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้น และผู้ป่วยสามารถถอนตัวออกจากโครงการได้ทุกเวลาตลอดการดำเนินโครงการศึกษาวิจัย

3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้าทำการรักษาโดยการผ่าตัดนิ่ว ณ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
4. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคนิ่วไต เก็บตัวอย่างเลือด ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และศัลยแพทย์จะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด
5. ผู้ทำการวิจัยจะซักประวัติและเก็บข้อมูลทางคลินิกที่เกี่ยวข้อง จากกลุ่มตัวอย่าง สำหรับในการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลวิจัย

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย ต้องเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และศัลยแพทย์ทางเดินปัสสาวะจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด ผู้ป่วยที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้หรือเก็บตัวอย่างปัสสาวะไม่ครบ 24 ชั่วโมงจะคัดออกหรือเก็บตัวอย่างใหม่
2. กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง มีผู้ป่วยจากภาคใต้และภาคเหนือจำนวนน้อย อาจมีผลต่อการ generalization ข้อมูลไปสู่กลุ่มประชากรโรคนิ่วไตทั่วประเทศและเชื้อชาติอื่นๆ

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Nephrolithiasis หรือ kidney stone หรือ renal stone คือ โรคนิ่วในไต ซึ่งมีก้อนนิ่วอยู่บริเวณตำแหน่งที่กรวยไต (renal pelvis) และสูงกว่ากรวยไตขึ้นไป
2. Biopsy การเจาะดูดเข็มขนาดต่างๆ เพื่อนำเอาเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ (tissue) ของสิ่งมีชีวิตที่ยังมีชีวิตอยู่มาตรวจวิเคราะห์
3. Hypocitraturia ภาวะที่มีระดับซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่า 200 mg/day (ในคนไทย)
4. Normocitraturia ภาวะที่มีระดับซิเทรตในปัสสาวะ ≥200 mg/day (ในคนไทย)
5. Metabolic acidosis ภาวะร่างกายเป็นกรด โดยมี blood pH < 7.35
6. Polymorphism ความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน
7. Single nucleotide polymorphism (SNP) ความหลากหลายทางพันธุกรรมใน DNA พบความแตกต่างของเบสเพียงตำแหน่งเดียว
8. DNA sequencing การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ DNA

9. PCR-RFLP (Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) เทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ และจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับจำแนกจีโนไทป์
10. Real-time RT-PCR เทคนิคการเปลี่ยน mRNA เป็น cDNA โดยการใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ร่วมกับเทคนิค Real-time PCR ที่สามารถทราบปริมาณได้ขณะที่ทำการเพิ่มจำนวน DNA (amplification)
11. Logistic regression เทคนิคการวิเคราะห์ตัวแปรเชิงพหุแบบหนึ่ง ใช้ทำนายค่าความน่าจะเป็น ใช้ในการวิเคราะห์ตัวแปรตอบสนอง หรือ ตัวแปรตาม ที่มีค่าของข้อมูลเพียง 2 ค่า เช่น การปรากฏโรคหรือไม่ปรากฏโรค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วน exons ของยีน *NaDC-1* ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *NaDC-1* กับความเสี่ยงต่อภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำและต่อการเกิดโรคนิ่วไต
3. ทราบระดับการแสดงออกของยีน *NaDC-1* ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต
4. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไตกับปริมาณการขับออกของซิเทรตในปัสสาวะ
5. เข้าใจบทบาทของ NaDC-1 ในโรคนิ่วไตมากขึ้น ซึ่งทำให้เข้าใจกลไกการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในระดับโมเลกุลมากขึ้น
6. นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประยุกต์ใช้ทางคลินิกในอนาคต เช่น ประเมินความเสี่ยงทางพันธุกรรมต่อภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ และประเมินความเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วซ้ำ เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต จำนวน 114 ราย และกลุ่มควบคุมคนปกติ จำนวน 62 ราย เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และตัวอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัดโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ เพื่อทำการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตรวจวัดระดับซิเทรตในปัสสาวะโดยวิธี citrate lyase method วัดระดับการแสดงออกของยีน *NaDC-1* ในเนื้อเยื่อไตโดยวิธี real time RT-PCR และวิเคราะห์หาลำดับเบส

ของยีน *NaDC-1* โดยวิธีหาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing) เมื่อพบ candidate single nucleotide polymorphism (SNP) แล้ว ตรวจสอบ genotype ของ candidate SNP โดยใช้เทคนิค PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ลำดับขั้นตอนการทดลองเป็นไปดังกรอบแนวคิดวิจัย

กรอบแนวคิดวิจัย (Conceptual framework)

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวมรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์
2. จัดทำนิพนธ์ต้นฉบับภาษาอังกฤษ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในจุฬาลงกรณ์เวชสาร