

สัญญาเลขที่ TRG5780302

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ไกลโคสะมิโนไกลแคนสีในปัสสาวะผู้ป่วยโรคนี้
ทางเดินปัสสาวะและบุตร และผลของการเสริมคอนดรอยติน
ซัลเฟตและกรดไฮยาลูโรนิกต่อการป้องกันการเกิดนี้
ทางเดินปัสสาวะในหนู

ผู้วิจัย ผศ.ดร.นพ.ฐิติณัฐ ดิษยบุตร
สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780302

ชื่อโครงการ: ไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ในปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ้วทางเดินปัสสาวะและบุตร และผลของการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตและกรดไฮยาลูโรนิกต่อการป้องกันการเกิดนิ้วทางเดินปัสสาวะในหนูที่มีออกซาเลทในปัสสาวะสูง

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.นพ.ฐสินัส ดิษยบุตร สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.ปิยะรัตน์ ไตรสุโขวงศ์ สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: thasinasdr@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

บทคัดย่อ: โรคนิ้วทางเดินปัสสาวะเป็นโรคที่พบบ่อยในคนไทย และพบว่าบุคคลในครอบครัวผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้สูงกว่าคนปกติ การศึกษาท่อนี้เกี่ยวกับ glycosaminoglycans (GAGs) ในปัสสาวะมีบทบาทในกระบวนการเกิดโรค และพบว่าผู้ป่วยมีระดับ GAGs ที่มีหมู่ซัลเฟต (sulfated GAGs) ในปัสสาวะต่ำ เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulfate: CS) และกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid: HA) ซึ่งเป็น GAGs ในทางการแพทย์เพิ่มขึ้น ผู้วิจัยมีความประสงค์จะศึกษาระดับ GAGs ในปัสสาวะของผู้ป่วยและบุตร รวมถึงศึกษาผลของการเสริม CS และ HA ต่อการเกิดโรคในหนูที่กระตุ้นให้เกิดโรค จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคนี้และบุตรมีระดับ sulfated GAGs และ CS ในปัสสาวะต่ำกว่าคนปกติ แต่สัดส่วน CS ต่อ sulfated GAGs ปกติ นอกจากนี้ยังพบพบสัดส่วนของเฮปารันซัลเฟต (heparan sulfate: HS) ต่อ sulfated เพิ่มขึ้น และผู้ป่วยโรคนี้มีระดับ HA ในปัสสาวะเพิ่มสูงกว่าคนปกติ นอกจากนี้ ยังพบว่า การเสริม CS ในหนูทดลองที่เกิดโรคจากภาวะออกซาเลทในปัสสาวะสูงจากการได้รับ ethylene glycol สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะที่การเสริม HA ไม่มีผลกระทบต่อโรคนี้โดยตรงแต่อาจขัดขวางผลการยับยั้งโรคของการเสริม CS จากผลการวิจัยนี้ สรุปได้ว่าภาวะ sulfated GAGs และ CS ต่ำในปัสสาวะ และการมีสัดส่วนของ HS ต่อ sulfated GAGs เพิ่มขึ้น อาจเป็นความเสี่ยงที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมในครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะ และการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตอาจช่วยยับยั้งการเกิดโรคนี้ทางเดินปัสสาวะในผู้ที่มีความเสี่ยงสูงได้

คำสำคัญ: โรคนี้, คอนดรอยตินซัลเฟต, กรดไฮยาลูโรนิก, ไกลโคสะมิโนไกลแคนส์, การป้องกันโรค

Project Code : TRG5780302

Project Title : Urinary glycosaminoglycans excretion in urolithiasis patients and their descendants & Effect of chondroitin sulfate and hyaluronic acid supplement in prevention of urolithiasis in hyperoxaluric rats.

Investigator : Dr.Thasinas Dissayabutra M.D. Ph.D. from Chulalongkorn University
Piyaratana Tosukhowong from Chulalongkorn University

E-mail Address : thasinasdr@gmail.com

Project Period : 3 ปี

Abstract: Urolithiasis is a common disease in Thai people, and family members of urolithiasis have high risk. Previous studies showed that glycosaminoglycans (GAGs) in urine have a role in stone formation, and urolithiasis patients have low urinary sulfated GAGs. Since chondroitin sulfate (CS) and hyaluronic acid (HA), two of GAGs, are commonly used as therapeutic drugs recently, we aimed to investigate urinary GAGs excretion rate in urolithiasis patients and their descendants, as well as the effect of CS and HA supplement on stone formation in hyperoxaluric urolithic rats. Our results showed that stone patients and descendants had lower urinary sulfated GAGs and CS excretion than control, but normal CS per sulfated GAGs ratio obtained. In addition, high urinary excretion rate of heparan sulfate (HS) per sulfated GAGs was found, whereas urolithiasis patients also had high HA excretion rate. We found that in hyperoxaluric urolithic rats induced by ethylene glycol, CS supplement could prevent stone formation. Although HA supplement had no direct effect on stone formation, but it may interfere the stone-inhibitory effect of CS. Our results suggested that CS supplement may benefit in stone prevention in high risk population.

Keywords: Urolithiasis, Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid, Glycosaminoglycans, Prevention

Executive summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ (Kidney stone disease: KSD) เป็นโรคที่พบบ่อยและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของไทย โดยเฉพาะในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีรายงานพบสูงถึง 17.6% ในวัยผู้ใหญ่ ก่อให้เกิดภาวะไตเสื่อมและไตวายเรื้อรัง และเป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของการผ่าตัดเอาไตออก (nephrectomy) นอกจากนี้แนวโน้มของการเกิดโรคนิ่วเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ด้วยผลจากการเปลี่ยนแปลงทางภูมิอากาศ การเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยกลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndrome) หรือการใช้ยาที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วเพิ่มขึ้น ทำให้โรคนิ่วทางเดินปัสสาวะกลายเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญมากขึ้น และการป้องกันผู้ที่มีความเสี่ยงมิให้เกิดโรคนิ่วตั้งแต่ต้นเพื่อไม่ให้เกิดโรคและภาวะแทรกซ้อนย่อมเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดในการดูแลผู้ป่วย

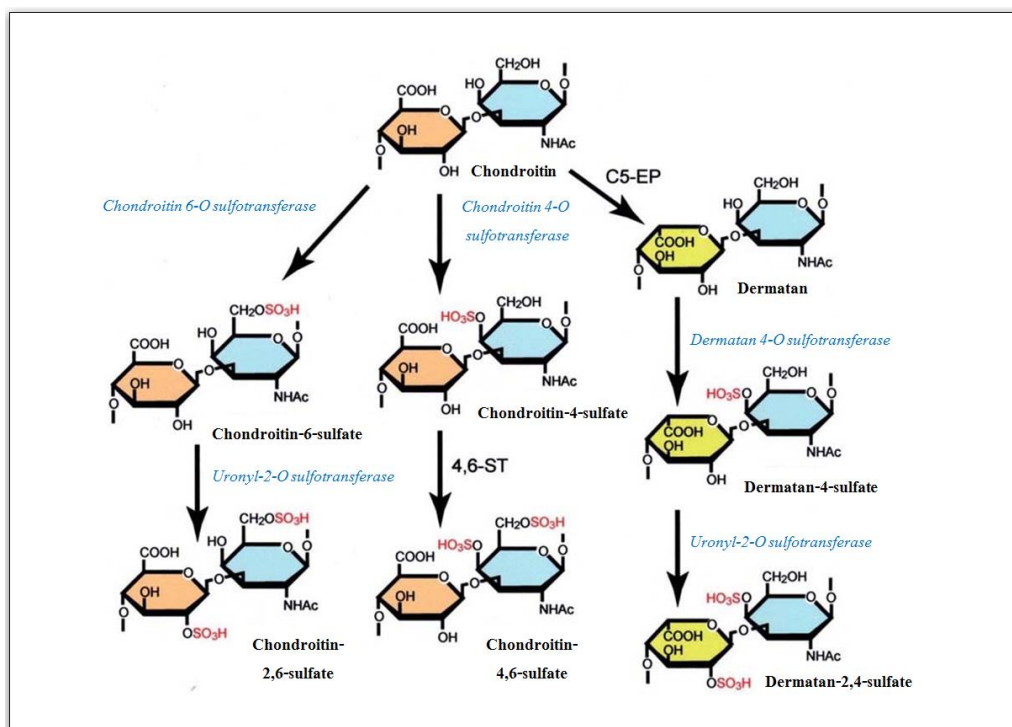
สาเหตุของโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ คือ สภาวะที่ปัสสาวะมีความอิ่มตัวยิ่งยวด (urinary supersaturation) ของสารก่อนิ่ว และการขาดสารยับยั้งการเกิดนิ่ว สารก่อนิ่วในปัสสาวะที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริก เป็นต้น สารเหล่านี้เมื่อมีความอิ่มตัวยิ่งยวดจะจับกันกลายเป็นผลึกที่ไม่ละลายน้ำและกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด ในขณะที่สารยับยั้งการเกิดนิ่ว อาทิเช่น ซิเตรต แมกนีเซียม โพแทสเซียม และ glycosaminoglycan ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการรวมตัวกันของสารก่อนิ่วให้กลายเป็นสารเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้ดีและถูกขับออกทางปัสสาวะ มีปริมาณน้อยในปัสสาวะ พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วในประเทศตะวันตกมักตรวจพบภาวะแคลเซียมและออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hypercalciuria and hyperoxaluria) เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ ในทางตรงกันข้าม ผู้ป่วยโรคนิ่วในประเทศไทยกลับตรวจพบภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) มากเป็นอันดับหนึ่ง แสดงให้เห็นว่าโรคหรือความผิดปกติที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วในคนไทยมีความแตกต่างกับชาวตะวันตก การให้การดูแลกลุ่มเสี่ยงจึงจำเป็นต้องมีความแตกต่างไปตามมูลเหตุของโรคที่พบในประชากรไทย ทว่า ในปัจจุบัน การศึกษาโรคที่เป็นสาเหตุของความผิดปกติที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วในคนไทยยังมีการศึกษาน้อยมาก มีหลักฐานเพียงเล็กน้อยที่ชี้ว่าความเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนืออาจเกิดจากโรค renal tubular acidosis หรือการไม่ยอมรับประทานผลไม้ที่มีซิเตรตเป็นส่วนประกอบมากเท่านั้น

จากการศึกษามากมาย แสดงให้เห็นว่า ญาติของผู้ป่วยโรคนิ่วเป็นกลุ่มเสี่ยงที่สำคัญมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง การศึกษาในไทยโดย อ.สุชัย พบว่าญาติของผู้ป่วยโรคนิ่วมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วเฉลี่ยเป็น 3.18 เท่าของคนปกติ นั่นเป็นหลักฐานที่คลุมเครือว่าโรคนิ่วในคนไทยอาจสัมพันธ์กับโรคหรือความผิดปกติทางพันธุกรรมบางประการ ผลการศึกษาของผู้วิจัยซึ่งได้รับทุนจาก สกว. แสดงให้เห็นว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วซึ่งยังไม่เกิดโรค มีความผิดปกติของปัสสาวะหลายประการคล้ายคลึงกับผู้ป่วย ได้แก่ ภาวะ hyperoxaluria, hypocitraturia, low glycosaminoglycan level และ high urinary protein level แม้ความผิดปกติเหล่านี้จะมีความรุนแรงน้อยกว่าบิดา-มารดาซึ่งเป็นผู้ป่วย แต่มีความแตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ผู้วิจัยสรุปได้ว่า ความผิดปกติเหล่านี้มีลักษณะการถ่ายทอดในครอบครัว และเมื่อผู้ที่มีความผิดปกติเหล่านี้อายุมากขึ้น ความผิดปกติจะรุนแรงขึ้นจนก่อให้เกิดเป็นโรคนิ่วในที่สุด ถึงกระนั้นก็ตามผลจากการวิจัยของผู้วิจัยไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่าความผิดปกติเหล่านี้

ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เนื่องจากบุตรของผู้ป่วยอาจพัฒนาความผิดปกติเหล่านี้จากการอยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน หรือมีแนวทางการดำเนินชีวิตและการเลือกรับประทานอาหารเช่นเดียวกับบิดา-มารดาได้

ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาของผู้วิจัยให้ความสำคัญกับการแก้ไขภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ เพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้กลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยโรคนี้ที่ได้รับการรักษาแล้ว และได้พัฒนายาที่มีพื้นฐานมาจากมะนาว เพื่อเสริมซีเทรตให้กับผู้ป่วย (อยู่ระหว่างการวิจัยทางคลินิกระยะที่ 3) เพื่อทดแทนยาโพแทสเซียมซีเทรตซึ่งเป็นยามาตรฐานแต่มีราคาแพงและมีภาวะแทรกซ้อนทางระบบทางเดินอาหารมาก ซึ่งจะช่วยแก้ไขปัญหา hypocitraturia ได้เป็นอย่างดี แต่ภาวะที่มีระดับ glycosaminoglycan ต่ำในปัสสาวะยังมีผู้ให้ความสนใจไม่มากนัก glycosaminoglycans หรือ GAGs เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่มีประจุลบจำนวนมากเป็นองค์ประกอบ พบได้ในหลายเนื้อเยื่อในร่างกาย เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน น้ำในข้อ เป็นต้น ที่ไต จะพบ GAG ชนิด heparan sulfate จำนวนมากที่ glomerular basement membrane ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเลือกผ่านประจุลบ (charge selection barrier) ป้องกันโปรตีนขนาดกลางรั่วออกมาทางปัสสาวะ และ chondroitin sulfate กับ hyaluronic acid ที่สร้างจากเซลล์บุผิวหลอดเลือดและหลั่งออกจากปัสสาวะ

chondroitin sulfate เป็น GAG ที่มีประจุลบเกิดจากหมู่ alcohol ของน้ำตาล และการเติมหมู่ซัลเฟต (sulfation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2, 4 และ 6 chondroitin จึงมี 4 รูปแบบแบ่งตามจำนวนหมู่ซัลเฟต คือ non-sulfated, mono-sulfated, di-sulfated, และ tri-sulfated ร่างกายสามารถสร้าง chondroitin sulfate ได้โดยอาศัยเอนไซม์ในกลุ่ม sulfotransferase ในการเติมหมู่ซัลเฟต (รูปที่ 1) นอกจากนี้ ยังสามารถได้รับ chondroitin sulfate จากอาหารจำพวกเอ็น กระดูกอ่อน และหนังของสัตว์



รูปที่ 1 แสดงกลไกการเติมหมู่ซัลเฟตของ chondroitin

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า chondroitin sulfate เป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่ว โดย chondroitin sulfate จะจับ (adsorb) กับแคลเซียมหรือผลึกแคลเซียม และป้องกันผลึกแคลเซียมอื่นเข้ามาจับ ทำให้สามารถยับยั้งการโตขึ้นของผลึกแคลเซียม ทำให้นิ่วไม่สามารถเกาะกับเซลล์ผิวหลอดไต และถูกขจัดออกทางปัสสาวะในที่สุด อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเกิดนิ่วโดย chondroitin sulfate ลดลงในผู้ใหญ่ แต่ยังไม่มีการศึกษาได้อธิบายการเปลี่ยนแปลงนี้ได้

ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่ซัลเฟตของ chondroitin sulfate โดยอ้างอิงจากหลักฐานสองประการ ประการแรก คือ รายงานการศึกษา Tamm-horsfall protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ยับยั้งการเกิดนิ่ว และพบว่า Tamm-horsfall protein มีประสิทธิภาพในการยับยั้งนิ่วลดลงในผู้ใหญ่คล้ายคลึงกับ chondroitin sulfate โดยพบว่าประสิทธิภาพที่ลดลงสัมพันธ์กับปริมาณหมู่ sialic acid ซึ่งเป็นหมู่ที่เป็นประจุลบของโปรตีนลดลง และประการที่สอง คือ รายงานการศึกษาที่แสดงว่า เมื่อมีการเติมหมู่ซัลเฟตใน chondroitin แตกต่างกัน จะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองต่อ growth factor และการทำงานของเซลล์ในโมเดลเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาระดับ chondroitin sulfate และระดับ sulfation ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วและบุตรของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคนปกติ รวมถึงศึกษาผลของการเสริม chondroitin sulfate ในด้านการยับยั้งการก่อนิ่วในเซลล์เพาะเลี้ยง และในหนูที่มีภาวะ hyperoxaluria หรือหนูที่มีภาวะ chronic metabolic acidosis ซึ่งจะพบภาวะ hypocitraturia ร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของโรคนิ่วได้และแนวทางการป้องกัน เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปว่าสาเหตุที่ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดนิ่วของ chondroitin sulfate ลดลงในผู้สูงวัยสัมพันธ์กับการเติมหมู่ซัลเฟตหรือไม่ รวมไปถึงอาจเป็นหนทางในการพัฒนา ยาหรือแนวทางการบริโภคอาหารเพื่อช่วยป้องกันโรคนิ่วต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- ก. เพื่อศึกษาระดับ chondroitin sulfate และระดับ sulfation ของ chondroitin sulfate ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วและบุตรของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคนปกติ
- ข. เพื่อศึกษาประโยชน์ของการเสริม chondroitin sulfate ในด้านการป้องกันการเกิดนิ่ว

3. ระเบียบวิธีวิจัย

สารตัวอย่างทางชีวภาพ

การวิจัยครั้งนี้ จะใช้สารตัวอย่างทางชีวภาพซึ่งเป็นปัสสาวะ 24 ชั่วโมงที่ได้จากอาสาสมัครและเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C โดยตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงนั้น เก็บมาจากอาสาสมัคร 4 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ กลุ่ม 1A คือ ผู้ป่วยโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะในประเทศไทย ที่มีถิ่นพำนักในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และมีอายุตั้งแต่ 30 ปีขึ้นไป โดยทำการคัดเลือกและรวบรวมกลุ่มตัวอย่าง ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี กลุ่ม 1B คือ หายาของผู้ป่วยโรคนิ่วที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ที่มีอายุตั้งแต่ 7 ปีขึ้นไป ทุกคน กลุ่ม 2A กลุ่มควบคุมผู้ใหญ่ ได้แก่ ประชากรปกติที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ และมีคุณสมบัติเข้าได้กับเกณฑ์การ

