



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วทางเดินปัสสาวะและปัจจัยอันย้งนี้ในผู้ป่วย.....

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและบุคคลในครอบครัว

โดย ดร.นายแพทย์ รุสสิณัส ดิษยบุตร

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2557

สัญญาเลขที่ MRG5580174

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วทางเดินปัสสาวะและปัจจัยยับยั้งนิ่วในผู้ป่วย
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและบุคคลในครอบครัว

ผู้วิจัย สังกัด

- 1 ดร.นพ.ฐิติสั ดิษยบุตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2 ศ.ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580174

ชื่อโครงการ : ภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วทางเดินปัสสาวะและปัจจัยยับยั้งนิ่วในผู้ป่วยภาคตะวันออกเฉียงเหนือและบุคคลในครอบครัว

ชื่อนักวิจัย : ดร.นพ.ฐสินัส ดิษยบุตร คณะแพทยศาสตร์

อีเมลล์ : thasinasdr@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ: โรคนิ่วทางเดินปัสสาวะเป็นโรคทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยในผู้สูงวัยทั่วโลก ในประเทศไทยโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะพบมากผู้ที่อาศัยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าบุคคลในครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วมีความเสี่ยงต่อการโรคนิ่วในอนาคตสูงถึง 3.18 เท่าของคนปกติ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษหาปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วในเลือดและปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วเปรียบเทียบกับบุตรของคนปกติ ผู้เข้าร่วมโครงการจำนวน 148 คน ประกอบด้วย ผู้ป่วยโรคนิ่ว 28 คน บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่ว 40 คน ผู้ที่ไม่เป็นนิ่วที่อาศัยในเขตเดียวกับผู้ป่วย 46 คน และบุตรของผู้ไม่เป็นนิ่ว 34 คน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ 24 ชั่วโมง พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วมีระดับออกซาเลท โปรตีน อัลบูมินและกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะสูง แต่ซีเทรตและไกลโคสะมิโนไกลแคนชนิดที่มีหมู่ซัลเฟตในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ไม่เป็นนิ่วที่มีอายุและเพศไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีระดับปัสสาวะอิมตวียิงยวดสูงมาก ในขณะที่บุตรของผู้ป่วยซึ่งยังไม่เป็นนิ่วมีความผิดปกติคล้ายคลึงกับผู้ป่วยโรคนิ่วเมื่อเปรียบเทียบกับบุตรของผู้ไม่เป็นนิ่ว แม้จะมีความรุนแรงน้อยกว่าผู้ป่วยก็ตาม การศึกษานี้บ่งชี้ว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วมีความผิดปกติที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะตั้งแต่อายุน้อยและมีโอกาสในการพัฒนาไปเป็นโรคนิ่วได้ในอนาคต แพทย์จึงควรให้ความสนใจและตรวจติดตามบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วอย่างใกล้ชิดเพื่อสามารถให้การวินิจฉัยโรคและให้การรักษาได้อย่างทันท่วงที งานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานในการค้นหาว่าความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่วที่พบในครอบครัวผู้ป่วยเป็นผลมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อม เพื่อให้เข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของโรคและสามารถให้การป้องกันการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก: โรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ ครอบครัว ซีเทรต ออกซาเลท ไกลโคสะมิโนไกลแคนส์

Abstract

Project Code : MRG5580174

Project Title : Urinary stone disease risks and protection in northeast Thai patients and their relatives

Investigator : Dr.Thasinas Dissayabutra MD.,PhD.

E-mail Address : thasinasdr@gmail.com

Project Period : 2 years

Abstract: Urinary stone disease (USD) is a common urologic disease in elderly worldwide. In Thailand, the highest prevalence of USD was found in Northeast and North residents. Previous study clearly demonstrated that the USD relatives had 3.18 times relative risk higher than normal population to develop stones. In this study, we investigated the lithogenic biochemical abnormalities in blood and 24-hour urine of USD descendants compared to the non-stone-former descendants. One-hundred and forty-eight participants, including 28 USD patients with 40 of their children, and 46 non-stone formers with 34 of their children were enrolled. Blood and 24 hours urine were collected. We found that USD patients had higher urinary oxalate, protein, albumin and hyaluronic acid, but lower urinary citrate and sulfated glycosaminoglycans compared to the control. They also had higher urinary supersaturation than control as well. The USD descendants had similar, but less severe, urinary abnormalities compared with non-stone former descendants, even though they did not yet develop stone. Our study reviewed the biochemical risks for future

stone development in USD descendants. We suggested that the Urologist should recognize these risks in USD relatives to closely observe them in order to make a prompt diagnosis and treatment. This fundamental research needs to investigate whether these abnormalities are genetic or environment in origin, to provide the better understanding of the pathogenesis and the prophylaxis of USD.

Keywords : 3-5 words: Urinary stone, Family, Citrate, Oxalate, Glycosaminoglycans

Executive summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ (Kidney stone disease: KSD) เป็นโรคที่พบบ่อยและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของไทย โดยเฉพาะในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีรายงานพบสูงถึง 17.6% ในวัยผู้ใหญ่ ผู้ป่วยต้องทนทุกข์ทรมานจากอาการเจ็บปวด และในรายที่เป็นมากจำเป็นต้องทำการผ่าตัดไตออก KSD ไม่มีสาเหตุจำเพาะ และได้รับการพิจารณาว่าเป็นโรคที่มีหลากหลายสาเหตุ (multifactorial diseases) ทั้งปัจจัยภายใน (Intrinsic factors) และปัจจัยภายนอก (Extrinsic factors)

ปัจจัยภายใน ได้แก่ ความเสี่ยงทางพันธุกรรม มีการศึกษาทางสถิติในครอบครัวผู้ป่วย KSD ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าญาติสนิท (first-degree relatives) ของผู้ป่วยโรคนิ่วจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วสูงกว่าประชากรปกติถึง 3.18 เท่า นอกจากนี้ ยังมีรายงานจากทั่วโรคถึงลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีนต่างๆ ที่พบได้ในผู้ป่วย KSD อาทิเช่น ยีน vitamin D receptor, calcium sensing receptor หรือ osteopontin gene เป็นต้น นอกจากนี้ เพศและอายุยังมีความสำคัญเช่นกัน พบว่าผู้ชายมีความเสี่ยงต่อการเกิด KSD มากกว่าเพศหญิง (1.2:1 ถึง 2:1) ในขณะที่อายุที่พบโรคนิ่วมากที่สุด ได้แก่ช่วง 40-59 ปี คณะผู้วิจัยพบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตอายุน้อยกว่า 20 ปี มีเพียง 1% และอายุน้อยกว่า 30 ปี มีเพียงไม่เกิน 5% จากคนไข้ KSD ทั้งหมดจากการศึกษาก่อนหน้านี้ จึงเป็นไปได้ว่า โรคนิ่ว อาจเกิดจากความเสื่อมของร่างกาย เช่นเดียวกับโรคหัวใจและหลอดเลือดหรือกลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndrome)

มีการศึกษาก่อนหน้านี้โดยนักวิจัยต่างประเทศ พบว่า สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ในปัสสาวะ (urinary macromolecules) หลายชนิดซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการเกิดนิ่วนั้น เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น อาทิเช่น ในผู้ใหญ่ Tamm-Horsfall protein จะเกิดภาวะ desialylation เพิ่มขึ้น ทำให้ประจุลบลดลง ไม่สามารถยับยั้งการเกิดนิ่วได้ ในขณะที่ glycosaminoglycans (GAGs) จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดนิ่ว การบรรเทาการอักเสบจากผลึกนิ่ว และการตายของเซลล์จากภาวะเครียดทางออกซิเดชันลดลงในผู้ใหญ่เช่นกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสัดส่วนของ heparan sulfate ลดลง หรือ hyaluronan เพิ่มขึ้น

ปัจจัยภายนอก ได้แก่ ถิ่นที่อยู่อาศัย การดำเนินชีวิต อาหารและสุขนิสัยในการบริโภค มีความสำคัญต่อการเกิดโรคนิ่วเช่นกัน เป็นที่เชื่อกันโดยทั่วไปว่าประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนืออาศัยอยู่ภายใต้บรรยากาศที่ร้อน การทำงานภายใต้แสงแดด และการดื่มน้ำน้อย เป็นผลให้น้ำในเส้นเลือดลดลง ปัสสาวะจึงออกน้อยและมีความเข้มข้นของสารต่างๆ เพิ่มขึ้น ภาวะความอิ่มตัวเกิน (supersaturation) ของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ เช่น calcium และ oxalate ส่งเสริมให้เกิดการตกตะกอนเป็นผลึกนิ่วและก้อนนิ่วได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ รูปแบบสารอาหารของชาวอีสานประกอบด้วยอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตสูง ในขณะที่ผลไม้มีปริมาณน้อย การบริโภคอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีนเป็นสัดส่วนที่สูงเกินไปมีผลให้ร่างกายสลายพลังงานได้กรดปริมาณมาก เกิดภาวะกรดเกินในร่างกาย (metabolic acidosis) ซึ่งมีผลส่งเสริมการดูดกลับ citrate จากปัสสาวะ โดยที่ซิเตรตนั้นทำหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการตกตะกอนของ calcium oxalate crystal เมื่อถูกดูดกลับมากทำให้ปริมาณในปัสสาวะลดลง จึงเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วเพิ่มขึ้น ซิเตรตในร่างกายได้จากการรับประทานอาหารเป็นหลัก โดยมีมากในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว (citrus fruit) ซึ่งชาวอีสานปกติรับประทานเพียงเล็กน้อย ยิ่งทำให้ร่างกายขาดซิเตรตเพิ่มมากขึ้น และเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วสูงขึ้น งานวิจัยของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้พบว่าประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั่วไปประมาณครึ่งหนึ่งมีระดับซิเตรตในปัสสาวะต่ำ

และประมาณ 97% ของผู้ป่วย KSD มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia: urinary citrate < 200 ไมโครกรัมต่อวัน) ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในต่างประเทศ ที่มักพบความผิดปกติทางเมแทบอลิกของปัสสาวะ (urinary metabolic disorders) ที่ก่อให้เกิดนี้ส่วนมาก เป็นผลมาจากภาวะ hypercalciuria มากกว่ากึ่งหนึ่ง และมีภาวะ hypocitraturia กับภาวะ hyperoxaluria ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วย (จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย พบภาวะ hypercalciuria ประมาณ 12-15% และภาวะ hyperoxaluria น้อยกว่า 10% ในผู้ป่วย KSD ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

สารอิเล็กโทรไลต์ในปัสสาวะที่มีผลต่อการเกิดโรคนี้ แบ่งเป็น กลุ่มที่ส่งเสริมการเกิดนี้ ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต และยูริก ในขณะที่กลุ่มที่ยับยั้งการเกิดนี้ ได้แก่ ซีเทรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม เป็นต้น จากการศึกษาคณะผู้วิจัยพบว่า นอกจากชาวอีสานส่วนมากจะมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำแล้ว ยังพบภาวะ โพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำได้บ่อยเช่นกัน อันเป็นผลมาจากการรับประทานข้าวสอยและข้าวเหนียวแบบหุงเช็ดน้ำซึ่งมี โพแทสเซียมต่ำเป็นอาหารหลัก และรับประทานผลไม้ซึ่งมีโพแทสเซียมสูงในปริมาณที่น้อย นอกจากนี้ ยังพบว่าภาวะ กรดเกินในร่างกายทำให้ไตเพิ่มการกำจัดโปรตอนแลกกับการดูดกลับโพแทสเซียม ยังผลให้โพแทสเซียมในปัสสาวะ ลดลงอีก นอกจากนี้ ผักที่ชาวอีสานนิยมรับประทาน เช่น ผักตบชวา ผักขม แดงกวา คื่นชวา ผักขึ้นฉ่าย ฟริกหยวก มะเขือ กระเจี๊ยบ ผักชี ผักขม ธัญพืชและถั่ว มีปริมาณออกซาเลตสูง เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ hyperoxaluria และ สุดท้าย ภาวะกรดเกินในร่างกายมีผลกระตุ้นการสลายกระดูก ทำให้มีการขับแคลเซียมออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้นได้ ด้วย เหตุปัจจัยเหล่านี้ จะเห็นได้ว่า ปัจจัยภายนอก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการ ขาดน้ำและอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะเป็นปัจจัย ส่งเสริมให้เกิดนี้ได้อย่างมากในกลุ่มประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