คัดเข้าข้ออื่น ในขณะที่ไม่มีคุณสมบัติที่ตรงกับเกณฑ์การคัดออก รวมถึงมีอายุและเพศใกล้เคียงกับประชากรตัวอย่าง ผู้ป่วย (gender- and age-matched) Group 2B คือ กลุ่มควบคุมหายาประชากรปกติ

คณะผู้วิจัย ได้ดำเนินการขออนุมัติจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข และอยู่ระหว่างการพิจารณา

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ผู้วิจัยพิจารณาใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับการวิจัยก่อนหน้านี้ คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไต จำนวน 28 คน กลุ่มประชากรปกติ จำนวน 44 คน กลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนิ้วไต จำนวน 50 คน และกลุ่มบุตรของประชากรปกติ จำนวน 41 คน เนื่องจากผลจากการวิจัยก่อนหน้านี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

สถานที่ทำการวิจัยหลัก

1. การวิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ บันทึกร วิเคราะห์และแปลผล ดำเนินการที่ ภาคชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยโรคนิ้วไตและโรคระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. การทดลองในสัตว์ทดลอง กระทำที่ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยพะเยา

การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ

1. ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ใช้สารตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บรวบรวมไว้แล้ว และเก็บรักษาไว้ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80°C
2. ปัสสาวะของหนูทดลอง ทำการเก็บที่วันที่ 14 และ 28 หลังจากเสริม chondroitin sulfate แล้ว โดยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจากหนูซึ่งถูกเลี้ยงไว้ใน metabolic cage
3. ไตของหนู เก็บจาก euthanized mice ที่วันที่ 29 หลังจากเสริม chondroitin sulfate แล้ว โดยทำการ parafinization เพื่อทำการศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณ chondroitin sulfate ทั้งหมด และวิเคราะห์แยกปริมาณ non-sulfated, mono-sulfated, di-sulfated และ tri-sulfated chondroitin

ปัสสาวะหนู 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับ calcium, oxalate, citrate, magnesium, erythrocyte, urinary total antioxidant status, malondialdehyde

ไตหนู ศึกษาปริมาณนิ่วในหลอดไต (urolithiasis) และ nephrocalcinosis ในเนื้อไต

4. แผนการดำเนินงานวิจัย

เดือนที่ 1-6: วางแผนการทำงาน ประสานงานกับทีมนักวิจัยมหาวิทยาลัยพะเยา เตรียมการวิเคราะห์ chondroitin sulfate ทั้งหมดในปัสสาวะของอาสาสมัคร

เดือนที่ 7-12: วิเคราะห์ chondroitin sulfate ทั้งหมดในปัสสาวะของอาสาสมัคร เริ่มการทดลองในสัตว์ทดลอง

เดือนที่ 13-18: วิเคราะห์ sulfation ของ chondroitin sulfate ในปัสสาวะของอาสาสมัคร ทำการวิเคราะห์ ปัสสาวะและไตของสัตว์ทดลอง

เดือนที่ 19-24: วิเคราะห์ข้อมูล เขียนรายงานผลการวิจัยและรายงานความคืบหน้าครั้งสุดท้าย เตรียมและเผยแพร่
ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ

Activity	Month																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Preparation																								
- Ethical agreement request																								
- Preparation of chemical substances																								
Process																								
- Chondroitin sulfation in human study																								
- Chondroitin sulfation and stone prevention in cell culture																								
- Chondroitin sulfate supplement in mouse model and the urolithiasis prevention																								
Progression report																								
Summative data analysis																								
Data summarization																								
Manuscript writing																								
Final report presentation																								
Literature writing and publication																								

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ (1) Alteration of chondroitin sulfation in urolithiasis patients
(2) Chondroitin sulfate supplement alleviates calcium oxalate stone

Formation

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ และ (ค่า impact factor)

Urolithiasis (1.312), Nephrology (1.864), Pediatric Nephrology (2.881)

6. งบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน - ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ - ค่า Elisa kit สำหรับวัด chondroitin sulfate - ค่าอุปกรณ์การวัด capillary electrophoresis - ค่าสารเคมีเพื่อวัด chondroitin sulfation - ค่าสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ชั้นเนื้อไตหนู - ค่าอุปกรณ์การทดลองเซลล์เพาะเลี้ยง	50,000 30,000 15,000 5,000	 95,000 17,000	212,000
3. หมวดค่าใช้สอย - ค่าใช้จ่ายในการดูแลสัตว์ทดลอง	15,000		15,000
4. หมวดค่าจ้าง - ค่าวิเคราะห์ calcium, magnesium - ค่าขนส่งสารตัวอย่าง - ค่าตรวจแก้ไขภาษาอังกฤษ	3,000 2,000	8,000	13,000
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

รายละเอียดโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย): ผลของการเติมหมู่ซัลเฟตในคอนโดรอิตินซัลเฟตกับการป้องกันการเกิดนิ่วทางเดินปัสสาวะ

(ภาษาอังกฤษ): Role of chondroitin sulfation in urinary stone prevention

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย): นายฐสินธ์ ดิษยบุตร

(ภาษาอังกฤษ): Thasinas Dissayabutra

(ตำแหน่งวิชาการ): อาจารย์

เลขที่บัตรประชาชน: 3102101314171

บัตรหมดอายุวันที่ 28 ธันวาคม 2558

ระยะเวลาดำเนินงาน: 2 ปี

เวลาทำงานวิจัยในโครงการประมาณสัปดาห์ละ 22.5 ชั่วโมง

สถานที่ติดต่อ:

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-2256-4482

โทรสาร 0-2874-2385

Email thasinasdr@gmail.com

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา (ภาษาไทย): นางปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์

(ภาษาอังกฤษ): Piyaratana Tosukhowong

(ตำแหน่งวิชาการ): ศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ:

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-2256-4482

โทรสาร 0-2256-4482

Email piyaratana_t@yahoo.com

ชื่ออธิการบดี: ศาสตราจารย์ นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล

การเปิดบัญชีโครงการ

ชื่อบัญชีโครงการ	TRG57-นายฐสิณัส ดิษยบุตร กระทำการแทนโดย นายฐสิณัส ดิษยบุตรและ/หรือ นางปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์ และ/ หรือ นส.กาญจนา เควสสุท
เลขที่บัญชี	045-597772-1
ธนาคาร	ธนาคารไทยพาณิชย์
สาขา	สภากาชาดไทย
ผู้มีอำนาจสั่งจ่าย	1. นายฐสิณัส ดิษยบุตร (หัวหน้าโครงการ) 2. นางปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์ (อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ) 3. นางสาวกาญจนา เควสสุท (เจ้าหน้าที่การเงินและแผนกการภาควิชา)
เงื่อนไขในการสั่งจ่าย: ลงนามไม่น้อยกว่าสองในสาม โดยหนึ่งในสามต้องเป็นหัวหน้าโครงการ	

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ (Kidney stone disease: KSD) เป็นโรคที่พบบ่อยและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของไทย โดยเฉพาะในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีรายงานพบสูงถึง 17.6% ในวัยผู้ใหญ่ ก่อให้เกิดภาวะไตเสื่อมและไตวายเรื้อรัง และเป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของการผ่าตัดเอาไตออก (nephrectomy) นอกจากนี้แนวโน้มของการเกิดโรคนิ่วเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ด้วยผลจากการเปลี่ยนแปลงทางภูมิอากาศ การเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยกลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndrome) หรือการใช้ยาที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วเพิ่มขึ้น ทำให้โรคนิ่วทางเดินปัสสาวะกลายเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญมากขึ้น และการป้องกันผู้ที่มีความเสี่ยงมิให้เกิดโรคนิ่วตั้งแต่ต้นเพื่อไม่ให้เกิดโรคและภาวะแทรกซ้อนย่อมเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดในการดูแลผู้ป่วย

สาเหตุของโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ คือ สภาวะที่ปัสสาวะมีความอิ่มตัวยิ่งยวด (urinary supersaturation) ของสารก่อนิ่ว และการขาดสารยับยั้งการเกิดนิ่ว สารก่อนิ่วในปัสสาวะที่สำคัญได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลท ฟอสเฟต กรดยูริก เป็นต้น สารเหล่านี้เมื่อมีความอิ่มตัวยิ่งยวดจะจับกันกลายเป็นผลึกที่ไม่ละลายน้ำและกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด ในขณะที่สารยับยั้งการเกิดนิ่ว อาทิเช่น ซิเทรต แมกนีเซียม โพแทสเซียม และ glycosaminoglycan ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการรวมตัวกันของสารก่อนิ่วให้กลายเป็นสารเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้ดีและถูกขับออกทางปัสสาวะ มีปริมาณน้อยในปัสสาวะ พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วในประเทศตะวันตกมักตรวจพบภาวะแคลเซียมและออกซาเลทในปัสสาวะสูง (hypercalciuria and hyperoxaluria) เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ ในทางตรงกันข้าม ผู้ป่วยโรคนิ่วในประเทศไทยกลับตรวจพบภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) มากเป็นอันดับหนึ่ง แสดงให้เห็นว่าโรคหรือความผิดปกติที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วในคนไทยมีความแตกต่างกับชาวตะวันตก การให้การดูแลกลุ่มเสี่ยงจึงจำเป็นที่จะต้องมีความแตกต่างไปตามมูลเหตุของโรคที่พบในประชากรไทย ทว่า ในปัจจุบัน การศึกษาโรคที่เป็นสาเหตุของความผิดปกติที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วในคนไทยยังมีการศึกษาน้อยมาก มีหลักฐานเพียงเล็กน้อยที่ชี้ว่าความเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนืออาจเกิดจากโรค renal tubular acidosis หรือการไม่ยอมรับประทานผลไม้ที่มีซิเทรตเป็นส่วนประกอบมากเท่านั้น

จากการศึกษามากมาย แสดงให้เห็นว่า ญาติของผู้ป่วยโรคนิ่วเป็นกลุ่มเสี่ยงที่สำคัญมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง การศึกษาในไทยโดย อ.สุชัย จากคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล พบว่าญาติของผู้ป่วยโรคนิ่วมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วเฉลี่ยเป็น 3.18 เท่าของคนปกติ นั่นเป็นหลักฐานที่คลุมเครือว่าโรค

นิวในคนไทยอาจสัมพันธ์กับโรคหรือความผิดปกติทางพันธุกรรมบางประการ ผลการศึกษาของผู้วิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว. แสดงให้เห็นว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนี้ซึ่งยังไม่เกิดโรค มีความผิดปกติของปัสสาวะหลายประการคล้ายคลึงกับผู้ป่วย ได้แก่ ภาวะ hyperoxaluria, hypocitraturia, low glycosaminoglycan level และ high urinary protein level แม้ความผิดปกติเหล่านี้จะมีความรุนแรงน้อยกว่าบิดา-มารดาซึ่งเป็นผู้ป่วย แต่มีความแตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ผู้วิจัยสรุปได้ว่า ความผิดปกติเหล่านี้มีลักษณะการถ่ายทอดในครอบครัว และเมื่อผู้ที่มีความผิดปกติเหล่านี้อายุมากขึ้น ความผิดปกติจะรุนแรงขึ้นจนก่อให้เกิดเป็นโรคนี้ในที่สุด ถึงกระนั้นก็ตามผลจากการวิจัยของผู้วิจัยไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่าความผิดปกติเหล่านี้ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เนื่องจากบุตรของผู้ป่วยอาจจะพัฒนาความผิดปกติเหล่านี้จากการอยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน หรือมีแนวทางการดำเนินชีวิตและการเลือกรับประทานอาหารเช่นเดียวกับบิดา-มารดาได้

ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาของผู้วิจัยให้ความสำคัญกับการแก้ไขภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้กลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยโรคนี้ที่ได้รับการรักษาแล้ว และได้พัฒนายาที่มีพื้นฐานมาจากมะนาวเพื่อเสริมซีเทรตให้กับผู้ป่วย (อยู่ระหว่างการวิจัยทางคลินิกระยะที่ 3) เพื่อทดแทนยาโพแทสเซียมซีเทรตซึ่งเป็นยามาตรฐานแต่มีราคาแพงและมีภาวะแทรกซ้อนทางระบบทางเดินอาหารมาก ซึ่งจะช่วยแก้ไขปัญหา hypocitraturia ได้เป็นอย่างดี แต่ภาวะที่มีระดับ glycosaminoglycan ต่ำในปัสสาวะยังไม่มีผู้ให้ความสนใจไม่มากนัก glycosaminoglycans หรือ GAGs เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่มีประจุลบจำนวนมากเป็นองค์ประกอบ พบได้ในหลายเนื้อเยื่อในร่างกาย เช่น ผิวหนัง กระดูกอ่อน น้ำในข้อ เป็นต้น ที่ใด จะพบ GAG ชนิด heparan sulfate จำนวนมากที่ glomerular basement membrane ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเลือกผ่านประจุลบ (charge selection barrier) ป้องกันโปรตีนขนาดกลางรั่วออกมาทางปัสสาวะ และ chondroitin sulfate (CS) กับ hyaluronic acid (hyaluron หรือ HA) ที่สร้างจากเซลล์บุผิวหลอดเลือดและหลั่งออกจากปัสสาวะ

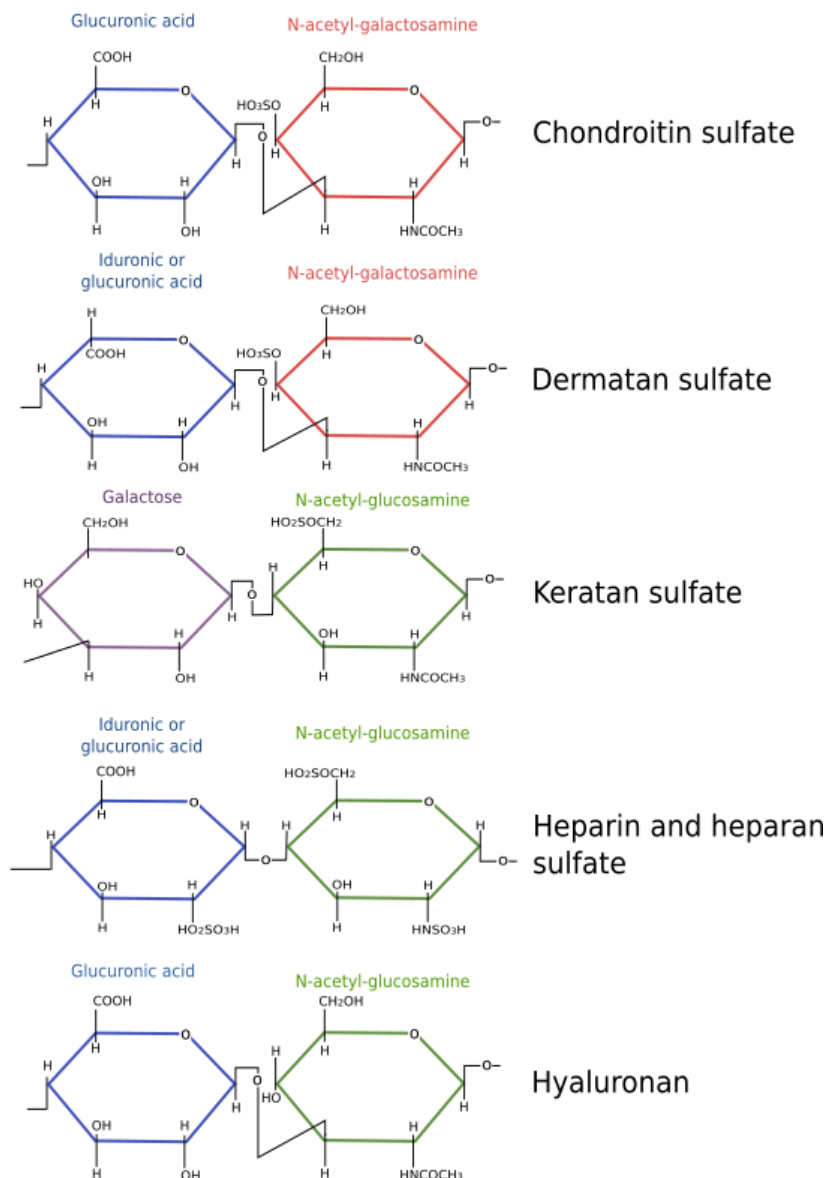
การศึกษาจากต่างประเทศพบว่า ในปัสสาวะคนปกติแม้จะมี CS มากที่สุดก็ตาม แต่ในผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้กลับไม่พบ CS เป็นองค์ประกอบของนิวแต่อย่างใด กลับพบ HA และ heparan sulfate (HS) ซึ่งเป็น GAGs ที่พบน้อยกว่าในปัสสาวะเป็นองค์ประกอบของ matrix ของก้อนนิว จึงมีความเชื่อว่า CS น่าจะทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดนิว ในขณะที่ HA และ HS ส่งเสริมการเกิดนิว นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่พบว่าระดับ GAGs ที่มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ (sulfated GAGs) ลดลงในผู้ป่วยโรคนี้

เนื่องจากปัจจุบัน CS ถูกนำมาใช้เป็นยาในการรักษาโรคข้อเสื่อมอย่างแพร่หลาย ในขณะที่ HA ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคตา และเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางค์หลากหลายชนิด ประชากรทั่วไปจึงได้รับทั้ง CS และ HA มากเกินกว่าในอดีต ซึ่งอาจส่งผลต่อกลไกการเกิดโรคนี้ได้