อย่างไรก็ดี ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดที่เน้นศึกษาความผิดปกติทางชีวโมเลกุลในญาติสนิทของผู้ป่วย KSD โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มทายาทผู้ป่วย ซึ่งมีรูปแบบทางพันธุกรรม (ปัจจัยภายใน) ถิ่นที่อยู่อาศัย การดำเนินชีวิต และการบริโภค (ปัจจัยภายนอก) ที่คล้ายคลึงกับผู้ป่วยอย่างมาก อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาใดที่บ่งชี้ว่าเพราะเหตุใดโรคนี้ ทางเดินปัสสาวะจึงพบในผู้สูงวัยมากกว่าวัยเด็ก ทั้งที่มีความเสี่ยงในด้านปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกคล้าย ยคลึงกัน

วัตถุประสงค์

- ก. เพื่อศึกษาความผิดปกติทางเมแทบอลิกในปัสสาวะซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนี้ของผู้ป่วย KSD และ ทายาท เปรียบเทียบกับประชากรปกติ
- ข. เพื่อเปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนี้ในระดับชีวโมเลกุลในช่วงอายุต่างๆ ทั้งในกลุ่มครอบครัวผู้ป่วย KSD และครอบครัวปกติ

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย Group 1A คือ ผู้ป่วยโรคไตทางเดินปัสสาวะในประเทศไทย ที่มีถิ่นพำนักในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และมีอายุตั้งแต่ 30 ปีขึ้นไป โดยทำการคัดเลือกและรวบรวมกลุ่มตัวอย่าง ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี Group 1B คือ ทายาทของผู้ป่วยโรคไตที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ที่มีอายุตั้งแต่ 7 ปีขึ้นไป ทุกคน เนื่องจากการวิจัยนี้ต้องการศึกษาเปรียบเทียบความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตทางเดินปัสสาวะในญาติสนิท (first degree relatives) ที่มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม (ที่อยู่อาศัย รูปแบบการดำรงชีวิต อาหาร) การคัดเลือกประชากรตัวอย่างเข้าโครงการวิจัยนั้น ทั้งผู้ป่วย (ผู้ปกครอง) และทายาท (บุตร-ธิดา) จำเป็นต้องยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจด้วยกัน เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย และทายาท มีดังนี้

<u>เกณฑ์การคัดเลือกเข้า</u>	<u>เกณฑ์การคัดออก</u>
	<p>ทุกกลุ่ม</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นผู้ที่ไม่สามารถช่วยเหลือตนเองได้ หรือ มีความผิดปกติใดๆ ที่เป็นผลให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้ 2. ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้ด้วยเหตุผลใดก็ตาม 3. เป็นผู้ที่มีโรคไตวายเรื้อรังระดับที่ 3 ขึ้นไป ตามเกณฑ์การวินิจฉัยของ WHO ($GFR < 60\text{ml/min}/1.73\text{ m}^2$) 4. ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจโต ขาดเลือด หรือผิดปกติอื่นๆ ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย <p>เป็นผู้ที่มีโรคเรื้อรัง หรือโรคเฉียบพลันใดๆ รวมถึงมีผลข้างเคียงจากการรักษาที่มีผลให้องค์ประกอบของปัสสาวะผิดปกติ เช่น Nephrotic syndrome, metabolic bone disease, malignancy with bone metastasis, chronic liver disease, protein-calorie malnutrition, diuretic therapy, uricosuric drugs usage เป็นต้น</p>
<p>กลุ่มประชากรตัวอย่าง (ผู้ป่วยโรคไตทางเดินปัสสาวะ)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นผู้มีอายุตั้งแต่ 30 ปีขึ้นไป และไม่เกิน 70 ปี เมื่อนับถึงวันที่เข้าร่วมโครงการ* 2. ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไตทางเดินปัสสาวะ 3. ยังไม่ได้รับการรักษาโรคไตทางเดินปัสสาวะโดยใช่ยา 4. มีทายาท (บุตร-ธิดา) และยินยอมให้ทั้งตนเองและทายาทเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ 	<p>เกณฑ์การคัดออกกลุ่มประชากรตัวอย่าง</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ผู้ที่ทายาทตั้งแต่ครั้งหนึ่งขึ้นไปปฏิเสธที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัย

<p>กลุ่มทายาทผู้ป่วย</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นผู้ที่มียายุตั้งแต่ 7 ปีขึ้นไป เมื่อนับถึงวันที่เข้าร่วมโครงการ (สามารถสื่อสารให้เข้าใจ และให้ความร่วมมือในการเก็บสารชีวภาพได้) 2. อาศัยอยู่ในบ้านเดียวกันหรือใกล้เคียงกันกับผู้ป่วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะซึ่งเป็นผู้ปกครอง 3. ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ 	<p>เกณฑ์การคัดออกกลุ่มทายาทผู้ป่วย</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. มีใช้ทายาทโดยสายเลือด 2. มีได้อาศัยอยู่ในบ้านหรือบริเวณใกล้เคียงกับผู้ป่วยนานเกิน 1 ปี (สิ่งแวดล้อมต่างกัน) 3. เคยได้รับการวินิจฉัย หรือต้องสงสัย หรือได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ
<p>กลุ่มประชากรควบคุม</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ประชากรปกติที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกลุ่มประชากรตัวอย่าง และมีเพศกับอายุอยู่ใกล้เคียงกัน 2. มีทายาท (บุตร-ธิดา) และยินยอมให้ทั้งตนเองและทายาทเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ 	<p>เกณฑ์คัดออกกลุ่มประชากรควบคุม</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. เคยได้รับการวินิจฉัย หรือต้องสงสัย หรือได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ 2. ผู้ที่ทายาทตั้งแต่ครั้งหนึ่งขึ้นไปปฏิเสธที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัย
<p>กลุ่มทายาทปกติ (ทายาทกลุ่มควบคุม)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นผู้ที่มียายุตั้งแต่ 7 ปีขึ้นไป เมื่อนับถึงวันที่เข้าร่วมโครงการ (สามารถสื่อสารให้เข้าใจ และให้ความร่วมมือในการเก็บสารชีวภาพได้) 2. อาศัยอยู่ในบ้านเดียวกันหรือใกล้เคียงกันกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ปกครอง 3. ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ 	<p>เกณฑ์คัดออกกลุ่มทายาทประชากรควบคุม</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. มีใช้ทายาทโดยสายเลือด 2. มีได้อาศัยอยู่ในบ้านหรือบริเวณใกล้เคียงกับผู้ป่วยนานเกิน 1 ปี (สิ่งแวดล้อมต่างกัน) 3. เคยได้รับการวินิจฉัย หรือต้องสงสัย หรือได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ

ประชากรควบคุม

แบ่งเป็นสองกลุ่มเช่นกัน คือ Group 2A กลุ่มควบคุมผู้ใหญ่ ได้แก่ ประชากรปกติที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ และมีคุณสมบัติเข้าได้กับเกณฑ์การคัดเลือกอื่น ในขณะที่ไม่มีคุณสมบัติตรงกับเกณฑ์การคัดออก รวมถึงมีอายุและเพศใกล้เคียงกับประชากรตัวอย่างผู้ป่วย (gender- and age-matched) Group 2B คือ กลุ่มควบคุมทายาทประชากรปกติ การคัดเลือกประชากรควบคุมเข้าโครงการวิจัยนั้น ทั้งบิดาหรือมารดา (ผู้ปกครอง) และทายาท (บุตร-ธิดา) จำเป็นต้องได้รับการยินยอมเข้าร่วมโครงการงานวิจัยโดยสมัครใจด้วยกัน โดยคณะผู้วิจัยมีแผนที่จะทำการออกชุมชนเพื่อให้ความรู้ และเชื้อเชิญประชาชนที่สนใจให้เข้าร่วมโครงการโดยสมัครใจ

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบอัตราการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำสูงถึงร้อยละ 93 ในผู้ป่วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ [8] ในขณะที่ประชากรปกติภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความผิดปกติเพียงร้อยละ 50.6 [10] (อาศัยนิยามของภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ คือ น้อยกว่า 300 mg/g creatinine from 24 hour urine [58]) เนื่องจากภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเป็นปัจจัยเสี่ยงที่พบมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ชาวอีสาน คณะผู้วิจัยอาศัยโปรแกรม Power and Precision 4 Program (Biostat, New Jersey, USA, 2010, website: <http://www.power-analysis.com/home.htm>) เพื่อใช้ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง พบว่าขนาดตัวอย่างผู้ป่วยโรคนี้ที่เหมาะสม คือ ประมาณ 18 ราย หรือ 24 ราย หากคำนวณว่ามีโอกาสที่จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการจะหายไปร้อยละ 25 ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยตัดสินใจที่จะใช้ขนาดตัวอย่างผู้เข้าร่วมโครงการจำนวน 25 ราย เพื่อพิจารณาอนุমানให้ผู้เข้าร่วมโครงการมีจำนวนทายาทครอบครัวละ 1-4 คน (เฉลี่ย 2-5 คน ต่อครอบครัว หรือ คิดที่ 3 คนต่อครอบครัว) ดังนั้น จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการในแต่ละกลุ่ม คือ ประมาณไม่เกิน 100 ราย (4 x 25)

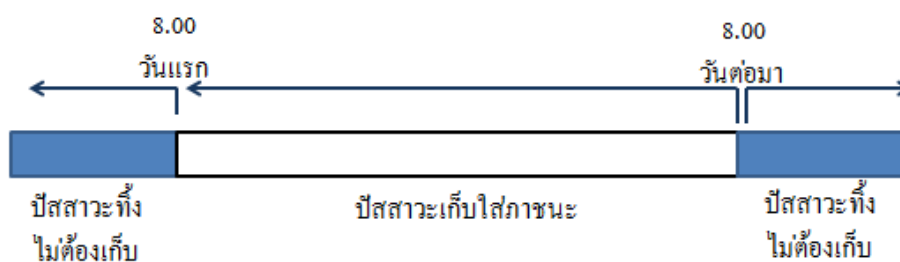
สถานที่ทำการวิจัยหลัก

1. การคัดเลือกประชากรตัวอย่าง กระทำที่ฝ่ายศัลยศาสตร์ยูโร โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นศูนย์การรวบรวมกลุ่มและคัดเลือกประชากรตัวอย่างเพียงแห่งเดียว (Single center)
2. การคัดเลือกประชากรกลุ่มควบคุม จะทำการลงพื้นที่เพื่อเสาะหาและเชิญชวนประชาชนที่ไม่มีภาวะโรคนี้่วทางเดินปัสสาวะ ซึ่งมีอายุและเพศใกล้เคียงกับประชากรกลุ่มตัวอย่าง เพื่อเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ
3. การเก็บตัวอย่างทางชีวภาพ กระทำโดยฝ่ายเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี
4. การวิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ บันทึก วิเคราะห์และแปลผล ดำเนินการที่ ภาคชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยโรคนี้่วไตและโรคระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ

1. ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ครั้งเดียว เมื่ออาสาสมัครตอบรับที่จะเข้าร่วมโครงการ และลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นที่เรียบร้อยแล้ว อาสาสมัครจะได้รับอุปกรณ์การเก็บปัสสาวะประกอบด้วยกระบอกเพื่อเก็บปัสสาวะ และขวดพลาสติกเพื่อตวงปริมาตรปัสสาวะซึ่งมียาปฏิชีวนะเคลือบอยู่ การเก็บปัสสาวะกระทำที่บ้านของผู้เข้าร่วมโครงการ โดยทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงโดยไม่ต้องแช่ตู้เย็นหรือน้ำแข็ง (แนะนำเริ่มเก็บตั้งแต่ 8.00 น. ของวันแรกไปจนถึง 8.00 น. ของวันที่สอง) จากนั้นให้วัดปริมาตรทั้งหมด ผสมปัสสาวะเข้าด้วยกันและเก็บตัวอย่างปัสสาวะประมาณ 500 มิลลิลิตร เพื่อนำส่งคณะผู้วิจัยและทีมแพทย์พยาบาลในวันถัดไป ปัสสาวะจะได้รับการปั่นเพื่อแยกเซลล์และน้ำปัสสาวะออกจากกัน จากนั้นคณะผู้วิจัยจะนำปัสสาวะเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

รูปภาพแสดงช่วงเวลาในการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงอย่างง่าย



2. ตัวอย่างเลือด ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 10 มิลลิลิตร* เพียงหนึ่งครั้ง โดยกระทำในวันที่อาสาสมัครได้พบกับทีมแพทย์-พยาบาล (วันแรก หรือวันที่สองที่นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงมาส่ง) เลือดจะถูกเก็บใส่หลอดแก้วเคลือบเฮปาริน แช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อนำไปปั่นแยกพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดออกจากกันให้เร็วที่สุด จากนั้นตัวอย่างพลาสมาและเซลล์จะถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

*การเสียเลือดปริมาณเลือด 10 มิลลิลิตร ไม่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการเสียเลือดในเด็กอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักตัวมาตรฐาน 20 กิโลกรัมแล้ว เด็กวัยนี้มีปริมาตรเลือดทั้งหมดมากกว่า 3 ลิตร ปริมาณเลือด 10 มิลลิลิตรจึงคิดเป็นเพียง 0.3% ของปริมาตรเลือดทั้งหมด

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างเลือด ใช้ในการตรวจวินิจฉัยระดับ Creatinine, total protein, protein carbonyl, calcium, uric acid

ตัวอย่างปัสสาวะ ใช้ในการตรวจวินิจฉัย Urinalysis, creatinine, calcium, phosphate, citrate, oxalate, sulfate, uric acid, chloride, urea, magnesium, and other metals

แบบสอบถาม

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสืบค้นภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ จึงจำเป็นที่จะต้องทำการสอบถามเกี่ยวข้องกับปัจจัยเสี่ยงทั้งปัจจัยภายใน (ประวัติครอบครัว ประวัติทางการแพทย์) และปัจจัยภายนอก (รูปแบบการดำเนินชีวิต อาหารที่รับประทาน และสุขนิสัย) คณะผู้วิจัยเลือกใช้แบบสอบถามเป็นเครื่องมือในการประเมิน และการตอบแบบสอบถามเป็นแบบสัมภาษณ์โดยตรง (direct interview) ทำการสอบถามผู้ป่วยก่อนได้รับการรักษา แบบสอบถามนี้มีขึ้นเพื่อสืบค้นภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ กลุ่มอาการเมแทบอลิก และโรคหัวใจและหลอดเลือด แยกย่อยได้เป็น ส่วนแรก เป็นประวัติทั่วไปและประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมโครงการ ส่วนถัดมาเป็นประวัติความเจ็บป่วยของบุคคลในครอบครัว และส่วนสุดท้ายเป็นส่วนที่ให้เจ้าหน้าที่กรอกผลทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น

แผนการดำเนินงานวิจัย

เดือนที่ 1-6: วางแผนการทำงาน ประสานงานกับทีมแพทย์และพยาบาลโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ และเริ่มเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยและทายาท (กลุ่ม 1A และ 2A)

เดือนที่ 7-12: วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น เก็บตัวอย่างจากกลุ่มประชากรปกติ (กลุ่ม 2A และ 2B) เริ่มดำเนินการวิเคราะห์ common metabolic disorders (ความเป็นกรดต่าง โซเดียม โพแทสเซียม ซีเทรต แคลเซียม ฟอสเฟต)

เดือนที่ 13-18: วิเคราะห์ common metabolic disorders และ urinary glycosaminoglycans (total sulfated GAGs, hyaluronic acid) จนครบ วิเคราะห์ข้อมูลและวิเคราะห์ทางสถิติ

เดือนที่ 19-24: เขียนรายงานผลการวิจัยและรายงานความคืบหน้าครั้งสุดท้าย เตรียมและเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ

Activity	เดือนที่																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
ขั้นตอนเตรียมงาน	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue
รับอาสาสมัครกลุ่มตัวอย่าง		Light Blue	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue
รับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue	Dark Blue	Dark Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue
วิเคราะห์ Common metabolic disorders		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue	Orange	Orange	Orange	Orange		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue
วิเคราะห์ Urinary macromolecules		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue
สรุปข้อมูลและวิเคราะห์ทางสถิติ		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange		Light Blue		Light Blue		Light Blue
เขียนรายงานผลการวิจัย		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue		Light Blue	
ส่งความคืบหน้าครั้งสุดท้าย		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue	Orange	Orange	Orange	
เขียนและตีพิมพ์งานวิจัยสู่สาธารณชน		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue		Light Blue	Dark Blue	Dark Blue

ผลการวิจัย

พบว่า กลุ่มผู้ป่วย (1A) และคนปกติ (2A) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในด้านอายุ เพศ ดัชนีมวลกาย (Body mass index: BMI) อัตราการสูบบุหรี่และการดื่มสุรา เช่นเดียวกับที่กลุ่มบุตรผู้ป่วย (A2) และบุตรคนปกติ (B2) แต่พบว่า กลุ่มผู้ป่วย มีโรคประจำตัวไม่ติดต่อกันมากกว่ากลุ่มคนปกติ โรคที่พบบ่อย ได้แก่ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และไขมันในเลือดสูง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

	KSD patients (1A)	KSD descendants (1B)	Adult volunteers (2A)	Volunteer descendants (2B)
<i>n</i>	28	45	41	32
Gender (%male)	64.3%	46.7%	46.3%	43.8%
Age (years)	45.6±8.7	19.1±7.9	44.1±9.5	20.2±7.6
BMI (kg/m ²)	24.0±3.6	N/A	24.5±3.6	N/A
Smoking (%)	28.6%	18.0%	27.3%	11.9%
Alcohol drinking (%)	35.7%	14.0%	21.8%	11.9%
Underlying disease (person)				
Diabetes mellitus	6	1	4	0
Hypertension	7	0	6	0
Dyslipidemia	3	0	1	0
Chronic liver disease	1	1	0	0
Chronic renal disease (GFR>60 ml/min/1.73 sq.m)	2	0	1	0
Cardiovascular disease	2	0	0	2

ผู้เข้าร่วมโครงการทุกคนได้รับการตรวจปัสสาวะเพื่อคัดกรองโรคนี้ที่ไม่แสดงอาการโดยใช้ urine strip ซึ่งหากผู้เข้าร่วมโครงการคนใดนอกจากในกลุ่มผู้ป่วย (1A) หากพบปัสสาวะมีเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ 1+ ขึ้นไปจะถูกคัดออกจากการทดลอง พบว่า ผู้เข้าร่วมโครงการในกลุ่ม 2A มีจำนวน 5 คนที่มีน้ำตาลปนออกมากับปัสสาวะ นอกจากนั้นปัสสาวะเป็ปกติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลตรวจปัสสาวะโดยใช้ urine strip

	KSD patients (1A)	KSD descendants (1B)	Adult volunteers (2A)	Volunteer descendants (2B)
Urine strip test (persons)				
Blood \geq 1+	4	0	0	0
Protein \geq 1+	5	0	0	0
Glucose \geq 1+	7	0	5	0
Ketone \geq 1+	0	0	0	0

พบตรวจปัสสาวะเพื่อหาสารก่อเนื้องอกและแร่ธาตุต่างๆ ในปัสสาวะ (ตารางที่ 3) โดยแบ่งออกเป็น

ความความเป็นกรดต่างในปัสสาวะ พบว่าปัสสาวะของครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้ 1A และ 1B มีค่า pH สูงกว่ากลุ่มคนปกติ 2A และ 2B อย่างมีนัยสำคัญ

สารก่อเนื้องอก ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลท ฟอสเฟต และกรดยูริก

- **แคลเซียม** พบว่ากลุ่ม 1A และ 2A ซึ่งมีอายุมากกว่า มีระดับแคลเซียมสูงกว่ากลุ่ม 1B และ 2B อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้กลุ่ม 1B ยังมีแคลเซียมสูงกว่า 2B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- **ออกซาเลท** พบว่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วย วย(1A) เท่านั้น
- **ฟอสเฟต** พบว่ากลุ่ม 1A และ 2A ซึ่งมีอายุมากกว่า มีการขับฟอสเฟตมากกว่ากลุ่ม 1B และ 2B ตามลำดับ นอกจากนี้ ในครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้ 1A และ 1B มีการขับฟอสเฟตมากกว่ากลุ่มคนปกติ 2A และ 2B ตามลำดับ โดยที่กลุ่ม 1A มีการขับฟอสเฟตมากที่สุด
- **กรดยูริก** พบว่าทุกกลุ่มมีการขับยูริกเท่าๆ กัน ยกเว้น กลุ่ม 1B ที่มีการขับกรดยูริกต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

สารยับยั้งเนื้องอก ได้แก่ ซีเทรต แมกนีเซียม และโพแทสเซียม

- **ซีเทรต** พบว่ากลุ่ม 1A และ 2A ซึ่งมีอายุมากกว่า มีการขับซีเทรตน้อยกว่ากลุ่ม 1B และ 2B ตามลำดับ นอกจากนี้ ในครอบครัวผู้ป่วย วย1A และ 1B มีการขับซีเทรตน้อยกว่ากลุ่มคนปกติ 2A และ 2B ตามลำดับ โดยที่กลุ่ม 1A มีการขับซีเทรตต่ำที่สุด
- **แมกนีเซียม** ไม่มีความแตกต่างของการขับแมกนีเซียมทางปัสสาวะในแต่ละกลุ่ม
- **โพแทสเซียม** กลุ่ม 1B มีการขับโพแทสเซียมต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

อื่นๆ ได้แก่ โซเดียมและคลอไรด์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจค่าความเป็นกรดต่างและแร่ธาตุต่างๆ ในปัสสาวะ