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัย มีความประสงค์ที่จะศึกษาระดับ sulfated glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, heparan sulfate และ hyaluronic acid ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ รวมถึงบุตรของผู้ป่วยโรคนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคนี้ เปรียบเทียบกับ ประชากรปกติ และศึกษาผลของการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิก ต่อการเกิดโรคในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลตจากภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluric urolithic rats) โดยการให้ ethylene glycol ร่วมกับวิตามิน โดยผู้วิจัยคาดหวังว่า ระดับของไกลโคสะมีโนไกลแคนส์ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้และบุตรจะบ่งชี้ถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ที่อาจ ถ่ายทอดทางพันธุกรรมในครอบครัวได้ และผลของการเสริมคอนดรอยติน และ/หรือกรดไฮยาลูโรนิก จะช่วยยับยั้งการเกิดนิ่ว ซึ่งจะสามารถช่วยลดโอกาสการเกิดโรคนี้ในผู้ที่มีความเสี่ยงสูงได้

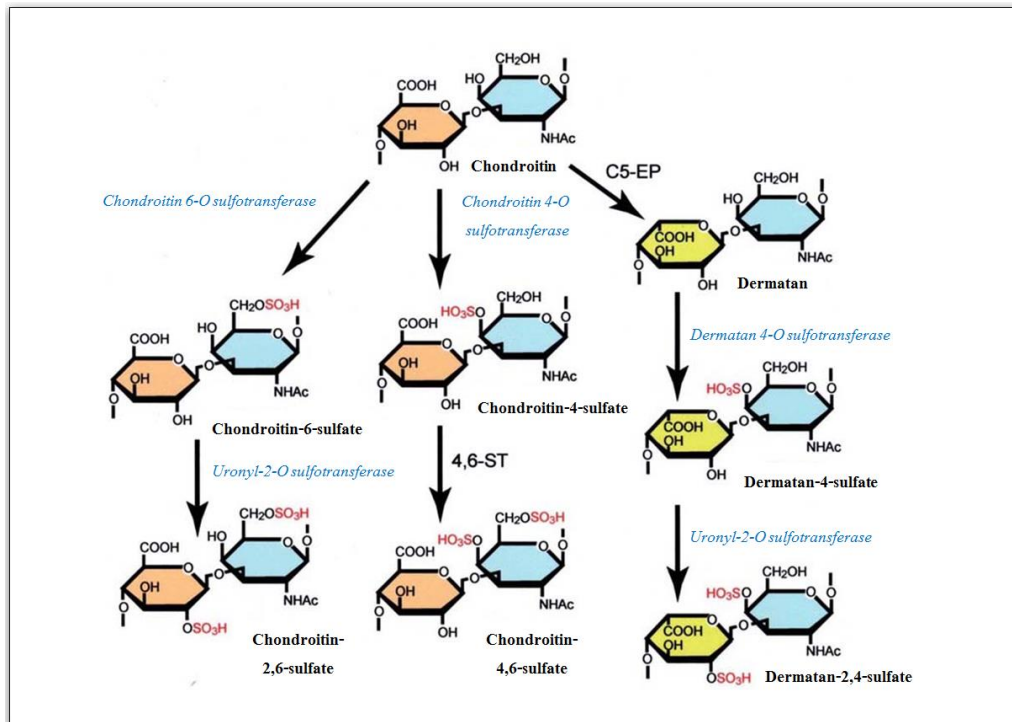
การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไกลโคสะมีโนไกลแคนส์ (glycosaminoglycans: GAGs) เป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากการเกิดโพลีเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งเป็นน้ำตาลที่หมู่เอมีน และน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก เป็นองค์ประกอบ ทำให้เกิดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีประจุลบจำนวนมาก โดยประจุลบที่พบในโมเลกุล นอกเหนือจากจะพบจากหมู่คาร์บอกซิลิกแล้ว ยังเกิดจากหมู่ซัลเฟตที่ถูกเติมลงไปในระหว่างกระบวนการสร้าง GAGs แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ GAGs ที่มีหมู่ซัลเฟต (เช่น chondroitin sulfate, heparan sulfate, dermatan sulfate และ keratan sulfate) และ GAGs ที่ไม่มีหมู่ซัลเฟต (เช่น heparin และ hyaluronic acid) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นองค์ประกอบของไกลโคสะมิโนไกลแคนส์แต่ละชนิด (ภาพจาก mmegias.webs.uvigo.es)

Chondroitin sulfate (CS) เป็น GAG ที่มีประจุลบเกิดจากหมู่ alcohol ของน้ำตาล และการเติมหมู่ซัลเฟต (sulfation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2, 4 และ 6 chondroitin จึงมี 4 รูปแบบแบ่งตามจำนวนหมู่ซัลเฟต คือ non-sulfated, mono-sulfated, di-sulfated, และ tri-sulfated ร่างกายสามารถสร้าง chondroitin sulfate ได้โดยอาศัยเอนไซม์ในกลุ่ม sulfotransferase ในการเติมหมู่ซัลเฟต (รูปที่ 2) นอกจากนี้ ยังสามารถได้รับ chondroitin sulfate จากอาหารจำพวกเอ็นกระดูกอ่อน และหนังของสัตว์



รูปที่ 2 แสดงกลไกการเติมหมู่ซัลเฟตของ chondroitin

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า chondroitin sulfate เป็นสารยับยั้งการเกิดนิวเคลียสออกซาเลท [1] โดย chondroitin sulfate จะจับ (adsorb) กับแคลเซียมหรือฟอสเฟตแคลเซียม และป้องกันฟอสเฟตแคลเซียมอื่นเข้ามาจับ ทำให้สามารถยับยั้งการโตขึ้นของฟอสเฟตแคลเซียม ทำให้นิวเคลียสไม่สามารถเกาะกับเซลล์บุผิวหลอดเลือด และถูกขจัดออกทางปัสสาวะในที่สุด [2] อย่างไรก็ตาม ความรู้เกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการเกิดนิวเคลียสโดยคอนดรอยตินซัลเฟตยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด ยังคงมีข้อสงสัยที่หลายอย่าง อาทิ เพราะเหตุใดปริมาณและประสิทธิภาพของการยับยั้งการเกิดนิวเคลียสโดย chondroitin sulfate ลดลงในผู้ใหญ่เมื่อเทียบกับเด็ก [3-5] หรือผลจากการทดลองในหลอดทดลองบางรายงานพบว่าคอนดรอยตินซัลเฟต อาจกระตุ้นให้เกิดการตกตะกอนของฟอสเฟต [6] หรือเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิวตติติสในทางเดินปัสสาวะได้ [7]

ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่ซัลเฟตของ chondroitin sulfate โดยอ้างอิงจากหลักฐานสองประการ ประการแรก คือ รายงานการศึกษา Tamm-Horsfall protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ยับยั้งการเกิดนิวเคลียส และพบว่า Tamm-Horsfall protein มีประสิทธิภาพในการยับยั้งนิวเคลียสลดลงในผู้ใหญ่คล้ายคลึงกับ chondroitin sulfate โดยพบว่าประสิทธิภาพที่ลดลงสัมพันธ์กับปริมาณหมู่ sialic acid ซึ่งเป็นหมู่ที่เป็นประจุลบของโปรตีนลดลง และประการที่สอง คือ รายงานการศึกษาที่แสดงว่า เมื่อมีการเติมหมู่ซัลเฟตใน chondroitin แตกต่างกัน จะมีผลให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงในการตอบสนองต่อ growth factor ฤทธิ์การต้านการอักเสบ และการทำงานของเซลล์ ในโมเดลเซลล์เพาะเลี้ยง (Lahari S, [8-10]) การศึกษาคอนดรอยตินซัลเฟตในปัสสาวะกับการเกิดโรคหลายชนิด พบว่าสัมพันธ์กับระดับ low sulfated chondroitin อาทิเช่น โรคไตจากเบาหวาน โรคไตเสื่อมเรื้อรัง การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ [11-13] ในเบื้องต้น ผู้วิจัยมีความประสงค์จะวัดระดับ sulfation ของคอนดรอยติน แต่ประสบอุปสรรคที่ไม่สามารถพัฒนาวิธีการวัด sulfation โดย capillary electrophoresis ได้ และขาดแคลนอุปกรณ์ mass spectrometry ซึ่งใช้ในการวัด sulfation ของคอนดรอยตินโดยวิธีมาตรฐาน [14,15] จึงขอเปลี่ยนแปลงการวิจัยเป็นการวัดระดับคอนดรอยตินซัลเฟต เฮปทาแรนซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตและบุตรแทน โดยจากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ตรวจพบระดับ sulfated GAGs ในปัสสาวะผู้ป่วยโรคไตต่ำ ผู้วิจัยคาดหวังว่าจะพบการลดลงของระดับ sulfated GAGs, CS และ HS ในผู้ป่วยโรคไตที่เข้าร่วมโครงการเช่นกัน และอาจพบสัดส่วนของ CS/sulfated GAGs ลดลง อย่างไรก็ตาม ค่าสัดส่วนของ CS/sulfated GAGs อาจไม่เปลี่ยนแปลง หรือเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากมีบางการศึกษาพบว่าเซลล์บุหลอดไต (tubular epithelial cells) สามารถสร้าง CS เพิ่มขึ้นในภาวะที่มีนิ่ว หรือปัสสาวะมีออกซาเลทสูง [16]

นอกจากนี้ ในปัจจุบัน มีการนำ CS มาใช้ในการรักษาโรคเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เพื่อใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) โดยมักให้ร่วมกับกลูโคซามีน และมีแนวโน้มในการใช้โรคสมองเพื่อเพิ่ม neural growth [17] การบริโภคคอนดรอยตินซัลเฟตอาจมีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะได้

Heparan sulfate (HS) เป็น GAGs ที่พบมากที่สุดที่ตำแหน่ง glomerular basement membrane (GBM) และทำหน้าที่หลักในกระบวนการยับยั้งการรั่วของอัลบูมินในปัสสาวะ เนื่องจากเฮปทาแรนซัลเฟตมีประจุลบเป็นจำนวนมากจึงช่วยขวางกั้นโปรตีน โดยเฉพาะอัลบูมิน มิให้เคลื่อนที่ผ่าน GBM ได้เป็นปกติ การศึกษาระดับ GAGs ในปัสสาวะ พบว่า ในบรรดา GAGs สามชนิดที่พบมากที่สุด ในปัสสาวะ คือ CS, HA และ HS แล้ว HS จะเป็น GAGs ที่พบน้อยที่สุดในปัสสาวะ (ค่าปกติโดยประมาณ chondroitin sulfate 60% hyaluronic acid 20%, heparan sulfate 10%, dermatan sulfate 7% และ keratin sulfate 3%) [18,19] แต่จะพบสัดส่วนของ HS เพิ่มขึ้นในกรณีที่มีโรคหรือความผิดปกติเกิดขึ้นที่ไต ทั้งในส่วนของโกลเมอรูลัสหรือทิวบูล โดยมีรายงานการเพิ่มขึ้นของ HS ในโรคไตวาย การติดเชื้อที่กระเพาะปัสสาวะ หรือในการทดลองเซลล์ที่มีการเติมออกซาเลทลงไป เป็นต้น [20,21] ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลมาจากการทำลาย glomerular หรือ tubular basement membrane หรือการสร้างหรือการหลั่ง HS เพิ่มขึ้นจากเซลล์บุหลอดไต อีกทั้ง HS เป็น

GAGs ที่พบเป็นองค์ประกอบของ matrix ก้อนนี้ร่วมกับ HA [1] แต่หลักฐานส่วนใหญ่ชี้ให้เห็นว่า HS มีผลในการยับยั้งการเกิดนิวไทด์เล็กน้อย โดยยับยั้งกระบวนการที่ผลึกเกาะกับเซลล์ หรือ ลดการบาดเจ็บของเซลล์ที่เกิดจากออกซาลาเลท และอาจเป็นตัวบ่งชี้การบาดเจ็บของไตจากนิวไทด์ [6,7,22,23] อย่างไรก็ตาม Oranan M รายงานว่า single nucleotide polymorphism ของยีนที่สร้าง HS อาจเพิ่มความเสี่ยงการเกิดนิวไทด์ [24]

Hyaluronic acid (HA) ทำหน้าที่เป็น adhesion molecule ระหว่างผลึกนิวไทด์ด้วยกัน ทำให้เกิด crystal growth นอกจากนั้นยังพบว่า HA ที่ผิวของ renal tubular epithelium ทำให้เกิดการเกาะติดของผลึกกับเซลล์บุหลอดไต ทำให้เกิด crystal retention [25] ซึ่งทั้งสองเป็นกระบวนการสำคัญในการเกิดนิวไทด์ ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของ HA ในปัสสาวะจะส่งเสริมการเกิดนิวไทด์ [1]

4. วัตถุประสงค์

- ค. เพื่อศึกษาระดับ chondroitin sulfate (CS), heparan sulfate (HS) และระดับ hyaluronic acid (HA) ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตและบุตรของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคนปกติ
- ง. เพื่อศึกษาประโยชน์ของการเสริม chondroitin sulfate ในด้านการป้องกันการเกิดนิวไทด์

5. ระเบียบวิธีวิจัย

5.1 ระดับไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟต คอนดรอยตินซัลเฟต เฮปารานซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะผู้ป่วยโรคไตและบุตร เทียบกับกลุ่มประชากรปกติ
สารตัวอย่างทางชีวภาพ

การวิจัยครั้งนี้ จะใช้สารตัวอย่างทางชีวภาพซึ่งเป็นปัสสาวะ 24 ชั่วโมงที่ได้จากอาสาสมัคร และเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C โดยตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงนั้น เก็บมาจากอาสาสมัคร 4 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ กลุ่ม 1A คือ ผู้ป่วยโรคไตทางเดินปัสสาวะในประเทศไทย ที่มีถิ่นพำนักในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และมีอายุตั้งแต่ 30 ปีขึ้นไป โดยทำการคัดเลือกและรวบรวมกลุ่มตัวอย่าง ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี กลุ่ม 1B คือ ทายาทของผู้ป่วยโรคไตที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ที่มีอายุตั้งแต่ 7 ปีขึ้นไป ทุกคน กลุ่ม 2A กลุ่มควบคุมผู้ใหญ่ ได้แก่ ประชากรปกติที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคไตทางเดินปัสสาวะ และมีคุณสมบัติเข้าได้กับเกณฑ์การคัดเข้าข้ออื่น ในขณะที่ไม่มีคุณสมบัติที่ตรงกับเกณฑ์การคัดออก รวมถึงมีอายุและเพศใกล้เคียงกับประชากรตัวอย่างผู้ป่วย (gender- and age-matched) Group 2B คือ กลุ่มควบคุมทายาทประชากรปกติ

คณะผู้วิจัย ได้ดำเนินการขออนุมัติจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาการ
ศึกษาวิจัยในคน กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข และอยู่
ระหว่างการพิจารณา

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ผู้วิจัยพิจารณาใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับการวิจัยก่อนหน้านี้ คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไต จำนวน
28 คน กลุ่มประชากรปกติ จำนวน 44 คน กลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนิ้วไต จำนวน 50 คน และกลุ่ม
บุตรของประชากรปกติ จำนวน 41 คน เนื่องจากผลจากการวิจัยก่อนหน้านี้มีความแตกต่างอย่างมี
นัยสำคัญ

การวิเคราะห์

ตัวอย่างปัสสาวะของตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์หา

- ระดับ sulfated glycosaminoglycans โดยวิธี Dye binding assay [26] โดยมี
ขั้นตอน คือ โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่เจือจาง 2 เท่า นำไปทำปฏิกิริยากับ DMMB
solution (ประกอบด้วย Glycine, NaOH และ 1, 9-Dimethyl-Methylene Blue) ที่
กรองเรียบร้อยแล้ว นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดย
เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น
- ระดับ chondroitin sulfate และ heparan sulfate วัดโดยวิธี ELISA (MyBioSource,
USA)
- ระดับ hyaluronic acid โดยวิธี capillary electrophoresis โดยใช้ บัฟเฟอร์ 50 mM
monosodium phosphate (NaH_2PO_4) และ butylamine ตัวคอลัมน์ที่มีความยาว
40 cm. หน้าตัด fused-silica capillary กว้าง 50 μm ศักย์ไฟฟ้า 15 kV ใช้กระแส
แบบ reversed-polarity mode แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 195 nm

5.2 ผลของการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิกในหนูที่กระตุ้นให้เกิดนิ้ว

การวิจัยทำที่ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยพะเยา โดยใช้หนู Wistar rats จำนวน 30 ตัว
แบ่งเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 กลุ่มหนูที่เป็นนิ้ว ได้รับการฉีด polyethylene glycol ปริมาณ 0.5 ml เข้าช่อง
ท้องหนึ่งครั้ง และวิตามินดี 0.1 mcg/dose เข้าช่องท้องทุกวันติดต่อกัน 5 วัน [27] และได้รับการ
ป้อนสารน้ำส่ง จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 3 กลุ่มหนูเป็นนึ่งที่ได้รับคอนทรอยตินซัลเฟต ได้รับการฉีด polyethylene glycol 0.5 ml เข้าช่องท้อง และวิตามินดี 0.1 mcg/dose เข้าช่องท้องทุกวันติดต่อกัน 5 วัน และได้รับการป้อนสารละลาย CS 40 mg/kg/day จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 4 กลุ่มหนูเป็นนึ่งที่ได้รับกรดไฮยาลูโรนิก ได้รับการฉีด polyethylene glycol 0.5 ml เข้าช่องท้อง และวิตามินดี 0.1 mcg/dose เข้าช่องท้องทุกวันติดต่อกัน 5 วัน และได้รับการป้อนสารละลาย HA 10 mg/kg/day จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 5 กลุ่มหนูเป็นนึ่งที่ได้รับคอนทรอยตินซัลเฟตและกรดไฮยาลูโรนิก ได้รับการฉีด polyethylene glycol 0.5 ml เข้าช่องท้อง และวิตามินดี 0.1 mcg/dose เข้าช่องท้องทุกวันติดต่อกัน 5 วัน และได้รับการป้อนสารละลาย CS 40 mg/kg/day และสารละลาย HA 10 mg/kg/day จำนวน 6 ตัว

หนูทุกตัวจะได้รับการบันทึกน้ำหนักตัว อาหารและน้ำที่รับประทาน รวมไปถึงเก็บปัสสาวะเพื่อตรวจ urine volume, urine creatinine, CS และ HA ในวันที่ 0, 8 และ 15 รวมถึงทำ euthanasia ในวันที่ 15 เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดตรวจ serum creatinine, ALT และตัวอย่างไตตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

สารไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่ใช้ในการทดลอง

คอนทรอยติน ซัลเฟต (Hangzhou Hyper Chemicals Limited, China) ผลิตจากกระดูกอ่อนวัว

กรดไฮยาลูโรนิก (Hangzhou Hyper Chemicals Limited, China)

สถานที่ทำการวิจัยหลัก

1. การวิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ บันทึก วิเคราะห์และแปลผล ดำเนินการที่ ภาคชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยโรคหัวใจและโรคระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. การวิเคราะห์ Capillary electrophoresis ที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. การทดลองในสัตว์ทดลอง กระทำที่ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยพะเยา
4. การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กระทำที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ

1. ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ใช้สารตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บรวบรวมไว้แล้ว และเก็บรักษาไว้ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C

2. ปัสสาวะของหนูทดลอง ทำการเก็บในวันที่ 8 และ 15 หลังจากเสริม chondroitin sulfate และ/หรือ hyaluronic acid แล้ว โดยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจากหนูซึ่งถูกเลี้ยงไว้ใน metabolic cage
3. เลือดของหนูทดลอง ทำการเก็บในวันที่ 15 โดยใช้เลือดจากหัวใจภายหลังทำ euthanasia
4. ไตของหนู เก็บจาก euthanized mice ในวันที่ 15 หลังจากเสริม chondroitin sulfate และ/หรือ hyaluronic acid แล้ว โดยทำการ parafinization เพื่อทำการศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้เข้าร่วมโครงการ ทำการวิเคราะห์ปริมาณ sulfated glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, heparan sulfate และ hyaluronic acid

ปัสสาวะหนู วิเคราะห์ระดับ creatinine, chondroitin sulfate และ hyaluronic acid

เลือดหนู วิเคราะห์ผลข้างเคียงต่อดับและไตจากการให้ ethylene glycol, CS และ HA โดยตรวจ serum creatinine และ ALT

ไตหนู ศึกษาปริมาณนิ่วในหลอดไต (urolithiasis) และ nephrocalcinosis ในเนื้อไต

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

ผู้วิจัยใช้โปรแกรม SPSS version 21.0 (IBM statistics, USA) ในการวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลทั่วไป อาทิ น้ำหนักตัว ปริมาณอาหารและน้ำที่บริโภคต่อวัน ระดับของไกลโคเซมิโนไกลแคนส์ creatinine และ ALT จะถูกแสดงในรูปของ mean $\pm$ SD โดยใช้การวิเคราะห์แบบ unpaired *t*-test ในขณะที่ข้อมูล non-parametric อันได้แก่ ระดับความรุนแรงของการเกิดนิ่วในเนื้อไต จะถูกแสดงในรูปของ median $\pm$ interquartile range โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Kruskal-Willis ในการเปรียบเทียบทุกกลุ่ม และ Mann-Whitney ในการเปรียบเทียบครั้งละ 2 กลุ่ม ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะถูกกำหนดเมื่อค่า $p < 0.05$

จริยธรรมในการทดลอง

ผู้วิจัยขออนุมัติเพื่อรับรองจริยธรรมในการวิจัยนี้ 2 ส่วน ส่วนแรก เป็นการวิจัยตัวอย่างชีวภาพจากผู้เข้าร่วมโครงการ ได้รับการรับรองจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์โดยคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคนด้านการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข หมายเลขโครงการ 06-2557 และได้รับการรับรองจริยธรรมการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจาก คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่รับรองโครงการ 59 01 04 0007 และ คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่โครงการ 011/2560

แหล่งทุนวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนแหล่งทุนสำหรับการทำวิจัย จาก ทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประกาศผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้วิจัยปฏิเสธการมีผลประโยชน์ทับซ้อนใดๆ ที่มิในการวิจัยนี้

3. ผลการทดลอง

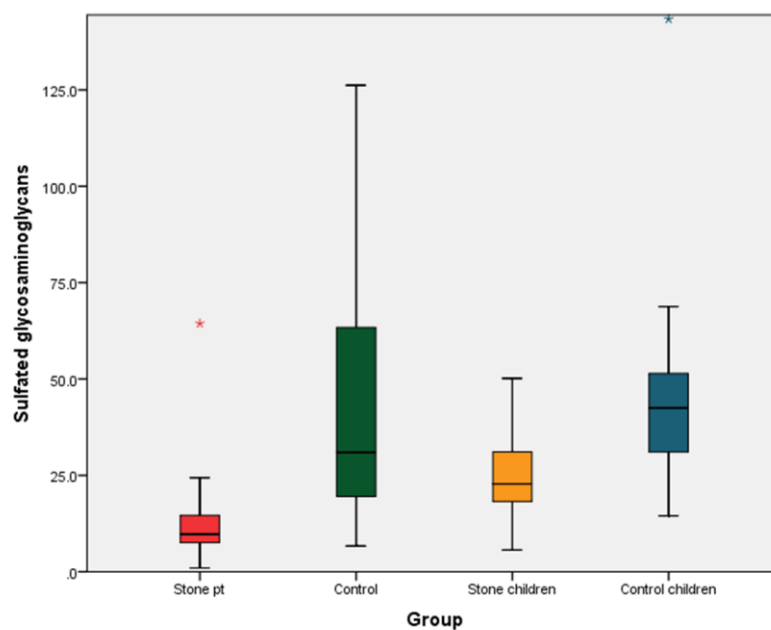
3.1 ระดับไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟต คอนดรอยตินซัลเฟต เฮปาราแรนซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะผู้ป่วยโรคนี้และบุตร เทียบกับกลุ่มประชากรปกติ

ผลการศึกษาปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้เทียบกับคนปกติ (กลุ่มเปรียบเทียบพ่อแม่) ที่มีอายุและเพศไม่แตกต่างกัน และบุตรของผู้ป่วยโรคนี้เปรียบเทียบกับบุตรของคนปกติ (กลุ่มเปรียบเทียบบุตร) แสดงในตารางที่ 1 จะพบว่า ค่า Total sulfated glycosaminoglycans (GAGs) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ต่ำกว่าคนปกติมาก ซึ่งสอดคล้องการผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่น่าสนใจ คือ บุตรของผู้ป่วยโรคนี้ก็มีระดับ total sulfated GAGs ในปัสสาวะต่ำกว่าคนปกติเช่นกัน

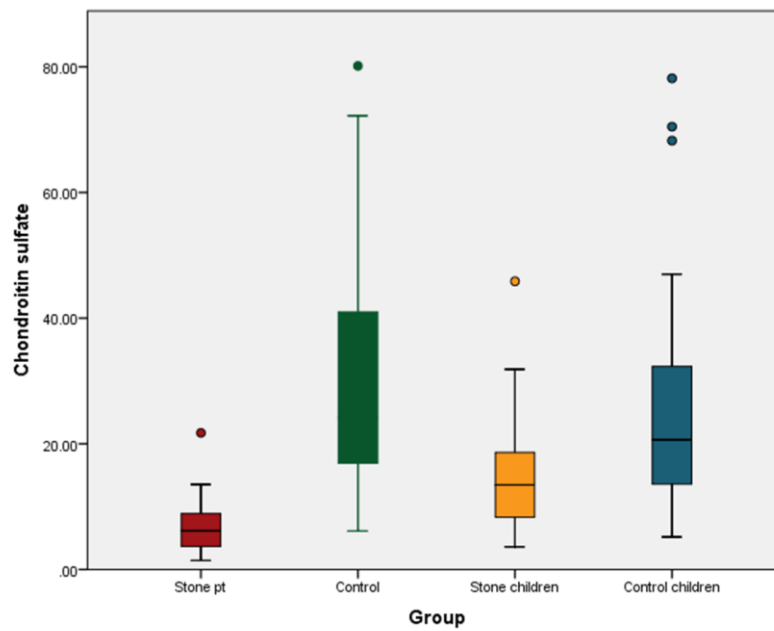
ตารางที่ 1 แสดงระดับไกลโคสะมิโนไกลแคนส์แต่ละชนิดในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการ

	Stone patients	Control parents	Stone children	Control children
Total sulfated GAGs (mg/day)	12.5±11.8	46.2±40.0*	24.4±10.4	43.8±23.1 [#]
Chondroitin sulfate (mg/day)	6.63±4.39	30.30±20.11*	14.51±8.35	24.77±17.87 [#]
Heparan sulfate (mg/day)	3.67±3.60	6.94±5.53*	5.97±3.77	6.32±4.20
Hyaluronic acid (mg/day)	15.67±11.51	8.65±5.60*	4.41±4.52	3.11±2.56

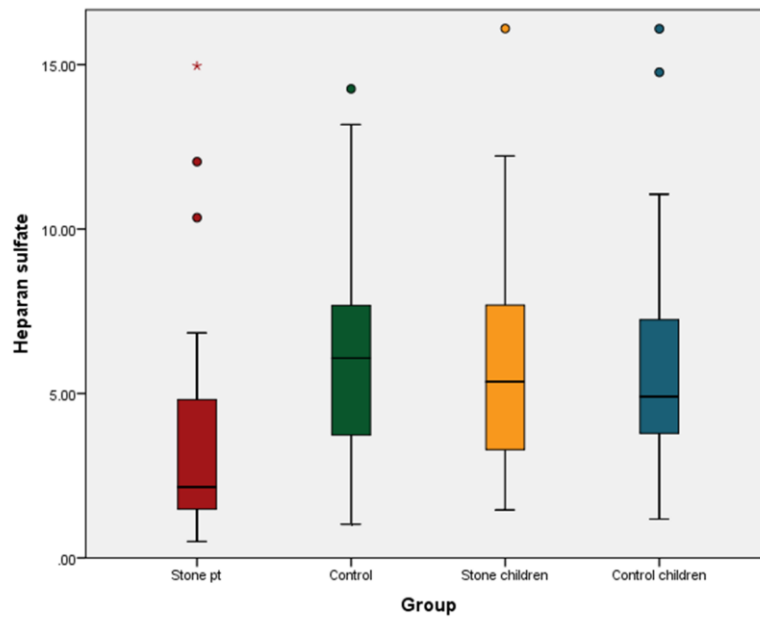
* p < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่ว (stone patients); [#] p < 0.05 เมื่อเทียบกับบุตรผู้ป่วยโรคนิ่ว (stone children)



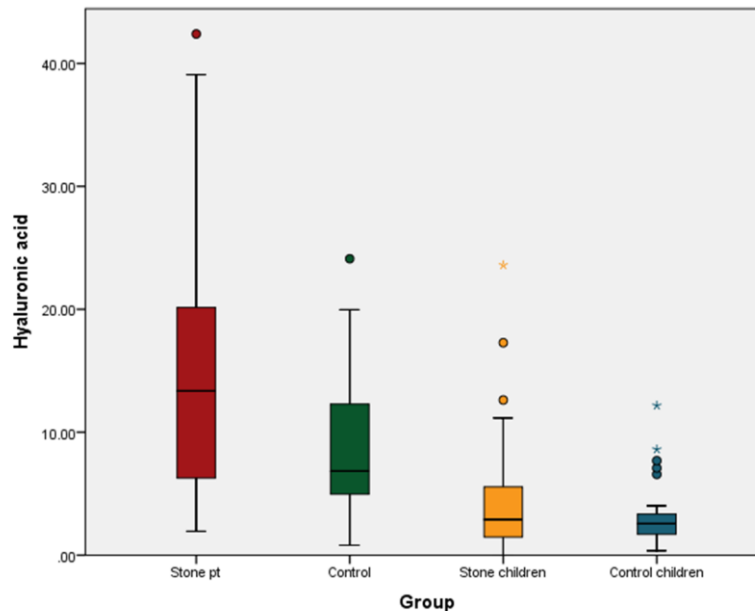
แผนภูมิที่ 1 แสดงระดับไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟตในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการ



แผนภูมิที่ 2 แสดงระดับคอนดรอยตินซัลเฟตในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการ



แผนภูมิที่ 3 แสดงระดับเฮปาราแรนซัลเฟตในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการ



แผนภูมิที่ 4 แสดงระดับกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการ

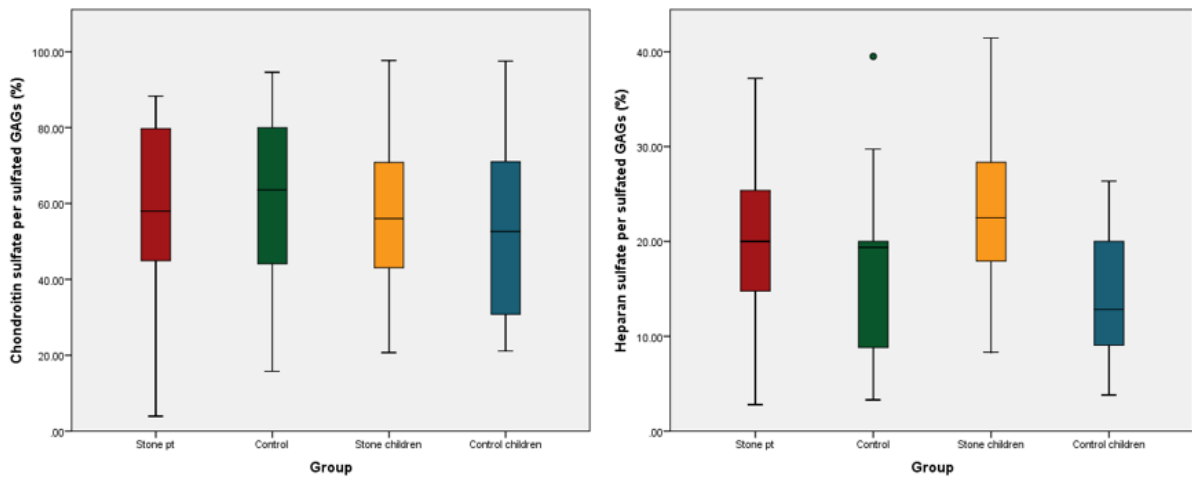
ระดับของคอนดรอยตินซัลเฟต และเฮปทาแรนซัลเฟตในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตในปัสสาวะ ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วมีเพียงระดับคอนดรอยตินซัลเฟตที่ต่ำกว่าบุตรคนปกติ แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนของคอนดรอยตินซัลเฟต และเฮปทาแรนซัลเฟต ต่อสัดส่วนไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟตทั้งหมด กลับพบว่า สัดส่วนของคอนดรอยตินซัลเฟตมีค่าไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่ม แต่เฮปทาแรนซัลเฟตมีสัดส่วนเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่ว และบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่ว เมื่อเทียบกับคนปกติ (ตารางที่ 2)

ในทางกลับกัน กลับพบปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วเพียงกลุ่มเดียว (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 2 แสดงสัดส่วนของคอนดรอยตินซัลเฟต และเฮปทาแรนซัลเฟต ต่อสัดส่วนไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟตทั้งหมด ในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการ

	Stone patients	Control parents	Stone children	Control children
%Chondroitin sulfate/Total sGAGs	56.6±24.5	61.7±21.4	56.9±18.2	53.5±23.4
%Heparan sulfate/Total sGAGs	23.2±16.8	15.7±8.0*	22.8±7.6	15.0±8.5 [#]

* p < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่ว (stone patients); [#] p < 0.05 เมื่อเทียบกับบุตรผู้ป่วยโรคนิ่ว (stone children)



แผนภูมิที่ 5 แสดง (ซ้าย) สัดส่วนของคอนทรอยตินซัลเฟตต่อไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟตในปัสสาวะ และ (ขวา) สัดส่วนของเฮปารานซัลเฟตต่อไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟตในปัสสาวะ

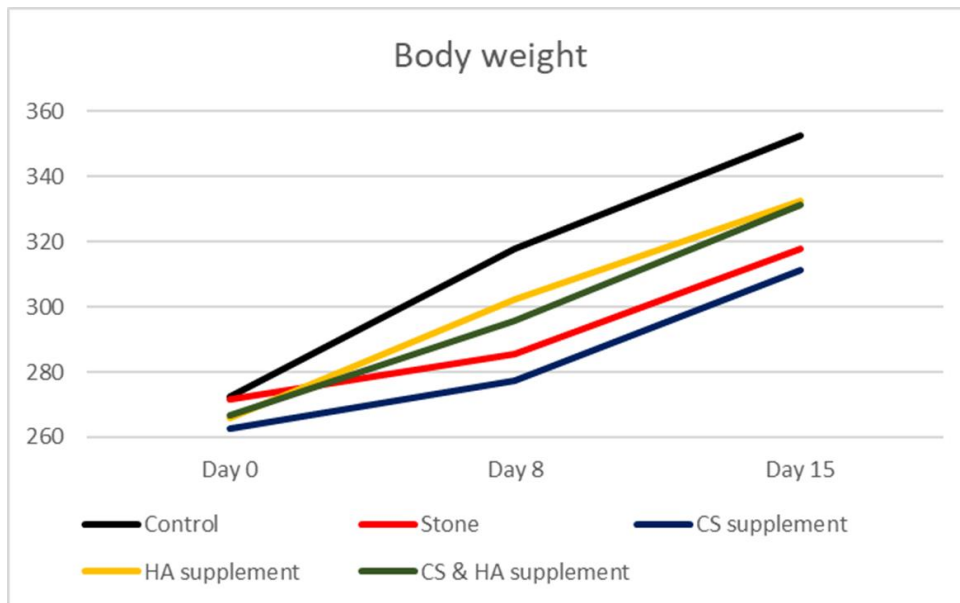
3.2 ผลของการเสริมคอนทรอยตินซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิกในหนูที่กระตุ้นให้เกิดนิ่ว