	KSD patients (1A)	KSD descendants (1B)	Adult volunteers (2A)	Volunteer descendants (2B)
Urine pH	6.60±0.90	6.78±0.90	6.06±0.79 ^a	6.46±0.93 ^d
Calcium (mEq/day)	5.83±0.90	3.01±0.31 ^c	4.29±0.49	1.11±0.14 ^{b,d}
Oxalate (mg/day)	43.70±4.83	14.70±2.59 ^c	11.91±1.90 ^a	14.09±2.14
Citrate (mg/day)	66.15±9.47	113.62±11.33 ^c	161.19±18.54 ^a	201.18±28.13 ^b
Magnesium (mEq/day)	4.17±0.70	4.43±0.41	4.94±0.33	4.65±0.36
Potassium (mEq/day)	25.33±2.32	19.89±1.28 ^c	26.93±1.69	26.04±2.01 ^b
Sodium (mEq/day)	100.36±11.62	98.00±7.17	96.74±7.74	86.60±6.49
Chloride (mg/day)	115.62±12.28	93.65±7.34	92.84±6.24	90.21±8.24
Phosphate (mg/day)	326.71±29.04	240.05±18.18 ^c	191.92±16.88 ^a	132.52±15.66 ^{b,d}
Uric acid (mg/day)	377.14±33.0	235.97±19.31 ^c	371.25±22.77	325.79±26.70 ^d

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1A และ 2A; ^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1B และ 2B; ^c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1A และ 1B; ^d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 2A และ 2B

เมื่อนำระดับสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนี้ของตัวอย่างแต่ละกลุ่มมาคำนวณค่าความอิ่มตัวของไตในปัสสาวะ พบว่ากลุ่มผู้ป่วย (1A) มีค่าความอิ่มตัวของไตสูงสุด ในขณะที่บุตรของผู้ป่วย (1B) มีค่าความอิ่มตัวของไตสูงกว่ากลุ่มคนปกติ (2B) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่าความอิ่มตัวของไตที่คำนวณโดย Ogawa index

Urine supersaturation (x10 ⁻⁶)	KSD patients (1A)	KSD descendants (1B)	Adult volunteers (2A)	Volunteer descendants (2B)
Average + SEM	53.45±1.72	19.77±0.54 ^c	17.47±0.48 ^a	6.24±0.01 ^{b,d}

Ogawa index = $6.838 \times 10^{-5} \cdot [\text{Ca}]^{0.78} [\text{Mg}]^{-0.30} [\text{Ox}]^{0.91} [\text{Cit}]^{-0.17}$; ^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1A และ 2A; ^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1B และ 2B; ^c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1A และ 1B; ^d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 2A และ 2B

การตรวจปัสสาวะเพื่อวัดสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ โปรตีน อัลบูมิน และไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ชนิดที่มีซัลเฟต (GAGs) (ตารางที่ 5) พบว่า

- โปรตีนในปัสสาวะ กลุ่มผู้ป่วย มีระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงที่สุด ในขณะที่กลุ่ม 1B มีโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่า 2B

- อัลบูมินในปัสสาวะ กลุ่มผู้ป่วย มีระดับอัลบูมินในปัสสาวะสูงที่สุด ในขณะที่กลุ่ม 1B มีอัลบูมินในปัสสาวะสูงกว่า 2B
- GAGs กลุ่มผู้ป่วยมีระดับ GAGs ในปัสสาวะต่ำที่สุด ในขณะที่กลุ่ม 1B มี GAGs ในปัสสาวะต่ำกว่า 2B

ตารางที่ 5 แสดงระดับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ในปัสสาวะ

	KSD patients (1A)	KSD descendants (1B)	Adult volunteers (2A)	Volunteer descendants (2B)
Urinary protein (mg/day)	336.6±61.9	67.0±7.0 ^c	31.1±5.6 ^a	26.6±3.7
Microalbuminuria (mg/day)	223.2±73.0	6.3±2.1 ^c	7.7±2.0 ^a	0.4±0.2
GAGs (mg/day)	6.27±1.11	24.55±1.55 ^c	44.82±6.27 ^a	46.84±4.37 ^{b,d}

^a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1A และ 2A; ^b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1B และ 2B; ^c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 1A และ 1B; ^d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม 2A และ 2B

การศึกษาความเครียดทางออกซิเดชัน (oxidative stress) ในปัสสาวะ โดยศึกษาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันโปรตีน (protein carbonyl) และความสามารถต่อต้านออกซิเดชันทั้งหมดในปัสสาวะ (urinary total anti-oxidant status) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงตัวบ่งชี้ความเครียดทางออกซิเดชัน

Oxidative stress	KSD patients (1A)	KSD descendants (1B)	Adult volunteers (2A)	Volunteer descendants (2B)
Protein Carbonyl (mg/g protein)	59.3±8.6	39.2±5.2	57.4±8.1	39.8±5.6
Urinary TAS (g/g creatinine)	0.66±0.05	0.66±0.05	0.66±0.04	0.80±0.07

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาพบว่า บุตรของผู้ป่วย แม้จะยังไม่มีการดำเนินโรคของโรคนี้ หรือการเกิดก้อนเนื้อ แต่กลับมีความผิดปกติในปัสสาวะคล้ายคลึงกับบิดา-มารดาที่ป่วยเป็นนี้ ได้แก่ ภาวะแคลเซียมและฟอสเฟตสูง ซีเทรตต่ำ เป็นผลทำให้ปัสสาวะมีค่าความอึดตัวยังยวดสูง เสี่ยงต่อการเกิดตะกอนนี้มากกว่าคนปกติที่มีอายุและเพศไม่แตกต่างกัน การศึกษานี้เป็นหลักฐานที่บ่งชี้ถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ของสมาชิกในครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้เป็นอย่างดี และชี้ให้เห็นถึงความสำคัญในการให้การป้องกันการเกิดโรคนี้ในสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยแต่เนิ่นๆ

นอกจากนี้ ยังพบความผิดปกติของสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ คือ มีโปรตีนและอัลบูมินรั่วทางปัสสาวะมากกว่าคนปกติเช่นกัน ซึ่งความผิดปกติที่มีโปรตีนและอัลบูมินรั่วทางปัสสาวะ เดิมเชื่อว่าเป็นผลจากการที่เนื้อก่อให้เกิดความบาดเจ็บและการตายของเซลล์บุหลอดไต แต่ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ในบุตรของผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ยังไม่มีการพัฒนาของก้อนเนื้อ กลับมีความผิดปกติของโปรตีนในปัสสาวะแล้ว ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่รั่วออกมาทางปัสสาวะเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับสาเหตุของการเกิดก้อนเนื้อ มิใช่เป็นผลจากก้อนเนื้อแต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งความผิดปกติที่ทำให้โปรตีนและอัลบูมินรั่วออกมาทางปัสสาวะนี้ อาจเป็นผลมาจากความผิดปกติที่ไกลเมอรูลัสทำให้โปรตีนเหล่านี้รั่วออกมาจากพลาสมาเพิ่มขึ้น หรือที่เซลล์บุหลอดไตทำให้ไม่สามารถดูดกลับโปรตีนที่ออกมาในปัสสาวะ การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะ และการศึกษาการทำงานของไกลเมอรูลัสและเซลล์บุหลอดไตจึงเป็นกุญแจที่จะช่วยทำให้เราเข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคนี้ในครอบครัวผู้ป่วย และสามารถหาทางรักษาตั้งแต่ยังไม่เกิดโรค ซึ่งจะลดความทุกข์ทรมานและการเกิดโรคไตวายเรื้อรังในประชาชนไทย โดยเฉพาะผู้ที่อาศัยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือได้

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษานำร่อง เพื่อศึกษาชนิดของโปรตีน (proteomic study) ที่รั่วในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วย (1B) เปรียบเทียบกับโปรตีนในคนปกติ (2B) และพบว่าโปรตีนอย่างน้อยสี่ชนิดที่เพิ่มสูงขึ้นใน 1B ได้แก่โปรตีน Tamm-horsfall ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจากเซลล์บุหลอดไตและเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดที่สุดในปัสสาวะ ในภาวะปกติโปรตีน Tamm-horsfall จะทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดโรคนี้ จึงเป็นเรื่องน่าแปลกใจที่บุตรของผู้ป่วยโรคนี้ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้สูงกลับมีโปรตีนนี้เพิ่มมากขึ้นในปัสสาวะ ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าอาจเป็นเพราะมีความผิดปกติของการสร้างโปรตีน Tamm-horsfall ในครอบครัวผู้ป่วย ทำให้โปรตีนนี้เกิดความผิดปกติในโครงสร้างและการทำงาน จึงเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้แทนที่จะยับยั้งการเกิดโรคนี้

โปรตีนอีกสามชนิดที่เพิ่มขึ้นในปัสสาวะ ได้แก่ อัลบูมิน และไกลบูลินสายสั้นชนิดแคปπαและแลมดา (kappa and lambda light chain globulins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในพลาสมา การพบพลาสมาโปรตีนรั่วมาทางปัสสาวะมากนั้นย่ำถึงความผิดปกติของการทำงานของไกลเมอรูลัส หรือเซลล์บุหลอดไต หรือทั้งสองตำแหน่งร่วมกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลที่จากการศึกษานำร่องยังไม่เพียงพอที่จะตั้งสมมุติฐานได้อย่างถูกต้อง ผู้วิจัยจึงวางแผนที่จะศึกษาโปรตีนทุกชนิดในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนและเป็นแนวทางของการศึกษาต่อไป

กล่าวโดยสรุป บุตรของผู้ป่วยโรคนี้มีความผิดปกติของสารก่อโรคและสารยับยั้งโรคในปัสสาวะ ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้มากกว่าคนปกติ ซึ่งความผิดปกตินี้อาจเป็นผลมาจากความผิดปกติทางพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อม

แพทย์ควรให้ความสำคัญและให้ความรู้เกี่ยวกับการป้องกันและการดูแลตัวเองแก่บุคคลเหล่านี้เพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้
ในอนาคต

ภาคผนวก

งานวิจัยที่ได้จากโครงการนี้ ได้ถูกนำไปเขียนเป็นบทความเพื่อตีพิมพ์ลงในวารสาร Asian Biomedicine ซึ่ง
เป็นวารสารระดับนานาชาติ มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล SCOPUS

นอกจากนี้ยังได้รับการเผยแพร่ในรูปแบบของ

- Proceeding และการนำเสนอโปสเตอร์ ในการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 39, STT39 (2013) ระหว่างวันที่ 21-23 ตุลาคม 2556 ที่ศูนย์ประชุมไบเทค กรุงเทพมหานคร โดย นายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ นิสิตระดับมหาบัณฑิต
- Proceeding และการนำเสนอโปสเตอร์ ในการประชุม The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014 ระหว่างวันที่ 2-3 เมษายน 2557 ที่โรงแรมรามารการ์เดน กรุงเทพมหานคร โดย นางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล
- Abstract และการนำเสนอโดยการอภิปราย ในการประชุม Asian Pacific Congress of Nephrology ระหว่างวันที่ 14-17 พฤษภาคม 2557 ที่เมือง Shinagawa ประเทศญี่ปุ่น โดย ดร.นพ.ฐิติณัฐ ดิษยบุตร

Type of manuscript: Original article

Title: Proteinuria and microalbuminuria in urolithiasis family

Authors and Affiliations:

Thasinas Dissayabutra*, Jakkapan Rattanapan*, Nuttiya Kalpongkul, Supawadi Mingmongkol,
Piyaratana Tosukhowong

*equally distributed

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

Corresponding author:

Dr.Thasinas Dissayabutra MD.Ph.D.

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Rd., Bangkok
10330 Thailand

Tel: +66-2-2564482

Fax: +66-2-2564482

E-mail: thasinasdr@gmail.com

Abstract:

Background: Urolithiasis is a common urologic disease in elderly worldwide. Evidences showed that the family members of urolithiasis had high risk for stone formation. We aimed to measure urinary protein and microalbumin levels in urolithiasis first degree relatives compared with normal population, and preliminary identify the elevated urinary protein.