ผลการศึกษาสุขภาพโดยรวมของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม พบว่าหนูเกือบทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างในด้านน้ำหนัก อาหารและน้ำที่บริโภค พบเพียงหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นนิ่ว (stone group) และหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นนิ่วและได้รับ CS เสริม (CS supplement) เท่านั้นที่มีน้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ณ วันที่ 15 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงสุขภาพโดยรวมของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

Group	Body weight (g)			Food intake (g/day)			Water intake (ml/day)		
	Day 0	Day 8	Day 15	Day 0	Day 8	Day 15	Day 0	Day 8	Day 15
Control	272.3±26.5	317.7±15.7	352.5±11.5	18.8±3.9	22.8±2.0	21.5±2.7	31.6±5.6	35.6±4.8	36.1±3.6
Stone	271.7±27.8	285.5±32.8	317.6±29.4*	18.4±6.0	16.9±±6.0	21.1±2.8	33.2±7.7	46.0±15.2	37.2±7.2
CS supplement	262.6±23.9	277.3±9.5	311.2±10.6*	18.6±5.9	18.2±6.2	21.0±3.4	35.5±8.0	50.0±6.7	50.5±12.0
HA supplement	265.8±32.3	302.4±22.6	332.6±13.7	16.5±6.6	21.2±3.6	20.8±3.5	33.0±14.2	44.6±15.2	37.9±10.3
CS&HA supplement	266.6±32.4	295.6±29.4	331.1±22.9	18.2±4.4	18.5±6.3	22.7±4.9	33.7±3.6	45.4±8.3	40.6±12.4

* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control)



แผนภูมิที่ 5 แสดงน้ำหนักตัวของหนูทดลองแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 8 และ 15

ผลการศึกษาภาวะแทรกซ้อนของการให้ ethylene glycol, CS และ/หรือ HA ต่อการทำงานของไตและตับ ไม่พบความผิดปกติในการทำงานของไตและตับในหนูทดลองทุกกลุ่ม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงผล serum creatinine และ ALT ของหนูแต่ละกลุ่มในวันที่ 15 ของการทดลอง

Group	Creatinine (mg/dl)	ALT (u/ml)
Control	0.29±0.04	32.2±5.6
Stone	0.27±0.03	31.0±5.0
CS supplement	0.27±0.03	34.2±6.1
HA supplement	0.28±0.03	30.3±5.5
CS & HA supplement	0.27±0.02	35.7±6.6

นิ่วที่เกิดขึ้นในหนูที่กระตุ้นให้เกิดโรคโดยการฉีด ethylene glycol เป็นนิ่วชนิด calcium oxalate ซึ่งพิจารณาการการสะท้อนแสง polarized เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 3) ซึ่งตรงกับผลจากการวิจัยอื่นก่อนหน้านี้ [28] นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังศึกษาระดับการเกิดนิ่วในไตของหนูแต่ละกลุ่มโดยกำหนดความรุนแรงของการเกิดนิ่วเป็น 3 ปัจจัย ได้แก่ ระดับของการเกิดนิ่วหรือผลึกแคลเซียมออกซาเลตในเนื้อเยื่อไต การเกิดการอุดตันของหลอดไต และการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดที่บริเวณ tubulo-interstitium ดังนี้

ระดับของการเกิดนิ่วหรือผลึกแคลเซียมออกซาเลตในเนื้อเยื่อไต

(nephrocalcinosis/nephrolithiasis grade)

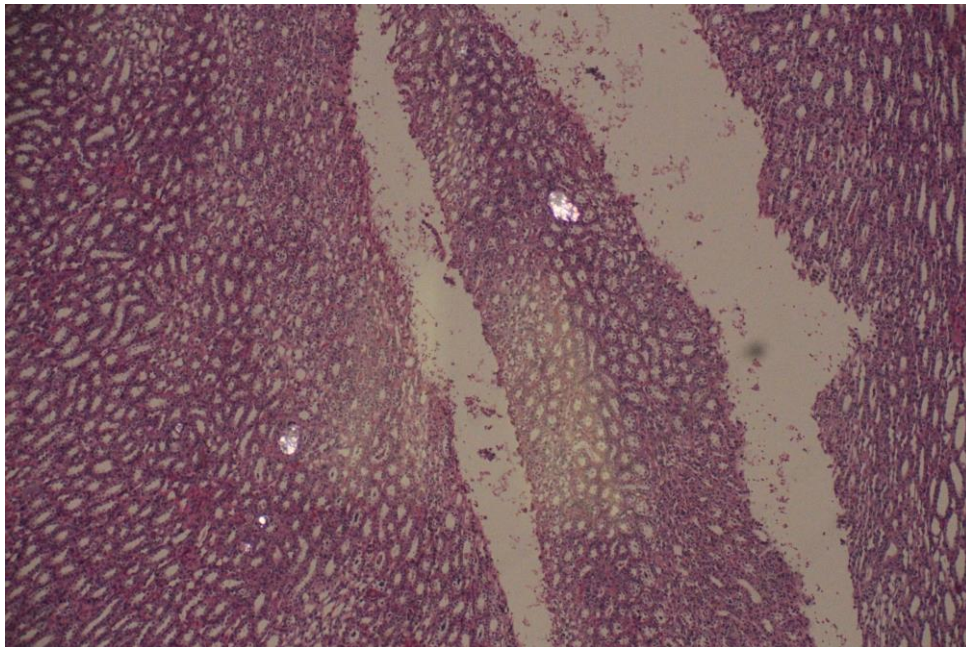
ระดับ 0	ไม่มีนิ่วเลย
ระดับ 1	มีนิ่ว 1-2 ตำแหน่งต่อชิ้นเนื้อหนึ่งหน้าตัด
ระดับ 2	มีนิ่ว 3-5 ตำแหน่งต่อชิ้นเนื้อหนึ่งหน้าตัด
ระดับ 3	มีนิ่ว 6-10 ตำแหน่งต่อชิ้นเนื้อหนึ่งหน้าตัด
ระดับ 4	มีนิ่วมากกว่า 10 ตำแหน่งต่อชิ้นเนื้อหนึ่งหน้าตัด

การเกิดการอุดตันของหลอดไต (tubular obstruction/occlusion)

ระดับ 0	ไม่มีการอุดตันของหลอดไต
ระดับ 1	มีการอุดตันของหลอดไต

การเกิดเนื้อเยื่อพังผืดที่บริเวณ tubule-interstitium (tubulointerstitial fibrosis)

ระดับ 0	ไม่มีเนื้อเยื่อพังผืด
ระดับ 1	มีเนื้อเยื่อพังผืด



รูปที่ 3 แสดงนิ่ว calcium oxalate ในเนื้อเยื่อไตของหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดโรคนี้จากภาวะออกซาเลตสูง ชักนำโดยการฉีด ethylene glycol และวิตามินดีเข้าไปในช่องท้อง (hyperoxaluric urolithic rats induced by ethylene glycol and vitamin D intraperitoneal injection)

ผลการศึกษาการเสริม CS และ/หรือ HA ในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดนิ่วทางเดินปัสสาวะ พบว่าการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟต มีผลยับยั้งการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะของหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถลดเกิดนิ่วได้ดีกว่าการไม่เสริม CS (กลุ่มหนูที่เป็นนิ่ว) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การเสริมกรดไฮยาลูโรนิกไม่มีผลในการยับยั้งหรือส่งเสริมการเกิดนิ่วแต่อย่างใดเมื่อเทียบกับการเสริม HA (กลุ่มหนูที่เป็นนิ่ว) นอกจากนี้ ยังพบว่า การเสริมทั้งคอนดรอยตินซัลเฟตและกรดไฮยาลูโรนิกช่วยยับยั้งการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะได้เมื่อเทียบกับการเสริมสารทั้งสอง (กลุ่มหนูที่เป็นนิ่ว) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่ดีเท่ากับการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตเพียงอย่างเดียว เนื่องจากหนูประมาณครึ่งหนึ่งยังคงตรวจพบนิ่วได้ (ตารางที่ 5)

เมื่อดูระดับความรุนแรงของการเกิดนิ่ว จะพบว่าการเสริม CS เพียงอย่างเดียว จะช่วยลดความรุนแรงของการเกิดนิ่วได้ดีที่สุด ($p = 0.002$) ในขณะที่การเสริม CS ร่วมกับ HA สามารถลดความรุนแรงของการเกิดนิ่วได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ($p = 0.009$) แต่การเสริม HA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดความรุนแรงของการเกิดนิ่วได้ ($p = 0.310$) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 แสดงค่าคอนดรอยตินซัลเฟตและกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะ และอุบัติการณ์การเกิดนิ่วของหนูกลุ่มต่างๆ

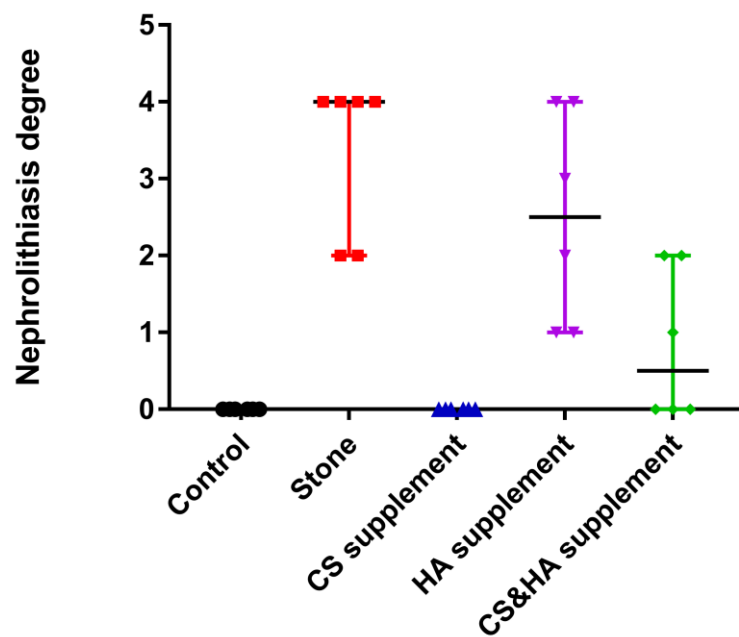
Group	Urine CS (mg/g creatinine)			Urine HA (mg/g creatinine)			Stone (cases/total)
	Day 0	Day 8	Day 15	Day 0	Day 8	Day 15	
Control	0.97±0.21	0.95±0.20	1.37±0.45	0.13±0.12	0.11±0.10	0.12±0.06	0/6
Stone	1.31±0.44	1.30±0.42	1.65±0.68	0.10±0.08	0.12±0.12	0.17±0.14	6/6
CS supplement	1.34±0.48	3.31±1.44*	4.86±0.78*	0.13±0.10	0.14±0.13	0.17±0.11	0/6 [#]
HA supplement	1.11±0.35	1.65±0.74	1.67±0.74	0.12±0.10	0.79±0.32*	0.88±0.22*	6/6
CS&HA supplement	1.39±0.38	3.08±1.63*	4.53±0.60*	0.12±0.06	0.77±0.15*	1.058±0.42*	3/6 [#]

* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control); [#] $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นนิ่ว (Stone)

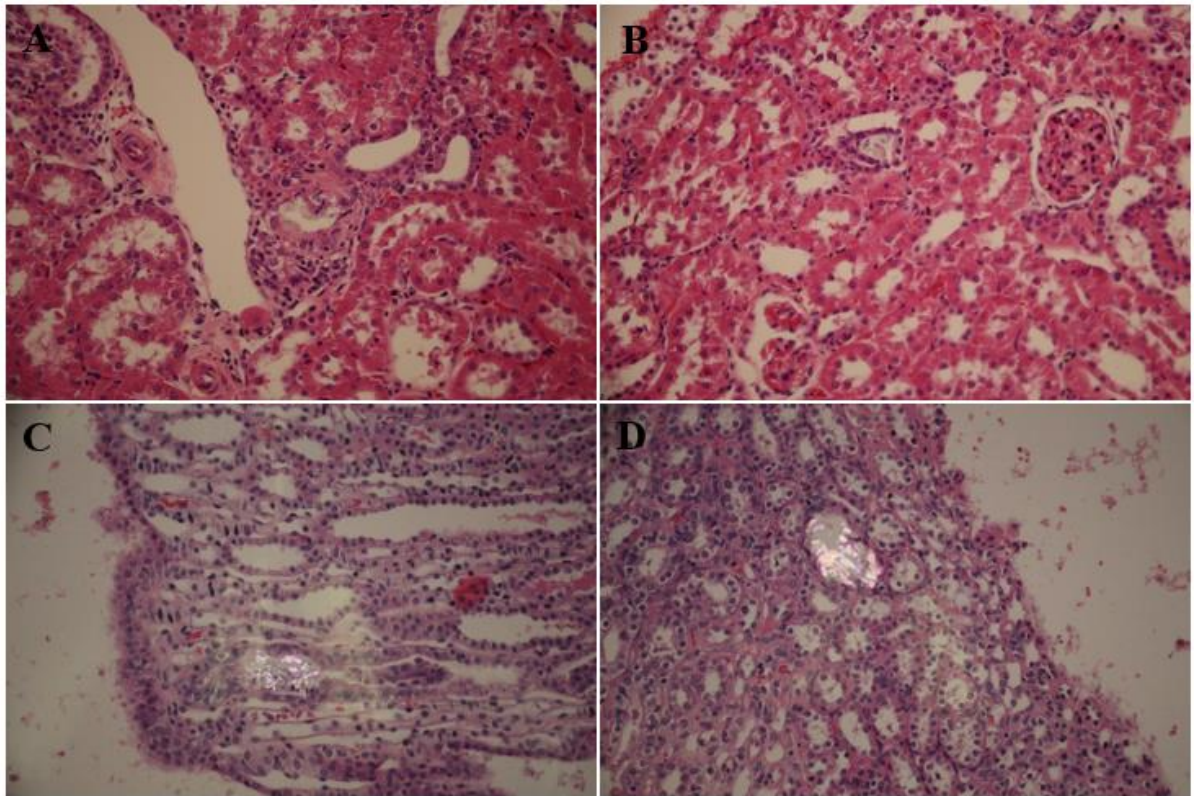
ตารางที่ 6 แสดงความรุนแรงของการเกิดนิ่วของหนูกลุ่มต่างๆ

Group	Nephrolithiasis grade		Tubular obstruction	Tubulo-interstitial fibrosis
	Median	Range		
Control	0	0	0	0
Stone	4	2 - 4	0	0
CS supplement	0 [#]	0	0	0
HA supplement	2.5	1 - 4	0	0
CS & HA supplement	0.5 [#]	0 - 2	0	0

[#] p < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นนิ่ว (Stone)



แผนภูมิที่ 6 แสดงระดับการเกิดนิ่วในหนูทดลองกลุ่มต่างๆ



รูปที่ 4 แสดงพยาธิสภาพของไตเมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภาพ A และ B เป็นลักษณะของไตปกติ ภาพ C และ D เป็นภาพไตที่มีการสะสมของฟลิกแคลเซียมออกซาลาเลทจนเป็นก้อนนิ่ว แต่ไม่พบการอุดตันของเนฟรอนหรือการเกิดพังผืด (fibrosis) ที่บริเวณ interstitium

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ พบว่า ผู้ป่วยโรคนี้ทางเดินปัสสาวะมีระดับ sulfated glycosaminoglycans (ผลรวมของ GAGs ที่มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate และ keratan sulfate) ต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้า และสนับสนุนข้อสมมุติฐานที่ว่าหมู่ซัลเฟตของ GAGs มีบทบาทในการยับยั้งการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะ

ผลการศึกษาเป็นไปดังที่คาดการณ์ไว้ล่วงหน้า คือ พบว่าผู้ป่วยโรคนี้ไตมีระดับคอนทรอยตินซัลเฟตในปัสสาวะลดลง แต่สิ่งที่น่าสนใจคือ ระดับของคอนทรอยตินซัลเฟตนั้นลดลงเป็นสัดส่วนเดียวกับระดับ total sulfated GAGs เนื่องจากคอนทรอยตินซัลเฟตถูกเชื่อว่าเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่ว ผู้วิจัยจึงคาดการณ์ว่าผู้ป่วยโรคนี้จะมีระดับคอนทรอยตินซัลเฟตลดลงอย่างมากจนไม่สามารถป้องกันการเกิดนิ่วได้ ซึ่งคอนทรอยตินซัลเฟตน่าจะลดเพียงสารเดียว เนื่องจากสารอื่น เช่น เดอร์มาแทนซัลเฟต และเคอราแตนซัลเฟต ไม่มีบทบาทในการป้องกันนิ่ว หากกระบวนการยับยั้งการเกิดนิ่วใช้คอนทรอยตินซัลเฟตและทำให้คอนทรอยตินลดลง สัดส่วนของคอนทรอยตินซัลเฟต ต่อ sulfated glycosaminoglycans น่าจะลดลง การลดลงของทั้งคอนทรอยตินซัลเฟตและ sulfated GAGs อย่างเป็นสัดส่วนค่อนข้างคงที่ ทำให้เชื่อได้ว่าผู้ป่วยโรคนี้อาจมีความผิดปกติของการสร้างหรือ