Materials and methods: Twenty-eight post-stone removed urolithiasis patients (G1) and their non-stone-forming children (G2), 30 non-stone formers (G3) and their children (G4) who lived in the same region were recruited. Medical history and 24-hours urine were collected. total urine proteins and microalbuminuria were measured, then, urinary protein were analyzed by 2D SDS gel electrophoresis and spectrophotometry.

Results: Age, gender, BMI, smoking, alcoholic drinking were not different between G1 vs G3, and G2 vs G4. G1 had more prevalent underlying diseases than other groups. Urine protein and albumin were highest in G1 participants, and were higher in G2 compared with G4. Preliminary proteomic study of sampling urine protein showed elevated Tamm-horsfall protein, albumin, kappa and lambda-2 light chain immunoglobulins.

Conclusion: Urolithiasis first degree relatives had elevated urinary protein and albumin similar to their parent who had urolithiasis disease, even though the levels were lowered. These proteins might indicated stone risk factors and/or proximal tubular diseases. Further study of complete proteomes and functions will be needed.

Keywords: Urolithiasis, family, proteinuria, albumin, Tamm-horsfall protein

Introduction

Urolithiasis is a common urologic problem worldwide, with the lifetime prevalence are between 7.14% and 11.10% (1-3). In Thailand, the prevalence of urolithiasis is up to 16.7% in northeast region (4). Urinary stone initiates when the solute concentration in urine is exceeding the saturation point, called supersaturation state. In this state, the lithogenic ionic sulutes, such as calcium, oxalate, phosphate or uric acid spontaneously form the complex, and then insoluble complexes become crystals in luminal part of nephrons. Tubular endothelial cells uptake these crystal and accumulate in the interstitium, causing inflammation, bleeding and increase oxidative stress. Urolithiasis patients come to visit the doctor with flank pain, hematuria, and frequently chronic renal failure.

Although the pathophysiology of stone formation was well defined, the etiology was not yet clarified. It was well-recognized that the diabetes mellitus, hypertension, obesity and metabolic bone disease increase the risk of urinary stone formation, as well as a person who has urolithiasis patients in family. Until now, there is no evidence reported that any single gene disease causes urinary stone, and the environmental hazards are only the aggravating factors. However, urolithiasis patient's close relatives have higher chance to develop disease. Sritippayawan *et al*, reported that in Thai Northeasterners, urolithiasis relatives have 3.18 times higher risk for stone formation (5).

Calcium oxalate is the most common stone found in human, and the incidence is inclined throughout the world. The most important risk factor for urolithiasis in Western countries are hypercalciuria and hyperoxaluria (over-excretion of calcium and oxalate in urine) However, in Asian countries, such as Japan, Taiwan, Malaysia, and Thailand, hypocitraturia (inadequate citrate excretion in urine) remains the most prominent factor, which was up to 69.6% in Thai patients, while hypercalciuria and hyperoxaluria were found only 15.2% and 1.3% respectively (6). These abnormal characteristics were shared in the family members, as our previous study showed that the children of urolithiasis patients had higher urinary oxalate and lower urinary citrate compared with normal age- and gender-matched population. The validity of these risks in urolithiasis familial members verify the higher risk of

lithogenesis in urolithiasis relative, however, we were yet to investigate whether these abnormalities were derived from intrinsic or extrinsic causes.

Regarding to the highest osmolarity of urine occurs at the loop of Henle region of nephron, the supersaturation and crystal usually form here. It is believed that urolithiasis induces tubule-interstitial injury, and elevated urinary protein found among these patients should be leaked from tubular endothelial cells. Several proteins were listed to be up-regulated in calcium oxalate-exposed HK-2 cells model, including FK506-binding protein 4, pyruvate kinase isozymes and fascin (7). However, in human, significant proteinuria and microalbuminuria are co-morbidities frequently found in urolithiasis patients, which is unable to be explained by tubulo-interstitial damage, diabetes or hypertension alone.

In the present study, we aimed to study the level of proteinuria and microalbuminuria in urolithiasis patients, as well as their descendants, in order to validate these abnormalities in both high risk groups, and to use this information for further investigation on proteomes and pathophysiologic study.

Material and methods

One-hundred and sixteen participants in this study were enrolled from 4 groups. Group 1 (G1) comprised of 28 calcium oxalate urolithiasis patients who underwent surgical stone removal at the Sunpasit Prasong Center Hospital, Ubon Ratchathani Province, Thailand, with successfully removed as no visible stone larger than 0.4 cm. was seen in plain x-ray film after 1 month, while Group 2 (G2) was the descendants of urolithiasis patients (n = 28) who had no history or symptoms suggesting of urinary stone disease. Group 3 (G3) was non-stone-formers resided in the same region as Group 1, with age- and gender-matched, and Group 4 (G4) was non-stone-formers descendants. Group 2, 3 and 4 were screened for urinary stone disease by history and negative urine blood test. Medical history, and 24-hour urine were collected. 24-hour urine was measured for total volume, then tested by urine strip and preserved in deep freezer with thymol until further experiments.

Total urinary protein was measured by Bradford technique. In brief, 50 microlitre of urine was mixed with Coomassie Brilliant Blue G-250 dye in acidic solution (CCB reagent). The mixture was filtered and then incubated 5 minutes in room air before measure the absorbance at 595 A^o wavelength.

Microalbuminuria was measured by electrochemiluminescence technique by COBAS C6000® (Roche), with the limit of detection (LOD) of 0.001 mg/dl for microalbumin.

Proteomic study was done using 2D-SDS-PAGE electrophoresis and proteins were identified using LC-MS (LCMS-2020® from Shimadzu company) and then compared with the protein UniProtKB/Swiss-Prot – ExPASy Database by Mascot program.

The data were expressed as mean \pm SE. The differences of age, BMI, protein, and microalbuminuria were tested by one way ANOVA followed by LSD post-hoc, gender by chi-square. The differences of urinary protein and microalbuminuria between each family were tested by paired *t*-test. Statistical analysis was done by SPSS software version 16 (Chicago, USA), and significance was decided when $p < 0.05$.

The present study was approved by ethic committee of the Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine (AF02-008.) We declared no conflict of interest in any companies described in this manuscript.

Results

Demographic data

Twenty-eight calcium oxalate stone patients who successfully stone-removed and permitted their children to enroll into the research study, were recruited into the study as G1 group. Overall, male was predominant (64.3%) and the average age was 46.1 ± 9.7 years-old. Their children were female-predominated, with the average age of 19.6 ± 8.7 years-old. Age- and gender-matched non-stone formers were recruited from the residents who lived in the same area of G1 participants to minimize the diversity of climatic, cultural and dietary pattern (G3). Most of them were male (56.7%) and the average age was 45.6 ± 9.0 years-old, which were not different from G1 ($p = 0.564$ and $p = 0.825$, respectively.) Non-stone-former descendants were also recruited as G4 group, with female-predominated and the average age was 19.7 ± 7.3 years-old. The gender and age of G4 is not different from G2 ($p = 0.773$ and $p = 0.955$, respectively) (Table 1.)

Obesity is a risk factor for urolithiasis, the parental groups (G1 and G3) were calculated for their body mass index (BMI) which was not different (24.0 ± 3.6 vs 24.5 ± 3.6 kg/m², $p=0.567$). BMI was not calculated in descendant groups (G2 and G4) because some participants in these groups were in childhood and adolescent period, which normal range of BMI could not be applied. Approximately one-fourth of parental participants and one-sixth of descendant participants smoked. Half of G3 participants accepted for alcoholic drinking, while only one-third in G1, and one-sixth in descendant groups admitted.

Urolithiasis patients appeared to have higher rate of co-morbidities than G3 group. Hypertension and diabetes mellitus were the most common non-communicable diseases found in parental patients, followed by dyslipidemia, cardiovascular disease, chronic kidney disease stage I or II (estimated glomerular filtration rate or eGFR was greater than 60 ml/min/1.73 sq.m), while descendant groups reported a small number of diabetes, cardiovascular and chronic liver diseases.

Table 1 Demographic data of the participants.

	Urolithiasis patients (G1)	Urolithiasis descendants (G2)	Non-stone-formers (G3)	Non-stone-former descendants (G4)
<i>n</i>	28	28	30	30
Gender (%male)	64.3%	42.8% ^c	56.7%	46.7%
Age (years)	46.1±9.7	19.6±8.7 ^c	45.6±9.0	19.7±7.3 ^d
(range)	(32-69)	(10-45)	(28-62)	(7-33)
BMI (kg/m ²)	24.0±3.6	N/A	24.5±3.6	N/A
Smoking (%)	28.6%	17.9%	26.7%	13.3%
Alcoholic drinking (%)	35.7%	14.3%	46.7%	13.3%
Underlying disease (persons)				
Diabetes mellitus	6	1	4	0
Hypertension	7	0	6	0
Dyslipidemia	3	0	1	0
Cardiovascular disease	2	0	0	2
Chronic liver disease	1	1	0	0
Chronic renal disease	2	0	1	0
(GFR>60 ml/min/1.73 sq.m)				

^a $p < 0.05$ compared between G1 and G3 (parental groups); ^b $p < 0.05$ compared between G2 and G4 (descendant groups); ^c $p < 0.05$ compared between G1 and G2 (urolithiasis family groups); ^d $p < 0.05$ compared between G3 and G4 (non-stone-former family groups); N/A data not available.

Urine analysis

Urine tested by urine strip showed that G1 still have abnormal urine after stone was removed, Hematuria, proteinuria and glycosuria were frequently found in post-operative patients. On the other hand, glycosuria was found in 5 subjects, but no abnormality was found in descendant participants.

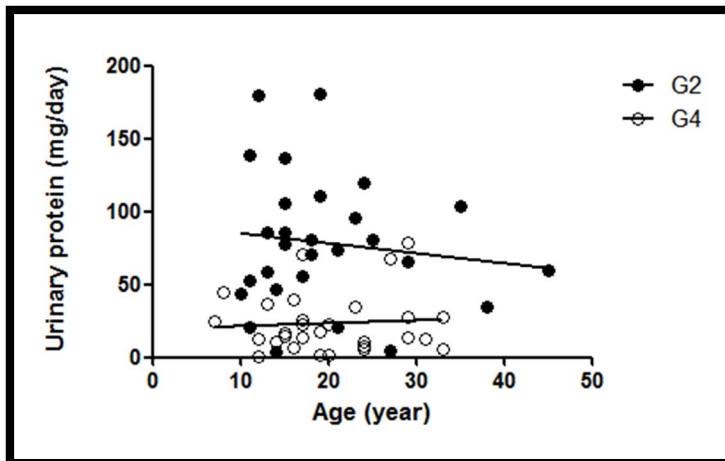
G1 had highest urinary protein level compared with other groups (436.6 ± 117.8 mg/day) as shown in Table 2. Non-stone-formers had significant lower urinary protein than G1 (34.8 ± 7.7 mg/day, $p < 0.001$.) Regarding to the descendant groups, G2 had elevated urinary protein compared with G4 (78.4 ± 8.6 vs 23.2 ± 3.7 mg/day, $p < 0.001$.) The level of urinary protein had no correlation with age, gender or underlying diseases in any group (Fig 1a).

Similar to the proteinuria, G1 had highest microalbuminuria level compared with other groups (223.2 ± 73.0 mg/day.) Elevated microalbuminuria was also detected in G2 compared with G4 (6.3 ± 2.1 vs 0.4 ± 0.2 mg/day, $p = 0.009$.) We found no correlation between age, gender or underlying disease with the level of microalbuminuria in this study (Fig 1b).

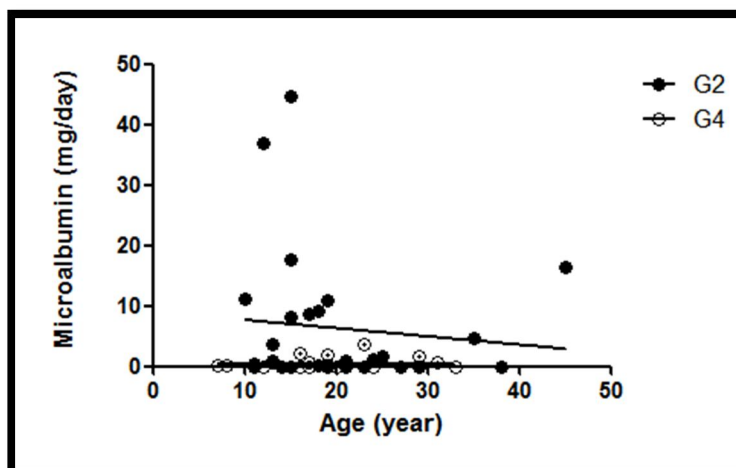
Table 2 Urinary sediment, protein and microalbumin level

	Urolithiasis patients (G1)	Urolithiasis descendants (G2)	Non-stone-formers (G3)	Non-stone-former descendants (G4)
Urine strip test (persons)				
Blood \geq 1+	4	0	0	0
Protein \geq 1+	5	0	0	0
Glucose \geq 1+	7	0	5	0
Ketone \geq 1+	0	0	0	0
Urinary protein (mg/day)	436.6 ± 117.8	78.4 ± 8.6^c	34.8 ± 7.7^a	23.2 ± 3.7
Microalbuminuria (mg/day)	223.2 ± 73.0	6.3 ± 2.1^c	7.7 ± 2.0^a	0.4 ± 0.2

^a $p < 0.05$ compared between G1 and G3 (parental groups); ^b $p < 0.05$ compared between G2 and G4 (descendant groups);
^c $p < 0.05$ compared between G1 and G2 (urolithiasis family groups); ^d $p < 0.05$ compared between G3 and G4 (non-stone-former family groups.)



(a)



(b)

Figure 1 showed the level of proteinuria (a) and microalbumin (b) in urolithiasis' descendants (G2) compared with non-stone-formers' descendants (G4). G2 had higher level of urinary protein and microalbumin than G4 ($p < 0.001$ and $p = 0.009$, respectively)

Preliminary proteomic study

According to the elevated proteinuria in G2 group, we performed the preliminary proteomic study in 24-hour urine. Ten of each G2 and G4 participants' 24-hour urine were randomly selected to perform

the 2D-SDS PAGE electrophoresis, then four bands of proteins in G2 urine that were elevated compared with G4 were chosen. Four proteins, including Tamm-horsfall protein, albumin, kappa and lambda-2 light chain immunoglobulin were identified (Fig 2).

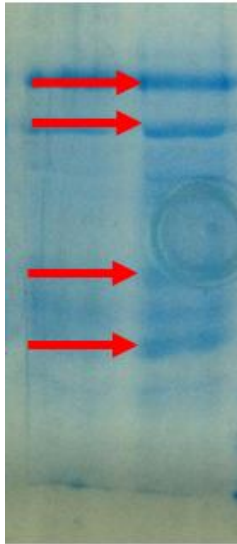


Figure 2 2D SDS PAGE showed four bands of proteins significantly increased in G2's 24-hour urine compared with G4, which were Tamm-horsfall protein, albumin, kappa and lambda-2 light chain immunoglobulin, respectively.

Discussion

The present study aimed to elucidate the elevated urinary protein and microalbumin levels in urolithiasis family members. According this, we tried to normalize all of the possible confounders, including both intrinsic and extrinsic factors. To avoid the confounders such as genetic backgrounds, cultural beliefs, occupation, climatic weather and dietary pattern that could not be completely matched, We decided to recruit healthy residents who lived in the same area with G1 as the G3 participants, and assumed that these confounding factors were not different between G1 and G3, as well as G2 and G4 participants. Metabolic syndrome, including diabetes mellitus, hypertension, hypertriglyceridemia and obesity, is strongly associated with urinary stone disease. In this study, urolithiasis patients trended to have higher prevalence of metabolic syndrome than age- and gender-matched population, although no statistical significance could be obtained due to the small number of participants. Excluding for the

underlying diseases, G1 shared the similar characteristics with G3 in gender, age, BMI, smoking and drinking.

Urine strip test was mainly used to screen the microscopic hematuria to exclude the asymptomatic urinary stone disease in non-stone-forming groups in the present study. Urinalysis results showed that no hematuria was detected in non-stone-forming groups. In parental participants, glycosuria was the most prevalent abnormal urinalysis observed, and most of them related to the diabetes mellitus. Approximately 14.3% of urolithiasis patients have persistent hematuria after stone removal operation, suggesting the non-recovery kidney injury or the retention of remnant non-visible small stones.

Proteinuria was a frequent complication of urolithiasis which related to the renal progression and prognosis (8, 9). However, some proteins were indicated to be the stone promoters, as they accommodated the crystal aggregation, stone-to-cell interaction or up-regulation of inflammatory response. These proteins should be elevated prior or during stone formation and were the important contributory factors in lithogenesis. Extensive studies of stone enhancing proteins were performed and several proteins including osteopontin, oxypurine, calgranulin, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) were listed (10-13). Likewise, a number of proteins were increased during or following stone formation, and considered to be the result of stone-induced inflammation, damage and apoptosis, as well as the consequences of stone removal procedure. These proteins are neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule 1 (KIM-1), N-acetyl glucosaminidase (NAG), tissue necrosis factor (TNF), IL-6, etc (14-17).

Albumin is the most abundant protein in plasma, which are filtered by glomeruli and then reabsorbed by proximal tubular epithelial cells (PTEC). Increased urinary albumin or albuminuria/microalbuminuria is observed in several nephrotic-type nephropathies, indicating glomerular dysfunction and could be used as a biomarker for glomerular diseases. However, in uncommon situation, albuminuria is not indicated glomerulopathies, but increased albumin leakage in urine is caused by abnormal reabsorption from PTEC disease, such as in Fanconi's syndrome. Considering that urolithiasis is a tubulo-interstitial disease, microalbuminuria observed in the patients might represent the tubular injury instead of glomerular failure. Our hypothesis was supported by Manoharan *et al*, who reported that the tubular reabsorption of protein was diminished in urolithiasis patients (18) and Gholamrez P who

reviewed that Tamm-horsfall protein was not significantly increased in the urine of stone formers, but albumin and transferrin were increased in the association of bacteriuria (19).

The proteomic study is a very useful tool to identify the crude function of proteins in any disease. Previously, a few proteomic studies were done in urolithiasis, Walton RC *et al*, reported that albumin, Tamm-Horsfall protein, osteopontin and prothrombin fragment 1 (PF1) were increased in calcium oxalate stone model (20). In addition, Kristin J *et al*, found that inter-trypsin inhibitor (ITI), PF1, CD59, and calgranulin B (calB) were elevated in urolithiasis patients compared with their non-stone forming first degree relatives (21). Recently, Shushang C *et al*, reported that at least 12 proteins, including M1 isoform of pyruvate kinase isozyme, FK506-binding protein 4, isoform 1 of cytosol aminopeptidase, fascin, L-lactate dehydrogenase B chain, were observed from proteomic study of calcium oxalate crystal formation performed in cell culture model (7). Proteomic study also assists to identify the stone-inhibiting proteins such as human urinary trefoil factor (TFF1), nephrocalcin, etc (22). However, the crucial limitation of protein study is that we could not identify that without the proper subject selection, the observed protein is the “cause/promoter” or the “effect/result”, especially in human study that collect the biological sample from urolithiasis patients who already formed the urinary stones and scars. The present study, which recruited the urolithiasis and non-stone-formers descendants who were yet to develop the stones, could provide the clear information of stone promoting proteins in the urolithiasis family.

Although our preliminary report showed that Tamm-horsfall protein, albumin, and light chain immunoglobulins were increased in urolithiasis descendants, but we gained only a limited usefulness on this information because those were common urine-rich proteins. However, our resulted were supported by the study of Merchant ML, who reported that Tamm-horsfall protein, albumin, α -globulin and γ -globulin were the abundant proteins in urine and the major composition of stone matrix (23). Tamm-horsfall protein or uromodulin is the most abundant glycoprotein in urine, synthesized and secreted by distal tubular epithelial cells, and usually acts as the stone inhibitor. Patients with recurrent urinary stone were usually associated with Tamm-horsfall protein deficiency. Therefore, many research found that Tamm-horsfall protein was a dominant stone matrix composition. Parsons CL, and Viswanathan P reported that Tamm-horsfall proteins might promote stone formation if its structure lacks of anionic

subunit of sialic acid (24, 25). Sialic acid appeared to be an important unit to modulate the urinary protein function in lithogenesis, as PF1 protein also needed the sialylation in order to function properly (26). In addition, Gudbjartsson DF, and Jaggi M, had proposed that abnormal Tamm-horsfall protein structure predisposed the calcium oxalate stone formation (27, 28). It was vital for further investigation of Tamm-horsfall structure in Thai urolithiasis patients to verify its function.

On the other hands, albumin and light chain immunoglobulins are plasma-rich proteins that can be filtered and reabsorbed in nephrons. We hypothesized that the elevation of these proteins in urolithiasis urine reflected the impairment of PTEC function. The present study was a solid evidence for further investigation of urinary proteomics and PTEC function in urolithiasis descendants, to verify the inherited stone-promoting factors and develop a novel stone prophylaxis protocol for urolithiasis familial members.

Conclusion

Urolithiasis first degree relatives had elevated urinary protein and microalbumin levels compared with normal population. Tamm-horsfall protein, albumin, kappa and lambda-2 light chain immunoglobulin were identified. These proteins might act as the stone-promoters or indicate the proximal tubular cell disease corresponding to the urolithiasis.

Acknowledgment

We would like to thank the members of Biochemistry and Metabolic Disease Research Unit, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Dr. Trairak Pisitkun and Dr. Puritchaya Sompan for their supports. We also thank all participants who join our study and let us make a novel knowledge.

This study was funded by The Thailand Research Fund (TRF) and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund as a part of “Urinary stone disease risks and protection in northeast Thai patients and their relatives” research.