การเติมหมู่ซัลเฟตให้กับไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ มากกว่าความผิดปกติที่เกิดจากการสร้างลดลงหรือการทำลายคอนดรอยตินซัลเฟตเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากหลายประการ อาทิ การบกพร่องของการทำงานของเอนไซม์ sulfotransferase การบกพร่องของกระบวนการสร้าง proteoglycan จากคอนดรอยตินซัลเฟต เช่น การเสีย elongation หรือมีการทำลายหมู่ซัลเฟตจากสารผิดปกติหรือเอนไซม์ผิดปกติในปัสสาวะ เป็นต้น การศึกษาถึงกลไกตามสมมุติฐาน จำเป็นต้องใช้เทคนิคที่สามารถตรวจวัดหมู่ซัลเฟตของคอนดรอยติน หรือ คอนดรอยตินชนิด low-sulfated ซึ่งผู้วิจัยยังขาดประสบการณ์และเครื่องมือ ไม่สามารถทดสอบได้ในขณะนี้ เป็นเหตุให้คณะผู้วิจัยต้องทำการปรับเปลี่ยนแนวทางการวิจัยไปจากที่ได้ขออนุมัติไว้ก่อนหน้านี้

จากสมมุติฐานที่ว่า การลดลงของ sulfated GAGs เป็นผลจากความผิดปกติของการสร้างหรือการเติมหมู่ซัลเฟตให้กับไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ จะสามารถอธิบายการลดลงของเฮปทาแรนซัลเฟต แต่กลับมีสัดส่วนของเฮปทาแรนซัลเฟตต่อ sulfated GAGs ทั้งหมดได้ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของเฮปทาแรนซัลเฟตในปัสสาวะน่าจะสัมพันธ์กับการเกิดการบาดเจ็บหรือการทำลายของ glomerular basement membrane หรือ tubular basement membrane ซึ่งสามารถพบได้ในโรคอื่น อาทิ โรคไตวาย โรคที่มีการอักเสบของโกลเมอรูลัส หรือมีการทำลายของ glomerular basement membrane และโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ในโรคนีว บทบาทของเฮปทาแรนซัลเฟตต่อโรคนีวยังไม่เป็นที่แน่ชัด นักวิทยาศาสตร์หลายคนเชื่อว่า HS ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดนิ่ว แต่ก็พบหลักฐานว่าเฮปทาแรนซัลเฟตและกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบของ matrix ที่อยู่ในก้อนนิ่ว ขณะที่ไม่พบคอนดรอยตินซัลเฟตเลย จากการศึกษาี้ แม้ไม่สามารถบอกได้ว่าการเพิ่มขึ้นของอัตราการใช้เฮปทาแรนซัลเฟตในปัสสาวะเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่ว หรือเป็นผลมาจากโรคนีวทำให้เกิดการอักเสบในระบบทางเดินปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม มีข้อที่น่าสนใจ คือ ในบุตรของผู้ป่วยที่ยังไม่เป็นโรคนีว กลับพบการเพิ่มขึ้นการอัตราการใช้เฮปทาแรนซัลเฟตได้เช่นกัน ทำให้เกิดสมมุติฐานขึ้นสองประการ คือ การเพิ่มขึ้นของเฮปทาแรนซัลเฟตอาจเป็นลักษณะที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมในครอบครัวผู้ป่วยโรคนีวซึ่งหากเป็นเช่นนั้นจริง เฮปทาแรนซัลเฟตน่าจะมียบทบาทต่อการเกิดนิ่วมากกว่าที่เราทราบกันในปัจจุบัน อีกสมมุติฐาน คือ หากเฮปทาแรนซัลเฟตเป็นผลจากการอักเสบที่เกิดขึ้นในเนฟรอนเพียงเท่านั้น แสดงว่าในบุตรของผู้ป่วยโรคนีวที่ยังไม่มีโรคนีวเกิดขึ้น ต้องมีการอักเสบในเนฟรอนอยู่ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม หรืออาจเกิดจากการเกิดผลึกนิ่วเล็กๆ ที่ไม่รวมตัวกันเป็นก้อนนิ่ว และไม่สามารถเกาะติดกับผิวของเซลล์บุหลอดไตได้จากการมีขนาดเล็กและขาด adhesion molecule (เช่น กรดไฮยาลูโรนิก) การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของเฮปทาแรนซัลเฟตในปัสสาวะกับกลไกการเกิดนิ่วจึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับการพิสูจน์ต่อไปเพื่อให้เข้าใจธรรมชาติของการเกิดนิ่วมากขึ้น

แม้ total sulfated GAGs จะลดลงในผู้ป่วยโรคนีว ในทางกลับกัน กลับพบระดับ กรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนีวเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าผู้ป่วยโรคนีวจะมีการแสดงออกของกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นที่ผิวเซลล์บุหลอดไต เชื่อว่าทำให้ผลึกนิ่วเกาะกับ

ผิวเซลล์บุหลอดไตได้ดีขึ้น ทำให้เกิดการค้างของผลึกนิ่วในทางเดินปัสสาวะ (crystal retention) อีกทั้งยังเป็น matrix ที่พบได้บ่อยในก้อนนิ่ว ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะผู้ป่วยโรคนี้ น่าจะเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดนิ่ว

การกระตุ้นให้หนูเกิดนิ่วในไตสามารถกระทำได้หลายวิธี ในการทดลองนำร่อง ผู้วิจัยเลือกใช้การฉีด ethylene glycol เข้าในช่องท้องของหนูเพียงครั้งเดียว [29] เพื่อลดการก่อให้เกิดความทรมานแก่หนูทดลอง แต่พบว่าการฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียวไม่สามารถกระตุ้นให้หนูเกิดนิ่วได้ จึงต้องปรับวิธีการกระตุ้นให้หนูเกิดนิ่วโดยฉีด ethylene glycol ร่วมกับวิตามินดี [30] พบว่าวิธีนี้สามารถกระตุ้นให้หนูเกิดนิ่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ กลไกของการเกิดนิ่วจาก ethylene glycol คือ เมื่อสารดังกล่าวถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็น glyoxalate และ oxalate ตามลำดับ ซึ่งออกซาเลทจะถูกขับออกทางปัสสาวะทำให้หนูเกิดภาวะออกซาเลทในปัสสาวะสูง (hyperoxaluric urolithic rats) นอกจากนี้ การฉีดวิตามินดี จะเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ (hyperabsorption of calcium) ทำให้แคลเซียมในเลือดสูงและขับออกทางปัสสาวะ จึงสามารถจับกับออกซาเลทให้เป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลทในปัสสาวะ สิ่งที่ต้องกล่าวไว้ ณ ที่นี้ คือ ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วในมนุษย์ส่วนใหญ่ เกิดจากภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง ซึ่งมักสัมพันธ์กับภาวะขาดวิตามินดี ทำให้เกิดการสลายแคลเซียมจากกระดูก และลดการดูดกลับแคลเซียมที่ไต หรือในคนไทยมักสัมพันธ์กับการมีชีเทรตในปัสสาวะต่ำ ในขณะที่การมีออกซาเลทในปัสสาวะสูงเป็นปัจจัยที่พบได้ในคนที่ป่วยด้วยโรคนี้ประมาณ 20-30% เท่านั้น ดังนั้น พยาธิกำเนิดของการเกิดโรคนี้แคลเซียมออกซาเลทในหนูทดลองอาจมีความแตกต่างจากในมนุษย์ได้เล็กน้อย

การศึกษาผลของการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดนิ่ว พบว่า การเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตช่วยยับยั้งการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบหนูตัวใดที่ได้รับการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตเกิดนิ่วเลย เป็นที่น่าเสียดายที่ผู้วิจัยไม่สามารถทำการศึกษาระดับหมู่ซัลเฟตในคอนดรอยตินซัลเฟตที่เสริมให้แก่หนูทดลอง และเปรียบเทียบกับคอนดรอยตินซัลเฟตในปัสสาวะหนูทดลอง เพื่อทดสอบสมมุติฐานที่ว่า คอนดรอยตินซัลเฟตในปัสสาวะหนูที่เป็นนิ่วมีจำนวนหมู่ซัลเฟตลดลงหรือไม่ หรือมีความแตกต่างของจำนวนหมู่ซัลเฟตในคอนดรอยตินซัลเฟตในปัสสาวะหนูกับในยาที่เสริมหรือไม่ อย่างไรก็ตาม กลไกการเกิดโรคนี้ในหนูเกิดจากการกระตุ้นด้วยภาวะออกซาเลทในปัสสาวะสูง ซึ่งอาจแตกต่างจากในผู้ป่วยโรคนี้ ดังนั้นการศึกษาระดับหมู่ซัลเฟตในปัสสาวะของหนูทดลองเหล่านี้อาจไม่ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในมนุษย์

การเสริมกรดไฮยาลูโรนิกในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดนิ่วไม่มีผลต่อการเกิดนิ่ว โดยไม่เพิ่มการเกิดนิ่ว และไม่ยับยั้งการเกิดนิ่ว อาจเป็นเพราะกลไกการกระตุ้นให้หนูเกิดนิ่วโดยใช้ ethylene glycol

และวิตามินดีมีความรุนแรงมากเกินพอ จนกระทั่งการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะไม่ทำให้อาการโรครุนแรงขึ้น หรือความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเกณฑ์หรือจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ อย่างไรก็ตาม พบว่า หากเสริมทั้งคอนดรอยตินซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิกพร้อมกัน ความสามารถในการยับยั้งการเกิดนิ่วของคอนดรอยตินซัลเฟตจะลดลงเมื่อเทียบกับการให้คอนดรอยตินซัลเฟตเพียงอย่างเดียว จึงเป็นไปได้ว่ากรดไฮยาลูโรนิกขัดขวางการทำงานของคอนดรอยตินซัลเฟตในการยับยั้งการเกิดนิ่ว ควรทำการศึกษาผลของยาทั้งสองต่อไปในอนาคต

สิ่งที่ต้องคิดถึง คือ ในหนูที่กระตุ้นให้เกิดนิ่ว กลับไม่พบการลดลงของคอนดรอยติน และการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะเหมือนกับที่พบในตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยโรคนี้ หากพิจารณาอย่างละเอียดจะพบว่า แม้นิ่วแคลเซียมออกซาเลตเป็นนิ่วที่พบบ่อยที่สุดในคน และในการทดลองนี้ก็ทำการกระตุ้นให้หนูเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลตเช่นกัน แต่กลไกของการเกิดนิ่วมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยหนูในการทดลองนี้เกิดแคลเซียมออกซาเลตจากการเพิ่มขึ้นของ endogenous oxalate ที่สร้างขึ้นจาก ethylene glycol เป็นหลัก และเสริมด้วยภาวะ absorptive hypercalcemia ที่ทำให้เกิด hypercalciuria จากวิตามินดี ซึ่งแตกต่างจากในคนไข้ซึ่งพบว่าปัจจัยในการเกิดโรคที่พบบ่อยเป็นพบจากภาวะขาดตัวยับยั้งการเกิดนิ่วในปัสสาวะ คือ ซิเทรตในปัสสาวะต่ำ ร่วมกับการมีแคลเซียมในปัสสาวะเพิ่มขึ้นจาก bone resorption และอาจพบภาวะวิตามินดีในเลือดต่ำร่วมด้วย ด้วยเหตุนี้ การเปลี่ยนแปลงของอัตราการขับคอนดรอยตินซัลเฟต และกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ รวมถึงผลจากการเสริมสารทั้งสองต่อกลไกการเกิดนิ่วอาจออกฤทธิ์หรือมีผลกระทบผ่านการทำงานของซิเทรตและแคลเซียม รวมไปถึงวิตามินดีและตัวรับวิตามินดี (vitamin D receptor) ด้วย

สรุป ผลงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นภาวะ sulfated glycosaminoglycans และคอนดรอยตินซัลเฟตต่ำในผู้ป่วยโรคนี้ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ และเป็นงานวิจัยแรกๆ ที่แสดงให้เห็นว่า บุตรของผู้ป่วยโรคนี้ ซึ่งจัดเป็นผู้มีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วสูง มีภาวะ sulfated glycosaminoglycans และคอนดรอยตินซัลเฟตต่ำคล้ายคลึงกับผู้ป่วย และ ยังมีสัดส่วนของเฮปทาแรนซัลเฟตต่อ sulfated GAGs สูงขึ้นเหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นความผิดปกติที่สามารถถ่ายทอดในครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้ นอกจากนี้ ในผู้ป่วยโรคนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของกรดไฮยาลูโรนิกในปัสสาวะ การศึกษาในหนูที่กระตุ้นให้เกิดนิ่ว พบว่าการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตสามารถยับยั้งการเกิดนิ่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่การเสริมกรดไฮยาลูโรนิกแม้ไม่เพิ่มการเกิดนิ่ว แต่อาจขัดขวางกลไกการยับยั้งการเกิดนิ่วของคอนดรอยตินซัลเฟต

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น และต้องการการศึกษาในมนุษย์เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของคอนดรอยตินซัลเฟตในการยับยั้งการเกิดนิ่ว รวมถึงการศึกษากลไกในระดับโมเลกุล

แต่การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การขาดไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ที่มีหมู่ซัลเฟตในปัสสาวะ โดยเฉพาะคอนดรอยตินซัลเฟต น่าจะเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมในครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ้วคนไทย และการเสริมคอนดรอยตินซัลเฟตน่าจะมีประโยชน์ในการป้องกันการเกิดโรคนิ้วในผู้ที่มีความเสี่ยงสูง อาทิ บุตรหรือญาติใกล้ชิดของผู้ป่วยโรคนี้ หรือผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแล้วเพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำ ซึ่งคอนดรอยตินซัลเฟตพบได้ในอาหารทั่วไป อาทิ กระดูกอ่อนของสัตว์ต่างๆ เช่น หมู วัว ปลา นก ซึ่งสามารถหาได้ทั่วไปโดยไม่จำเป็นต้องซื้อผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีราคาแพง อันจะช่วยลดความทุกข์ทรมานของผู้ป่วยจากโรคและค่าใช้จ่ายทางสาธารณสุขได้เป็นจำนวนมาก

5. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

- 5.1 ศึกษาว่า low sulfated chondroitin มีบทบาทในกลไกการเกิดนีวอย่างไร
- 5.2 ศึกษาผลของการป้องกันการเกิดนีวโดยการเสริม chondroitin sulfate ในมนุษย์
- 5.3 ศึกษากลไกการป้องกันการเกิดนีวของ chondroitin sulfate ในระดับโมเลกุล
- 5.4 ศึกษากลไกการลดลงของ high sulfated chondroitin ในผู้สูงอายุ

รายงานผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยชิ้นนี้ยังไม่ได้รับการนำไปใช้ประโยชน์ แต่ผู้วิจัยวางแผนที่จะนำผลงานชิ้นนี้ไปนำเสนอในรูปของ poster presentation ในงานประชุม Kidney Week 2018 ที่เมืองซานดิเอโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ในช่วงเดือนกันยายน 2561

ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Chondroitin sulfate may alleviate calcium oxalate stone formation in hyperoxaluric rats

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ และ (ค่า impact factor): World Journal of Urology (Q1: IF 2.743)

เอกสารอ้างอิง

1. Khan SR, Kok DJ (2004) Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci* 9:1450-1482
2. Shirane Y, Kurokawa Y, Miyashita S, Komatsu H, Kagawa S (1999) Study of inhibition mechanisms of glycosaminoglycans on calcium oxalate monohydrate crystals by atomic force microscopy. *Urol Res* 27 (6):426-431
3. Momohara C, Tsujihata M, Yoshioka I, Tsujimura A, Nonomura N, Okuyama A (2009) Mechanism underlying the low prevalence of pediatric calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 182 (3):1201-1209. doi:10.1016/j.juro.2009.05.007
4. Miyake O, Yoshimura K, Tsujihata M, Yoshioka T, Koide T, Takahara S, Okuyama A (1999) Possible causes for the low prevalence of pediatric urolithiasis. *Urology* 53 (6):1229-1234
5. Miyake O, Kakimoto K, Tsujihata M, Yoshimura K, Takahara S, Okuyama A (2001) Strong inhibition of crystal-cell attachment by pediatric urinary macromolecules: a close relationship with high urinary citrate secretion. *Urology* 58 (3):493-497
6. Poon NW, Gohel MD (2012) Urinary glycosaminoglycans and glycoproteins in a calcium oxalate crystallization system. *Carbohydr Res* 347 (1):64-68. doi:10.1016/j.carres.2011.09.022
7. Torzewska A, Rozalski A (2014) In vitro studies on the role of glycosaminoglycans in crystallization intensity during infectious urinary stones formation. *APMIS* 122 (6):505-511. doi:10.1111/apm.12191
8. Faller CE, Guvench O (2015) Sulfation and cation effects on the conformational properties of the glycan backbone of chondroitin sulfate disaccharides. *J Phys Chem B* 119 (20):6063-6073. doi:10.1021/jp511431q
9. Lord MS, Day AJ, Youssef P, Zhuo L, Watanabe H, Caterson B, Whitelock JM (2013) Sulfation of the bikunin chondroitin sulfate chain determines heavy chain hyaluronan complex formation. *J Biol Chem* 288 (32):22930-22941. doi:10.1074/jbc.M112.404186
10. Lim JJ, Temenoff JS (2013) The effect of desulfation of chondroitin sulfate on interactions with positively charged growth factors and upregulation of cartilaginous markers in encapsulated MSCs. *Biomaterials* 34 (21):5007-5018. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.037
11. Reine TM, Grondahl F, Jenssen TG, Hadler-Olsen E, Prydz K, Kolset SO (2013) Reduced sulfation of chondroitin sulfate but not heparan sulfate in kidneys of diabetic db/db mice. *J Histochem Cytochem* 61 (8):606-616. doi:10.1369/0022155413494392
12. De Muro P, Faedda R, Satta A, Finetti D, Masala A, Cigni A, Sanna GM, Cherchi GM (2005) Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. *J Nephrol* 18 (2):154-160
13. Kakizaki I, Takahashi R, Ibori N, Kojima K, Takahashi T, Yamaguchi M, Kon A, Takagaki K (2007) Diversity in the degree of sulfation and chain length of the glycosaminoglycan moiety of urinary trypsin inhibitor isomers. *Biochim Biophys Acta* 1770 (2):171-177. doi:10.1016/j.bbagen.2006.09.026