References

1. Barker DJ, Morris JA, Margetts BM. Diet and renal stones in 72 areas in England and Wales. *British journal of urology*. 1988 Oct;62(4):315-8. PubMed PMID: 3191354.
2. Muslumanoglu AY, Binbay M, Yuruk E, Akman T, Tepeler A, Esen T, et al. Updated epidemiologic study of urolithiasis in Turkey. I: Changing characteristics of urolithiasis. *Urological research*. 2011 Aug;39(4):309-14. PubMed PMID: 21161646.
3. Seitz C, Fajkovic H. Epidemiological gender-specific aspects in urolithiasis. *World journal of urology*. 2013 Oct;31(5):1087-92. PubMed PMID: 23942884.
4. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 1997 Nov;4(6):537-40. PubMed PMID: 9477179.
5. Sritippayawan S, Borvornpadungkitti S, Paemanee A, Predanon C, Susaengrat W, Chuawattana D, et al. Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urological research*. 2009 Jun;37(3):141-6. PubMed PMID: 19387627.
6. Stitchantrakul W, Kochakarn W, Ruangraksa C, Domrongkitchaiporn S. Urinary risk factors for recurrent calcium stone formation in Thai stone formers. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet*. 2007 Apr;90(4):688-98. PubMed PMID: 17487123.
7. Chen S, Gao X, Sun Y, Xu C, Wang L, Zhou T. Analysis of HK-2 cells exposed to oxalate and calcium oxalate crystals: proteomic insights into the molecular mechanisms of renal injury and stone formation. *Urological research*. 2010 Feb;38(1):7-15. PubMed PMID: 19862510.
8. Mishra S, Sinha L, Ganesamoni R, Ganpule A, Sabnis RB, Desai M. Renal deterioration index: preoperative prognostic model for renal functional outcome after treatment of bilateral obstructive urolithiasis in patients with chronic kidney disease. *Journal of endourology / Endourological Society*. 2013 Nov;27(11):1405-10. PubMed PMID: 23537205.
9. Schwille PO, Schmiedl A, Manoharan M, Wipplinger J. Idiopathic Recurrent Calcium Urolithiasis (IRCU): pathophysiology evaluated in light of oxidative metabolism, without and with variation of several biomarkers in fasting urine and plasma--a comparison of stone-free and -bearing male patients, emphasizing mineral, acid-base, blood pressure and protein status. *European journal of medical research*. 2011 Aug 8;16(8):349-66. PubMed PMID: 21813378. Pubmed Central PMCID: 3351987.
10. Arrabal-Polo MA, Arrabal-Martin M, Giron-Prieto MS, Orgaz-Molina J, Quesada-Charneco M, Lopez-Ruiz A, et al. Association of severe calcium lithogenic activity and bone remodeling markers. *Urology*. 2013 Jul;82(1):16-21. PubMed PMID: 23601442.
11. Salama RH, Alghasham A, Mostafa MS, El-Moniem AE. Bone morphogenetic protein-2 will be a novel biochemical marker in urinary tract infections and stone formation. *Clinical biochemistry*. 2012 Jul;45(10-11):766-9. PubMed PMID: 22542719.

12. Tsuji H, Tohru U, Hirotsugu U, Masanori I, Yuji H, Takashi K. Urinary concentration of osteopontin and association with urinary supersaturation and crystal formation. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2007 Jul;14(7):630-4. PubMed PMID: 17645608.
13. Mushtaq S, Siddiqui AA, Naqvi ZA, Rattani A, Talati J, Palmberg C, et al. Identification of myeloperoxidase, alpha-defensin and calgranulin in calcium oxalate renal stones. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007 Sep;384(1-2):41-7. PubMed PMID: 17610860.
14. Zhu W, Liu M, Wang GC, Che JP, Xu YF, Peng B, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a biomarker for systemic inflammatory response syndrome in patients with nephrolithiasis. *The Journal of surgical research*. 2014 Mar;187(1):237-43. PubMed PMID: 24239146.
15. Fahmy N, Sener A, Sabbiseti V, Nott L, Lang RM, Welk BK, et al. Urinary expression of novel tissue markers of kidney injury after ureteroscopy, shockwave lithotripsy, and in normal healthy controls. *Journal of endourology / Endourological Society*. 2013 Dec;27(12):1455-62. PubMed PMID: 24180435. Pubmed Central PMCID: 3997088.
16. Horuz R, Goktas C, Cetinel CA, Akca O, Aydin H, Ekici ID, et al. Role of TNF-associated cytokines in renal tubular cell apoptosis induced by hyperoxaluria. *Urolithiasis*. 2013 Jun;41(3):197-203. PubMed PMID: 23595894.
17. Suen JL, Liu CC, Lin YS, Tsai YF, Juo SH, Chou YH. Urinary chemokines/cytokines are elevated in patients with urolithiasis. *Urological research*. 2010 Apr;38(2):81-7. PubMed PMID: 20204339.
18. Manoharan M, Schwille PO. Oxypurines, protein, glucose and the functional state of blood vasculature are markers of renal calcium stone-forming processes? Observations in men with idiopathic recurrent calcium urolithiasis. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2002 Mar;40(3):266-77. PubMed PMID: 12005217.
19. Pourmand G, Nasseh H, Sarrafnejad A, Mojtahedi A, Mehraei A, Alamdari DH, et al. Comparison of urinary proteins in calcium stone formers and healthy individuals: a case-control study. *Urologia internationalis*. 2006;76(2):163-8. PubMed PMID: 16493220.
20. Walton RC, Kavanagh JP, Heywood BR, Rao PN. The association of different urinary proteins with calcium oxalate hydromorphs. Evidence for non-specific interactions. *Biochimica et biophysica acta*. 2005 May 25;1723(1-3):175-83. PubMed PMID: 15863356.
21. Bergsland KJ, Kelly JK, Coe BJ, Coe FL. Urine protein markers distinguish stone-forming from non-stone-forming relatives of calcium stone formers. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006 Sep;291(3):F530-6. PubMed PMID: 16622176.
22. Thongboonkerd V. Proteomics and kidney stone disease. *Contributions to nephrology*. 2008;160:142-58. PubMed PMID: 18401167.
23. Merchant ML, Cummins TD, Wilkey DW, Salyer SA, Powell DW, Klein JB, et al. Proteomic analysis of renal calculi indicates an important role for inflammatory processes in calcium stone formation. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008 Oct;295(4):F1254-8. PubMed PMID: 18701630. Pubmed Central PMCID: 2576136.
24. Parsons CL, Rajasekaran M, Arsanjani AH, Chenoweth M, Stein P. Role of sialic acid in urinary cytoprotective activity of Tamm-Horsfall protein. *Urology*. 2007 Mar;69(3):577-81. PubMed PMID: 17382182.

25. Viswanathan P, Rimer JD, Kolbach AM, Ward MD, Kleinman JG, Wesson JA. Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein. *Urological research*. 2011 Aug;39(4):269-82. PubMed PMID: 21229239. Pubmed Central PMCID: 3117096.
26. Webber D, Radcliffe CM, Royle L, Tobiasen G, Merry AH, Rodgers AL, et al. Sialylation of urinary prothrombin fragment 1 is implicated as a contributory factor in the risk of calcium oxalate kidney stone formation. *The FEBS journal*. 2006 Jul;273(13):3024-37. PubMed PMID: 16817853.
27. Jaggi M, Nakagawa Y, Zipperle L, Hess B. Tamm-Horsfall protein in recurrent calcium kidney stone formers with positive family history: abnormalities in urinary excretion, molecular structure and function. *Urological research*. 2007 Apr;35(2):55-62. PubMed PMID: 17345077.
28. Gudbjartsson DF, Holm H, Indridason OS, Thorleifsson G, Edvardsson V, Sulem P, et al. Association of variants at UMOD with chronic kidney disease and kidney stones-role of age and comorbid diseases. *PLoS genetics*. 2010 Jul;6(7):e1001039. PubMed PMID: 20686651. Pubmed Central PMCID: 2912386.

Urinary supersaturation in urolithiasis patients and their familial members

Nuttiya Kalpongkul^a, Piyaratana Tosukhowong^a, Monpichar Srisa-art^b,
Jakkaphan Rattanaphan^a, Thasinas Dissayabutra^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 10330

^b Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 10330

* Corresponding Author: Thasinas.D@chula.ac.th



Urolithiasis or urinary stone disease is a common urologic disease in elderly worldwide. It is well-recognized that familial members of urolithiasis patients have higher risk than normal population for stone development. Urinary stone is formed when the level of anti-lithogenic factors (such as citrate and magnesium) decrease, and the lithogenic elements (such as calcium and oxalate) level increase, until the urinary solute concentration exceeds the saturation state, which is called supersaturation. At this state, calcium oxalate spontaneously precipitates and forms insoluble crystal. This study aimed to investigate the urinary risk factors in urolithiasis and their familial members.

Experimental

Participant recruitment

Twenty-eight of urolithiasis patients who were diagnosed and treated at the Urology Clinic, Sunpasit Prasong Hospital, Ubon Ratchathani province, Thailand were recruited into this study (G1 group). These patients were surgically stone-removal, and stone-free for at least a month; Forty of the age- and gender-matched normal population who resided in the same area with G1 were also recruited as a control (G2 group); Forty-six of urolithiasis descendants (G3 group), and thirty-four of control's descendants were enrolled as the control groups (G4 group). Participants in group G2, G3 and G4 were screened for urolithiasis by the history of urolithiasis symptoms in the past and the urinary blood using urine dipstick test, any participants with positive of either stone-compatible history or hematuria were excluded from the study. Characteristic data and medical profile were interviewed, and 24-hour urine was collected.

Biological specimen collection

Twenty-four hour urine was preserved by thymol addition, and then measured for total volume, pH, creatinine, calcium, oxalate, citrate, magnesium and sulfated GAGs.

Measurement of creatinine

Twenty-four-hour urine creatinine was measured by enzymatic method.

Measurement of urinary minerals

Urinary calcium and magnesium were measured by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) (Optimal 2100, Perkin Elmer, USA), according to the protocol described by PerkinElmer® and Analytical Sciences' user manual. Urinary oxalate and citrate were measured by reverse-polarity capillary zone electrophoresis (CZE) under an applied voltage of -15 kV and carried out at 25°C. Background electrolyte contains 40 mM borate buffer, 100 mM, phosphate buffer and 0.5 mM tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB), pH 3.0, UV-visible detection at a wavelength of 195 nm was performed. Potassium and sodium were measured by ion selective electrode (COBAS INTEGRA 400 plus.)

Urinary supersaturation calculation

Urinary ionic concentration and activity products of calcium oxalate were calculated by Ogawa index, $AP(\text{CaOx})\text{EQ}_2$, is defined as $AP(\text{CaOx})\text{EQ}_2 = 6.838 \times 10^{-5} \cdot [\text{Ca}]^{0.78} [\text{Mg}]^{-0.30} [\text{Ox}]^{0.91} [\text{Cit}]^{-0.17}$ where concentrations are expressed in mmol/L.

Result and discussion

Demographic data

Table 1. Demographic and physical urinary data of the participants

	G1	G2	G3	G4
n	28	40	46	34
Age (years-old)	45.6±8.7	44.1±9.5	19.1±7.9	20.2±7.6
Male gender (%)	64.3%	46.3%	46.7%	43.8%
Body mass index (Kg/m ²)	24.0±3.6	24.5±3.6	N/A	N/A
Urine volume (litre)	1.78±0.65	1.53±0.55	1.21±0.39	1.25±0.55
Urine pH	6.60±0.90	6.06±0.79 ^a	6.78±0.90	6.46±0.93 ^d
Calcium (mEq/day)	5.83±0.90	4.29±0.49	3.01±0.31 ^c	1.11±0.14 ^{b,d}
Oxalate (mg/day)	43.70±4.83	11.91±1.90 ^a	14.70±2.59 ^c	14.09±2.14
Citrate (mg/day)	66.15±9.47	161.19±18.54 ^a	113.62±11.33 ^c	201.18±28.13 ^b
Magnesium (mEq/day)	4.17±0.70	4.94±0.33	4.43±0.41	4.65±0.36

^a*p*<0.05 compared between G1 and G2 groups (urolithiasis vs control); ^b*p*<0.05 compared between G3 and G4 groups (urolithiasis descendants vs control descendants); ^c*p*<0.05 compared between G1 and G3 groups (urolithiasis and their descendants); ^d*p*<0.05 compared between G2 and G4 groups (controls and their descendants). N/A = not available.