14. Staples GO, Zaia J (2011) Analysis of Glycosaminoglycans Using Mass Spectrometry. *Curr Proteomics* 8 (4):325-336. doi:10.2174/157016411798220871
15. Tomatsu S, Shimada T, Mason RW, Kelly J, LaMarr WA, Yasuda E, Shibata Y, Futatsumori H, Montano AM, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii T (2014) Assay for Glycosaminoglycans by Tandem Mass Spectrometry and its Applications. *J Anal Bioanal Tech* 2014 (Suppl 2):006. doi:10.4172/2155-9872.S2-006
16. Borges FT, Michelacci YM, Aguiar JA, Dalboni MA, Garofalo AS, Schor N (2005) Characterization of glycosaminoglycans in tubular epithelial cells: calcium oxalate and oxalate ions effects. *Kidney Int* 68 (4):1630-1642. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00577.x
17. Yi JH, Katagiri Y, Susarla B, Figge D, Symes AJ, Geller HM (2012) Alterations in sulfated chondroitin glycosaminoglycans following controlled cortical impact injury in mice. *J Comp Neurol* 520 (15):3295-3313. doi:10.1002/cne.23156
18. Komosinska-Vassev K, Blat D, Olczyk P, Szeremeta A, Jura-Poltorak A, Winsz-Szczotka K, Klimek K, Olczyk K (2014) Urinary glycosaminoglycan (uGAG) excretion in healthy pediatric and adolescent population. *Clin Biochem* 47 (13-14):1341-1343. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.06.012
19. Harangi F, Gyorke Z, Meleg B (1996) Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy and stone-forming children. *Pediatr Nephrol* 10 (5):555-558
20. Erickson DR, Ordille S, Martin A, Bhavanandan VP (1997) Urinary chondroitin sulfates, heparan sulfate and total sulfated glycosaminoglycans in interstitial cystitis. *J Urol* 157 (1):61-64
21. Matsuo M (2008) Increased expression of heparan sulfate proteoglycan on the cultured renal epithelial cells during oxalate exposure. *Kurume Med J* 55 (1-2):19-28
22. Iida S, Ishimatsu M, Chikama S, Inoue M, Matsuoka K, Akasu T, Noda S, Khan SR (2003) Protective role of heparin/heparan sulfate on oxalate-induced changes in cell morphology and intracellular Ca²⁺. *Urol Res* 31 (3):198-206. doi:10.1007/s00240-003-0317-2
23. Chikama S, Iida S, Inoue M, Kawagoe N, Tomiyasu K, Matsuoka K, Noda S, Takazono I (2002) Role of heparan sulfate proteoglycan (syndecan-1) on the renal epithelial cells during calcium oxalate monohydrate crystal attachment. *Kurume Med J* 49 (4):201-210
24. Onaran M, Yilmaz A, Sen I, Ergun MA, Camtosun A, Kupeli B, Menevse S, Bozkirli I (2009) Heparan sulfate gene polymorphism in calcium oxalate nephrolithiasis. *Urol Res* 37 (1):47-50. doi:10.1007/s00240-008-0167-z
25. Gohel MD, Shum DK, Tam PC (2007) Electrophoretic separation and characterization of urinary glycosaminoglycans and their roles in urolithiasis. *Carbohydr Res* 342 (1):79-86. doi:10.1016/j.carres.2006.11.001
26. Liang Z, Bonneville C, Senez T, Henderson T (2002) Development and validation of a photometric titration method for the quantitation of sodium chondroitin sulfate (bovine) in Cosequin DS chewable tablet. *J Pharm Biomed Anal* 28 (2):245-249

27. Okada A, Nomura S, Higashibata Y, Hirose M, Gao B, Yoshimura M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Kohri K (2007) Successful formation of calcium oxalate crystal deposition in mouse kidney by intraabdominal glyoxylate injection. *Urol Res* 35 (2):89-99. doi:10.1007/s00240-007-0082-8
28. Khan SR (1997) Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol* 15 (4):236-243
29. Khan SR, Glenton PA (2010) Experimental induction of calcium oxalate nephrolithiasis in mice. *J Urol* 184 (3):1189-1196. doi:10.1016/j.juro.2010.04.065
30. Oh SY, Kwon JK, Lee SY, Ha MS, Kwon YW, Moon YT (2011) A comparative study of experimental rat models of renal calcium oxalate stone formation. *J Endourol* 25 (6):1057-1061. doi:10.1089/end.2010.0386

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานนี้จะสำเร็จมิได้หากปราศจากความอนุเคราะห์จากบุคคลต่างๆ ดังนี้ ผศ.ดร.พิสิษฐ์ ประพันธ์วัฒน์ หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี และ ผศ.ดร.ธัญญา ทองตัน อดีตหัวหน้าภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน อ.ดร.มนพิชา ศรีสะอาด อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นางสาวกนกพร จินดาพร นางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล และนางสาวสุภาวดี มิ่งมงคล ที่ช่วยในการวิเคราะห์ระดับไกลโคสไมโนไกลแคนส์ในปัสสาวะ อ.ดร.มารุตน์ แก้ววงศ์ อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ผู้ช่วยดูแลสัตว์ทดลอง อ.นพ.กรุณย์พงษ์ เอี่ยมเพ็ญแข อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจชิ้นเนื้อไตหนูทดลอง ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ อาจารย์ภาควิชาชีวเคมี ผู้เป็นที่ปรึกษาโครงการ และให้การสนับสนุนตลอดมา รวมไปถึงเจ้าหน้าที่การเงินและเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เจ้าหน้าที่ประจำสำนักงานจริยธรรมทั้งสามแห่ง เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สุดท้าย ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกองทุนวิจัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้



Urinary stone risk factors in the descendants of patients with kidney stone disease

Thasinas Dissayabutra¹ · Nuttiya Kalpongkul¹ · Jakkhaphan Rattanaphan¹ · Chanchai Boonla¹ · Monpicha Srisa-art² · Wattanachai Ungjaroenwathana³ · Piyaratana Tosukhowong¹

Received: 28 April 2017 / Revised: 5 February 2018 / Accepted: 6 February 2018
© IPNA 2018

Abstract

Background Evidence has indicated that immediate family members of nephrolithiasis patients had high opportunity to develop stones. However, they are usually not regarded to be at risk, since it is unclear if there are any lithogenic abnormalities found in non-stone-forming nephrolithiasis relatives. Our aim was to investigate urinary metabolic abnormalities in the children of nephrolithiasis patients, compared with the general population.

Methods The 24-h urinary metabolic profile was studied for 28 calcium oxalate nephrolithiasis patients (NL) and 46 of their descendants (ND), as well as 40 non-stone-forming volunteers (V) and 34 of their descendants (VD).

Results There was no difference between age, gender, and serum creatinine between NL vs. V (parental groups) and ND vs. VD (descendant groups). High urinary oxalate in nephrolithiasis and urinary calcium in their descendants was detected. In addition, an elevated urinary excretion rate of calcium, phosphate, protein, and albumin, along with low citrate excretion and high urinary supersaturation was observed in both the nephrolithiasis patients and their descendants. Approximate 17.8–24.4% of the nephrolithiasis descendants had a urinary supersaturation higher than the nephrolithiasis level, but none was found in VD group. The level of urinary supersaturation index was correlated with urinary protein and albumin excretion in nephrolithiasis family.

Conclusion It was demonstrated that nephrolithiasis offspring carried several urinary metabolic risks predisposing to stone formation which are similar to their parents, and about one in every five nephrolithiasis children had nephrolithiasis level urinary supersaturation.

Keywords Nephrolithiasis · Family · Urinary supersaturation · Hypercalciuria · Hypocitraturia · Heritability

Introduction

Nephrolithiasis is a common urinary disease in middle age and elderly. Currently, the incidence of nephrolithiasis is escalating, and affecting in younger adults. This is a result of extrinsic factors, such as climate warming and diets, and

intrinsic factors such as underlying obesity, insulin resistance, urinary tract infection, malabsorption syndrome, and genetic susceptibility [1, 2].

The most common type of urinary stone found in humans worldwide is calcium oxalate (CaOx). The important risk factors of CaOx stone formation are urinary supersaturation, increased urinary stone promoters, such as calcium and oxalate, and depleted urinary stone inhibitors such as citrate and magnesium [3–5]. Urinary supersaturation is a state that the concentration of solutes in urine exceeds the saturation point, causing spontaneous precipitation of solutes, with the inadequacy of stone inhibitors and urinary alkalization, calcium from a water-insoluble complex with oxalate. These crystals will aggregate and adhere to the renal tubular epithelium with the presence of urinary adhesion molecules. Then Randall's plaque formed by CaOx crystal deposits in interstitial tissue is a

✉ Thasinas Dissayabutra
Thasinas.D@chula.ac.th

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10150, Thailand

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³ Division of Urology, Department of Surgery, Sunpasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani, Thailand

nidus for urinary stone formation. In addition, some urinary glycoproteins such as prothrombin fragment-1 and osteopontin exert stone-inhibiting property, while certain proteins such as osteocalcin promote crystal aggregation [6]. Tamm-Horsfall protein, the most abundant glycoprotein in urine, is considered to be both stone promoter and inhibitor depending on different conditions.

Evidence has indicated that CaOx nephrolithiasis may be inheritable. Several studies reviewed that the close relatives of nephrolithiasis patients had high risk of stone formation than general population [7–9]. In Thailand, Sritippayawan S (2009) studied family histories and found that the family members of stone patients had a relative risk 3.18 times higher than general population [10]. Previous studies elucidated the pathogenesis of increased risk of nephrolithiasis in CaOx stone families. Bergsland KJ (2012) demonstrated the higher urinary calcium excretion and supersaturation but a reduced metastability-free range in stone-forming siblings [11]. Sáez-Torres (2013) revealed that healthy children with a positive family history of urinary stone disease had higher urinary calcium excretion and calcium/citrate ratio than children without family history of stone disease [12]. Park C (2010) claimed that stone patients who have a family history of stone disease had higher calcium excretion than patients without any family history [13]. Kinder JM (2002) reported that female siblings of stone formers tended to have a high urinary pH and calcium excretion, while male siblings had only high urinary calcium and a low potassium excretion [14]. The most discrete study was performed by Kristin J (2006), which found that urinary citrate excretion was only lowered in the male first relatives of calcium stone formers, compared with their non-stone-forming counterparts [15].

Regarding these, genetic susceptibility in a family with nephrolithiasis may play an important role in pathogenesis of stone formation than our current awareness. Evidence reported that stone disease occurred at a younger age and higher frequency in any population with nephrolithiasis patients in the family [16]. Since urinary stone disease causes urinary tract obstruction, infection, and impaired renal function, prevention of stone formation could reduce further kidney damage in familial members of nephrolithiasis. This study aimed to elucidate the abnormal urinary electrolyte and protein excretion that might be inherited in nephrolithiasis family members by comparing between nephrolithiasis patients and their children, and a group of healthy volunteers and their descendants. We also evaluated the urinary supersaturation and total antioxidant status among these groups. Knowing these inheritable metabolic abnormalities is a basis to investigate the pathophysiology of familial nephrolithiasis and is a key to prevent the stone formation in the relatives of nephrolithiasis patients.

Methods

Study design

A cross-sectional analytic study was conducted on four groups of participants: nephrolithiasis patients (NL group) who received kidney stone removal surgery during January 1, 2013–December 30, 2014 at the Sunpasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani Province, Thailand. The inclusion criteria for the NL subjects were idiopathic nephrolithiasis patients who underwent stone removal surgery for 1 month, and their stones contained calcium oxalate in composition. Plain KUB radiography or ultrasonography was taken to confirm no stone remnants larger than 0.4 cm remained, and any child or children admitted to the study participated freely. The exclusion criteria included (a) having a medical record of chronic kidney disease stage three or higher, or an estimated glomerular filtration rate less than 60 ml/min/1.73 m²; (b) a urinary tract infection; (c) or a documented genetic disease correlating to stone formation, such as complete renal tubular acidosis, Dent's disease, or cystinuria; (d) receiving any medication that alters urinary element excretion, such as diuretics, calcium or alkaline salt supplements. The healthy control group (V) was non-stone-forming volunteers who lived in the local community near the hospital area in August 2013. Further groups included were the direct descendants of nephrolithiasis patients (ND), and the descendants of volunteers (VD). The exclusion criteria of V, ND, and VD subjects were those who had any history of or existing nephrolithiasis or other diseases related to nephrolithiasis, a eGFR lower than 60 ml/min, a urinary tract infection or receiving any kind of drugs that affected their urinary element excretion.

Inadequate 24-h urine exclusion criteria were also applied in this study. Subjects with urine amount less than 0.5 ml/kg/day in children, or 500 ml/day in adults, and creatinine excretion less than 11 mg/kg/day in < 13-year-old boys, 13 mg/kg/day in 13- to 18-year-old male adolescents, or < 13-year-old girls, and 14 mg/kg/day in 13- to 18-year-old female adolescents were excluded from this study as an inadequate 24-h urine collection [17].

Among 172 recruits, 26 were excluded from this study according to these exclusion criteria, and 146 were eligible to participate, including 28 nephrolithiasis patients (NL), 40 non-stone-forming volunteers (V), 45 nephrolithiasis descendants (ND), and 33 volunteer descendants (VD).

The 24-h urine collection

The participants were asked to collect their whole urine in a disposable sterile plastic vehicle. Participants were asked to void their first urine at 8.00 AM and then collect whole urine through to 8.00 AM of the next day. Thymol was used as a

preservative. The volume and urine pH was measured, and a urine strip was tested within 2 h. The sample was incubated in ice during transport and kept in a -80°C freezer.

Urinary electrolyte, protein and albumin excretion rate, and antioxidant status

Urinary pH was measured by a pH meter (Mettler Toledo, Ohio, USA) within 2 h after a complete 24-h of urine was collected. Urine creatinine was measured by an enzymatic colorimetric method (COBAS INTEGRA 400, Roche Diagnostic, and Indianapolis, USA). Urinary calcium, magnesium, sodium, potassium, chloride, and phosphate were measured by inductively coupled a plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) method (OPTIMA™ 2100DV, Perkin-Elmer, USA).

Urinary citrate and oxalate were measured by high-performance capillary electrophoresis (P/ACET™ MDQ, Beckman Coulter, USA). In brief, 1 ml of urine sample was passed into a 75- μm diameter silica capillary coated with mixed 40 mM borate 10 ml, 100 mM phosphate 5 ml, and 0.5 mM tetradecyl-trimethyl-ammonium bromide (TTAB) 2.5 ml buffer, with an adjustment to pH 3.0. This measurement was done under a -15 kV electric voltage, at a 25°C room temperature and ultraviolet light at a wavelength of 195 nm.

Urinary sulfate and uric acid were measured by a colorimetric method. Sulfate was measured by adding 200 μl urine into 100 μl trichloroacetic acid and centrifuged to remove any precipitation. The supernatant was mixed with a working reagent (an acidic barium chloride solution with sodium carbonate solution) for 10 min, then measuring the absorbance at a 600-nm wavelength. Urinary uric acid levels were determined by mixing 20 μl of urine and 2 ml of phosphotungstic acid for 15 min, adding 2 ml of 10% sodium carbonate and incubating at room temperature for 15 min. The absorbance detection was performed at a 660 nm wavelength.

Since there was some variation in age for each group, urinary elements were reported as excretion rate per body surface area per day. Terms used to describe abnormal urinary excretion rates in the present study were shown in Table 1. Terms were divided into adults and children below 18 years old, since the urinary excretion of elements varied between ages [18–21]. The terminology of abnormal urinary electrolyte excretion was described in Table 1 [22].

Urinary total antioxidant status (TAS) was measured by 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) method. In brief, 20 μl of urine was mixed with ABTS 980 μl , and incubated in the dark at a 37°C temperature for 10 min. Spectrophotometric results were obtained by detecting the absorbance at a 734 nm wavelength, reported as a percentage of the standard vitamin C curve.

Urinary supersaturation indices

We used two indices to determine urinary supersaturation (USS). Tiselius equation for calcium oxalate stone (Tiselius AP(CaOx)) developed by Arne Tiselius was commonly used to evaluate the risk of CaOx stone formation, which was calculated by the following Eq. [23];

$$\begin{aligned} \text{Tiselius AP(CaOx) index} = & 1.9 \times \text{Ca}^{0.84} \times \text{Ox} \\ & \times \text{Mg}^{-0.12} \times \text{Cit}^{0.22} \\ & \times \text{volume}^{-1.03} \end{aligned}$$

The other equation was the Ogawa index, which was modified from the EQUIL2 program. An Ogawa index can be calculated by the following equation [24];

$$\begin{aligned} \text{Ogawa index} = & 1.496 \times (\text{Ca}/\text{volume})^{0.78} \\ & \times (\text{Ox}/\text{volume})^{0.91} \\ & \times (\text{Cit}/\text{volume})^{-0.17} \\ & \times (\text{Mg}/\text{volume})^{-0.3} \end{aligned}$$

In addition, we used data binning to determine the cutoff point of high urinary supersaturation or nephrolithiasis level of supersaturation indices between the NL and V groups. These cutoff values would be studied for sensitivity, specificity, predictive values, and odds ratio. The nephrolithiasis levels will be used to identify children at risk.