Urinary supersaturation

The urinary supersaturation index calculated by Ogawa Index showed that G1 had significant higher supersaturation than G2 (0.00005352±0.0000959 vs 0.00001744±0.00000314, *p*=0.001), as well as G3 is higher than G4 (0.001977±0.00000250 vs 0.00000610±0.00000290, *p*=0.001). We also observed that the urinary saturation of the parents is higher than their descendants in the same family, as G1 is higher than G3 (*p*=0.002) and G2 than G4 (*p*=0.001), respectively. (Figure 1)

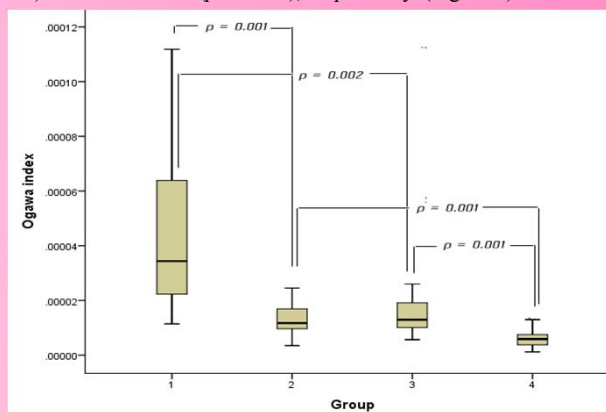


Figure 1: The Ogawa's urinary supersaturation index in each group.

Our results showed that the descendants of urolithiasis patients have higher urinary lithogenic abnormalities. These anomalies lead to the high urinary supersaturation in the urolithiasis descendants. Regarding this, we could be able to explain the reason why the urolithiasis familial members have higher risk for stone formation than in general population. In addition, our result showed that urolithiasis patients, even though they were stone-free at the time the 24-hour urine was collected, still have high calcium and oxalate excretion, low citrate excretion and high urinary supersaturation. These findings could be able to explain the reason why urolithiasis patients have high recurrent rate.

Although our result showed the abnormalities in urinary elements in urolithiasis descendants, but these subjects were yet to develop urinary stone. We believed that there are at least three explanations should be proposed; (1) the degree of urinary abnormalities is too low to initiate the stone formation, (2) urolithiasis patients have other stone promoting factors that are not listed here, such as chronic inflammation, oxidative stress and toxic substance in urine, and (3) the descendants have other stone protective factors which are not listed in Ogawa Index, such as glycosaminoglycans, glycoproteins, etc. However, we believe that these abnormalities become worsen in the later age, as the prevalence of urolithiasis is extremely high in elderly compared with young population. Because of this, we emphasize the necessity for urolithiasis patients and their family members to recognize the risks and prevent the deterioration of these anomalies.

Conclusion

Urolithiasis patients had higher lithogenic risks in urine than normal population, and their familial members, who were yet to develop stone, had higher urinary calcium and lower citrate excretion, as well as high urinary supersaturation. These population are at-risk for stone formation and need appropriate treatment for stone prevention.

Acknowledgement : This work was funded by The Thailand Research Fund (TRF) (and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund. We would like to thank all members in the Biochemistry and Molecular Biology of Metabolic Diseases Research Unit (BMD-RU), medical team at Sunpasit Prasong Hospital. Assist. Prof. Dr. Thavorn Supaprom and the technicians at Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University for their generous assistance.

Jakkaphan Rattanaphan¹, Piyaratana Tosukhwong¹, Chanchai Boonla¹,
Wattanachai Ungcharoenwattana², Monpichar Srisa-art³, Thasinas Dissayabutra^{1,*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 10330

²Department of Surgery, Sunpasit Prasong Hospital, Ubon Ratchathani, Thailand, 34000

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 10330

*Corresponding author : Thasinas.D@chula.ac.th

OBJECTIVES

Several researchers suggest that children have higher urinary stone-inhibiting factors, including citrate and magnesium, as well as higher urinary macromolecule and glycosaminoglycan levels than adults, hence lowering the risk for kidney stone formation. Due to the lack of distinctive evidences, this study aimed to verify the lithogenic risk factors in KSD descendants, who have been believed to be at risk for urolithiasis.

METHODOLOGY

Subjects

Seventy-four participants, including KSD patients (n=28) and their descendants (n=46) were enrolled for the study. KSD patients were stone-formers, aged between 30 and 70 years old who underwent stone-removal operation at Sunpasit Prasong Hospital, Ubon Ratchathani province, Thailand. They have no visible stone left after surgery (assessed by routine x-ray screening), had normal renal function (defined as estimated glomerular filtration rate ≥ 60 ml/min/1.73 sq.m), and did not receive any medication for treating kidney stones. Descendants were first-degree descendants of KSD patients, aged more than 7 years old and have been lived in the same area with their parents. Blood was drawn and plasma was separated, and then stored at -80°C . Twenty-four-hours urine was collected using thymol as an antiseptic agent. Total urine volume was measured and then stored at -20°C until analysis.

Laboratory measurements

Urinary calcium and magnesium were measured by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) (Optimal 2100, Perkin Elmer, USA), according to the protocol described by PerkinElmer® and Analytical Sciences user manual. Oxalate and citrate were determined by reverse-polarity capillary zone electrophoresis (CZE) under an applied voltage of -15 kV and carried out at 25°C . Background electrolyte contains 40 mM borate buffer, 100 mM, phosphate buffer and 0.5 mM tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB), pH 3.0, UV-visible detection at a wavelength of 195 nm was performed. Potassium and sodium were measured by ion selective electrode (COBAS INTEGRA 400 plus.)

For oxidative stress, we measured oxidative products, including plasma protein carbonyl measurement by DNPH colorimetric method, and urinary total antioxidant status (TAS) by ABTS method.

The difference in urinary potassium, oxalate, citrate and calcium were age-independent (Figure 1.)

We also found the greater urinary protein in KSD patients compared with their descendants (436.56 versus 65.97 mg/day, $p < 0.001$), suggested for higher level of nephron injury.

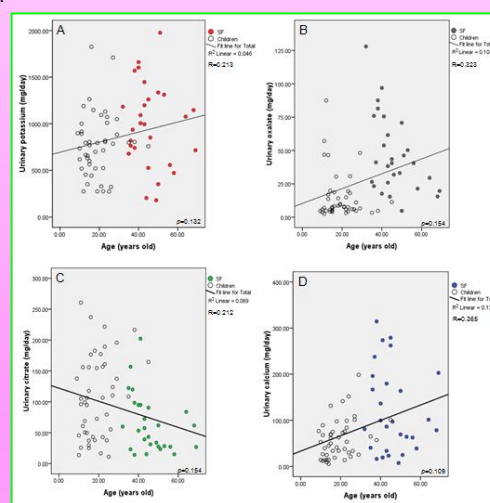


Figure 1. The distribution of age and urinary minerals. There was no correlation between age and urinary potassium (A) (Pearson's chi-square $p=0.132$), oxalate (B) ($p=0.154$), citrate (C) ($p=0.154$), or calcium (D) ($p=0.109$); SF: Stone-formers, Children: KSD descendants.

RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSION

Baseline characteristics, urinary mineral and oxidative stress levels in each group were shown in Table 1. No statistical difference in gender distribution between both groups. KSD patients had significantly higher levels of urinary calcium (119.87 versus 59.15 mg/day, $p < 0.001$) and oxalate (46.13 versus 14.70 mg/day, $p=0.023$), but lower urinary citrate (74.35 versus 112.08 mg/day, $p=0.043$) than their descendants. These evidences supported previous literatures that KSD patients trended to have hypercalciuria, hyperoxaluria and hypocitraturia. However, we observed higher urinary potassium level in KSD patients than their descendants (987.87 versus 771.05 mg/day, $p=0.019$), which was incomparable with previous reports. Magnesium and sodium were not significantly different between two groups.

Table 1. Baseline characteristics, urinary mineral and oxidative stress levels in stone-formers and their descendants.

Characteristics	KSD patients	Descendants	p value
Number of participants	28	46	
Age (years old)	46.11 \pm 1.85	19.17 \pm 1.15	N/A
Gender (%Male)	64.29%	45.65%	0.142
Urinary components			
Urine pH	6.60 \pm 0.17	6.79 \pm 0.13	0.259
Protein (mg/day)	436.56 \pm 117.88	65.97 \pm 6.93*	<0.001
Calcium (mg/day)	119.87 \pm 17.37	59.15 \pm 6.24*	<0.001
Oxalate (mg/day)	46.13 \pm 5.49	14.70 \pm 2.53*	0.023
Citrate (mg/day)	74.35 \pm 14.69	112.08 \pm 11.19	0.043
Magnesium (mg/day)	52.96 \pm 8.71	53.44 \pm 4.93	0.899
Potassium (mg/day)	987.87 \pm 84.93	771.05 \pm 50.33*	0.019
Sodium (mg/day)	2363.31 \pm 256.77	2135.78 \pm 169.10	0.729
Oxidative stress			
Plasma protein carbonyl (g/dL)	59.3 \pm 8.6	39.2 \pm 5.2	0.038
Urinary TAS (g/g creatinine)	0.66 \pm 0.05	0.66 \pm 0.05	0.988

Variables were showed in mean \pm SEM, N/A is for not available, * $p < 0.05$ comparing between KSD patients and Descendants groups.

In the present study, the prevalence of hypercalciuria (4.3% versus 10.7%, $p=0.073$) and hypocitraturia (89.1% versus 92.9%, $p=0.608$) in KSD descendants were comparable to their parents. Hypokaliuria were significantly higher (89.1% versus 60.7%, $p=0.011$), but hyperoxaluria prevalence was lower (10.9% versus 50.0%, $p < 0.001$) (Table 2).

Table 2. Prevalence of urinary lithogenic risk factors in each group.

	Cutoff	KSD patients	Descendants	p value	95%CI
Hypocitraturia (%)	<200 mg/day	92.9%	89.1%	0.608	-
Hypokaliuria (%)	<30 mEq/day	60.7%	89.1%	0.011	0.1-0.7
Hypercalciuria (%)	>200 mg/day	10.7%	4.3% ^S	0.073	0.8-74.3
Hyperoxaluria (%)	>40 mg/day	50.0%	10.9% ^S	<0.001	2.6-28.5

We implied that KSD descendants had hypocitraturia and hypercalciuria as the lithogenic risk factors similar to their predecessors, possibly due to genetic inheritance, diet, lifestyle or the environment that they shared. Base on the current data, we suggest that KSD descendants should increase daily intake of citrate-rich diet, and avoid hypercalciuria phenotype by adequate vitamin D intake and exercise are recommended.

KSD patients had higher plasma oxidative stress level, as we found the elevation of protein carbonyl (Table 1), in KSD patients, compared to their descendants (59.3 versus 39.2 g/dL, $p=0.38$). However, there was no difference in urinary oxidative stress, as urinary TAS between KSD patients and their descendants was not significantly different (0.66 versus 0.66 g/g-creatinine, $p=0.988$). We hypothesized that proteinuria in stone-free KSD patients might be the sequel or the process of healing. Long term follow up should be done to evaluate the persistent proteinuria and its complication.

In conclusion, KSD descendants had the existing hypocitraturia and hypercalciuria even though they are non-stone forming, suggested that they were at risk for stone. KSD familial members should avoid any lifestyle or drugs that worsening these anomalies. Further study to evaluate the lithogenic risk factors between KSD descendants and healthy children should be performed to elucidate the existence and importance of these abnormalities.

Acknowledgement : This work was funded by The Thailand Research Fund (TRF) and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund. We thanks all members in the Biochemistry and Molecular Biology of Metabolic Diseases Research Unit (BMD-RU), medical team at Sunpasit Prasong Hospital and technicians at Department of Biological science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University for their generous assistance.

T1 เพิ่ม วง ครับ

Thasinas, 25/9/2556