Subsequently, we performed a correlation analysis between the urinary supersaturation Tiselius index and the urinary excretion rate of protein, albumin and minerals. These were compared between stone-forming family members and non-stone-forming counterparts to identify associated factors with urinary supersaturation in each family.

Statistical analyses

Continuous variables were expressed as mean and standard deviation and categorical variables as frequencies and percentage. All data was analyzed by SPSS v 16.0 (IBM, USA). Variables were analyzed with a student *t* test or ANOVA and Bonferrini post-hoc analysis for data greater than two groups. Categorical variables were analyzed with a chi-square test. Data binning was used to identify the cutoff value for urinary supersaturation indices between nephrolithiasis patients and controls. A bivariate correlation analysis was performed to investigate associated factors with supersaturation index. Statistical significance was determined as *p* value < 0.05 .

Table 1 Terminology of abnormal urinary excretion of minerals associated with nephrolithiasis

	Adult (age ≥ 18 years old)	Pediatric (age < 18 year old)
Stone promoting factors		
Hypercalciuria	≥ 4 mg/kg/day	≥ 4 mg/kg/day
Hyperoxaluria	≥ 45 mg/1.73 m ² /day	≥ 45 mg/1.73 m ² /day
Hyperphosphaturia	≥ 1100 mg/day	≥ 1.47 mg/mg creatinine
Hyperuricosuria	≥ 700 mg/day	≥ 0.76 mg/mg creatinine
Stone-inhibiting factors		
Hypocitraturia	≤ 365 mg/1.73 m ² /day (male) ≤ 310 mg/1.73 m ² /day (female)	≤ 365 mg/1.73m ² /day (male) ≤ 310 mg/1.73m ² /day (female)
Hypomagnesiuria	≤ 0.8 mg/kg/day	≤ 0.8 mg/kg/day
Protein and albumin excretion		
Proteinuria	≥ 150 mg/day	≥ 100 mg/m ² /day
Albuminuria	≥ 30 mg/day	≥ 30 mg/day

Results

Baseline data

All of the participant baseline characteristics are presented in Table 2. The average age of parental groups was between 44 and 46 years old, while in the descendant groups was 19 to 20 years old. There was no difference in gender, age, body mass index, smoking, alcohol consumption and underlying conditions between each parental and descendant group. About one-quarter of parents were smokers and consumed alcohol, while approximate 20% of them had one or more underlying conditions such as diabetes mellitus, hypertension or hyperlipidemia. On the other hand, fewer numbers in the descendant groups were smokers or drinkers, and none of them had any underlying chronic diseases.

Urinary characteristics and the excretion rate of protein and albumin

The 24-h urine characteristics are indicated in Table 3. Urine volume was higher in adults than in descendant groups. Urinary pH was not markedly different between each group. The excretion rates of urinary creatinine, protein, and albumin were markedly elevated in nephrolithiasis patients compared with the control. Similarly, ND had a higher albumin excretion rate than VD groups, even though their excretion was within the normal range (< 30 mg/day).

Urinary excretion rate of electrolytes

NL participants had higher urinary calcium, oxalate, and phosphate, but lower urinary citrate excretion than the volunteers (Table 3). Higher urinary calcium and phosphate excretion but

Table 2 Demographic data of subjects in the present study. Data was expressed in mean $\pm$ SD

Baseline characteristics	NL	V	<i>p</i> value	ND	VD	<i>p</i> value
<i>n</i>	28	40		45	33	
Gender (% male)	64.3%	52.5%	0.171	48.9%	45.5%	0.764
Age (years)	46.1 $\pm$ 9.8 (32–69)	44.6 $\pm$ 9.2 (26–62)	0.520	19.1 $\pm$ 7.9 (9–28)	20.2 $\pm$ 7.5 (7–30)	0.547
Height (cm)	158.4 $\pm$ 7.7	157.9 $\pm$ 6.8	0.797	157.9 $\pm$ 12.3	157.1 $\pm$ 13.2	0.773
Weight (kg)	60.6 $\pm$ 10.0	60.9 $\pm$ 8.9	0.875	49.8 $\pm$ 13.9	51.9 $\pm$ 12.9	0.484
Body mass index (kg/m ²)	24.1 $\pm$ 3.6	24.5 $\pm$ 3.8	0.676	19.6 $\pm$ 3.8	20.8 $\pm$ 3.7	0.181
Waist circumference (cm)	79.0 $\pm$ 7.0	81.6 $\pm$ 11.6	0.284	70.4 $\pm$ 10.7	73.5 $\pm$ 10.5	0.206
Smoking (%)	21.4%	25.0%	0.733	13.3%	12.1%	0.874
Underlying disease						
Diabetes mellitus (%)	17.9%	12.5%	0.539	0.0%	0.0%	N/A
Hypertension (%)	14.3%	17.5%	0.723	0.0%	0.0%	N/A
Hyperlipidemia (%)	7.1%	2.5%	0.359	0.0%	0.0%	N/A

NL nephrolithiasis, V volunteer, ND nephrolithiasis descendant, VD volunteer descendant, N/A data not available

Table 3 Urinary pH and the excretion rates of protein, albumin, and minerals. Data was expressed in median (interquartile range)

	NL	V	ND	VD
<i>n</i>	28	40	45	33
Volume (liters/day)	1.75 (0.97–2.01)	0.90 (0.59–1.23)*	1.79 (1.01–2.08)	0.89 (0.58–1.39)*
Urine pH	6.5 (6.0–7.0)	6.03± 0.65*	6.78 ± 0.90	6.46 ± 0.91
Urinary protein and albumin excretion rate				
Protein (mg/day)	258.2 (86.2–504.7)	59.1 (28.0–86.2)*	23.0 (13.4–45.5)*	20.4 (10.7–38.4)* [#]
Albumin (mg/day)	84.5 (10.2–287.5)	0.52 (0.01–4.13)*	0.0 (0.0–1.25)*	0.0 (0.0–0.38)* [#]
Excretion rate of urinary electrolytes				
Calcium (mg/kg/day)	1.3 (0.6–3.5)	1.0 (0.5–1.7)*	1.2 (0.9–1.8)*	0.4 (0.2–0.6)* [#]
Oxalate (mg/1.73 m ² /day)	42.3 (26.0–66.8)	8.9 (6.6–22.5)*	10.3 (6.1–16.7)*	9.5 (7.2–15.6)*
Citrate (mg/1.73 m ² /day)	57.8 (30–90)	127.8 (61–184)*	124.3 (93–231)*	167 (77–360)* [#]
Magnesium (mg/kg/day)	0.73 (0.25–1.38)	1.07 (0.71–1.36)	0.96 (0.59–1.42)	1.09 (0.67–1.6)
Sodium (g/1.73 m ² /day)	2.18 (1.56–3.19)	2.63 (1.67–3.68)	2.18 (1.63–2.83)	2.33 (1.69–2.81)
Potassium (g/1.73 m ² /day)	1.03 (0.74–1.39)	0.90 (0.67–1.30)	1.12 (0.89–1.45)	1.15 (0.68–1.58)
Chloride (g/1.73 m ² /day)	4.07 (2.62–5.90)	4.25 (2.41–5.48)	2.93 (2.33–4.32)	3.62 (2.23–5.49)
Phosphate (mg/1.73 m ² /day)	315 (250–441)	274 (194–387)*	178 (125–262)*	122.5 (95–177)* [#]
Sulfate (g/1.73 m ² /day)	1.03 (0.44–1.52)	0.81 (0.51–1.40)	1.12 (0.78–1.67)	0.98 (0.82–1.82)
Uric acid (mg/1.73 m ² /day)	375 (266–532)	255 (179–368)	396 (276–518)	333.7 (247–450)
Urinary total antioxidant status	0.67 (0.46–0.80)	0.59 (0.47–0.79)	0.63 (0.50–0.79)	0.70 (0.51–0.95)

NL nephrolithiasis, ND nephrolithiasis descendant, V volunteer, VD volunteer descendant

**p* < 0.05 compared with NL; [#]*p* < 0.05 compared with ND; ^{\$}*p* < 0.05 compared with V

lower urinary citrate excretion were similarly observed in nephrolithiasis descendants comparing with volunteer descendants. The urinary total antioxidant status was not distinguished between each group.

Regarding abnormal urinary excretion, we found that nephrolithiasis patients had a higher prevalence of hypercalciuria, hyperoxaluria, hypocitraturia, proteinuria, and albuminuria than the normal population. Likewise, hypocitraturia was more common in ND than their healthy counterparts, while hyperoxaluria and proteinuria tended to be increased in ND as well (Table 4).

There was no significant difference between urinary excretion of magnesium, sodium, potassium, chloride, sulfate, and uric acid among each group.

Urinary total antioxidant status

In the present study, we could not observe the difference of urinary total antioxidant status between each group.

Urinary supersaturation indices

For urinary supersaturation calculated by Tiselius equation and Ogawa index (Table 5), NL subjects had noticeably higher supersaturation than V. Similarly, the supersaturation of the ND group was higher than VD. Data binning was performed to determine the cutoff point between nephrolithiasis and the normal USS level (Table 6). The Tiselius AP(CaOx) equation

cutoff was 0.16 (sensitivity 89.29%, specificity 77.50%, accuracy 82.35%, positive predictive value: PPV 73.53% and negative predictive value: NPV 91.18%), with an adjusted odds ratio (OR) of 28.70 (7.0–117.4). On the other hand, the Ogawa index cutoff was 9.49×10^{-5} (sensitivity 74.19%, specificity 86.49%, accuracy 80.88%, PPV 82.14%, and NPV 80.00%), with an adjusted OR of 18.40 (5.3–63.5). Regarding the nephrolithiasis level of USS in descendant groups, none of the VD subjects had a urinary supersaturation index higher than the cutoffs, while 8 out of the 45 (17.8%) ND urine supersaturation exceeded the nephrolithiasis limit in the Tiselius and 11 out of 45 (24.4%) in

Table 4 Prevalence of urinary metabolic disorders in 24-h urine

	NL	V	ND	VD
<i>n</i>	28	40	45	33
Stone promoting factors				
Hypercalciuria	10.7%	0.0%*	7.5%	0.0%*
Hyperoxaluria	42.9%	11.1%*	2.5%*	6.1%*
Hyperuricosuria	3.6%	2.5%	2.2%	9.1%
Hypocitraturia	96.4%	93.3%	85.0%	72.7%* [#]
	75.0%	33.3%	45.0%	30.3%
Hypomagnesiuria				
Protein excretion				
Proteinuria	67.9%	2.5%*	6.7%*	0.0%*
Albuminuria	67.9%	0.0%*	4.4%*	0.0%*

NL nephrolithiasis, V volunteer, ND nephrolithiasis descendant, VD volunteer descendant, N/A data not available

**p* < 0.05 compared with NL, [#]*p* < 0.05 compared with ND

Table 5 Urinary supersaturation obtained from 24-h urine

Urinary supersaturation	NL	V	<i>p</i> value	ND	VD	<i>p</i> value
<i>n</i>	28	40		45	33	
Tiselius AP(CaOx)	0.57 ± 0.54	0.16 ± 0.19	< 0.001	0.15 ± 0.18	0.05 ± 0.02	0.002
10 ⁵ × Ogawa index	25.7 ± 24.4	8.3 ± 9.6	0.001	9.5 ± 12.2	2.9 ± 1.3	0.002

NL nephrolithiasis, V volunteer, ND nephrolithiasis descendant, VD volunteer descendant, CaOx calcium oxalate

the Ogawa indices. Our results demonstrate that nephrolithiasis descendants had a significantly increased prevalence of high urinary supersaturation than the healthy controls.

Correlation between urinary supersaturation and urinary excretion rate

A correlation analysis between the Tiselius supersaturation index and urinary excretion rate of protein, albumin, and minerals was performed in the nephrolithiasis family members. We found that Tiselius index was strongly correlated with a urinary excretion of daily protein and albumin excretion ($r = 0.571$, $p < 0.001$, and $r = 0.433$, $p < 0.001$, respectively) (Fig. 1a, b). There was no correlation between the Tiselius index and urinary excretion rate of protein, albumin, nor electrolytes in the non-stone-forming family members (Fig. 1c, d).

Discussion

Our results indicate that nephrolithiasis descendants bear some anomalies that causes urinary metabolic disorders associated with renal stone disease. Moreover, these abnormalities were likely observed in their predecessors. Even though urinary metabolic profiles in the NL subjects were the most eccentric, their descendants appeared to have slightly unusual levels. The present study clearly demonstrates that ND subjects had a higher urinary excretion rate for calcium, phosphate, and albumin, but lower a citrate excretion than the VD subjects. Increased urinary calcium and albumin excretion are consistent with some previous research [25, 26].

Hypercalciuria is the most common risk of nephrolithiasis. Calcium excretion rate in parental subjects higher than their

corresponding child could be explained by an increased bone turnover rate and negative calcium balance in adults [27, 28]. Our study revealed a high variation of the calcium excretion level in the nephrolithiasis descendants, but not significantly higher than volunteer descendants. This might be explained by the nephrolithiasis descendants were including both children and adolescent subjects in pubertal period. A previously report demonstrated that the positive calcium deposit in bone during puberty caused the decrease in urinary calcium excretion, and temporary normalize the hypercalciuria. This phenomenon is commonly seen in girls at 11–12 years old and boys at 13–14 years-old [29].

An elevation of urinary phosphate excretion was observed in nephrolithiasis family members in the present study. Hyperphosphaturia could be caused by several etiologies, including phosphate intake, gastrointestinal absorption, and the rate of phosphate reabsorption which is dependent on the abundance of phosphate cotransporters, hormone regulation and dietary factors [30]. Our study was limited to identifying the causes of a high urinary excretion rate of phosphate in stone-forming families. However, since we observed the elevation of both calcium and phosphate wasting, the anomalies might be associated with a vitamin D dysfunction, renal intracellular acidosis or fibroblast growth factor-23 (FGF-23) deficiency. Further studies should be conducted to investigate this pathophysiology.

Although hypercalciuria most likely correlates with stone formation in Western population, but in Thailand and some other Asian countries, hypocitraturia is the leading factor [31–33]. Causes of the very high prevalence of hypocitraturia in Thai people are believed to be a low citrate intake and an increased urinary citrate reabsorption from chronic metabolic acidosis, which may be caused by endemic incomplete renal

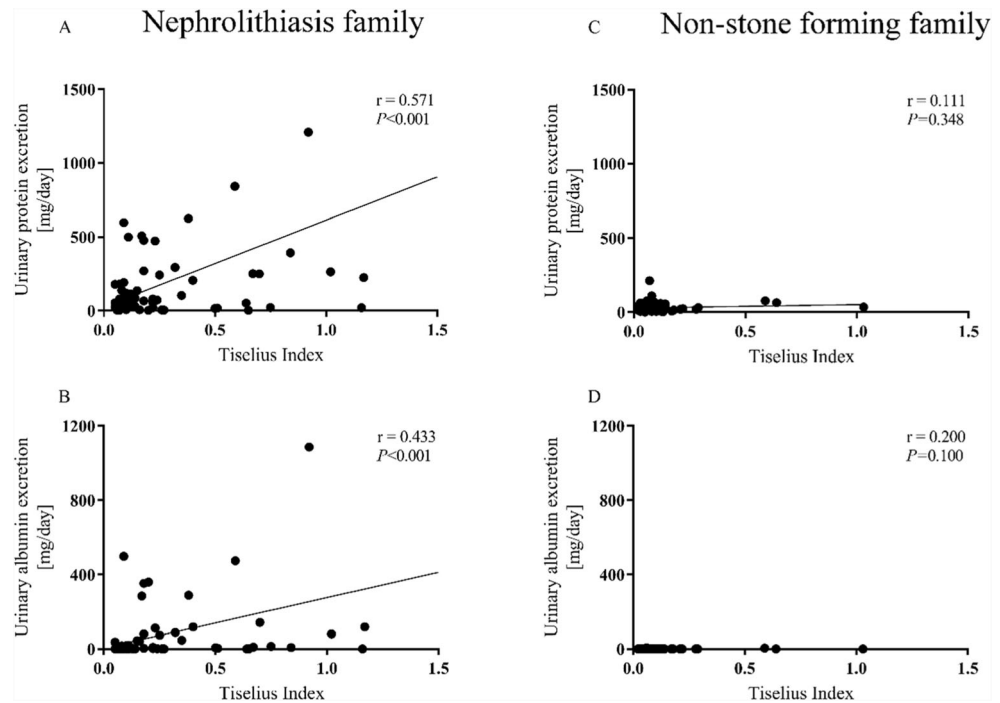
Table 6 Percentage of participants with urinary supersaturation higher than nephrolithiasis level

	NL	V	<i>p</i> value	ND	VD	<i>p</i> value
	28	40		45	33	
Tiselius AP(CaOx) > 0.16	89.3%	22.5%	< 0.001	17.8%	0.0%	0.011
	Adjusted OR 28.70 (7.0–117.4)			Adjusted OR unavailable		
Ogawa index > 9.49×10^{-5}	82.1%	20.0%	< 0.001	24.4%	0.0%	0.002
	Adjusted OR 18.40 (5.3–63.5)			Adjusted OR unavailable		

Nephrolithiasis level for Tiselius AP(CaOx) was > 0.16, and Ogawa index was > 9.49×10^{-5}

NL nephrolithiasis, V volunteer, ND nephrolithiasis descendant, VD volunteer descendant

Fig. 1 Correlation between Tiselius index and excretion rate of **a** urinary protein in nephrolithiasis family, **b** urinary albumin in nephrolithiasis family, **c** urinary protein in healthy family, and **d** urinary albumin in healthy family members



tubular acidosis. Metabolic acidosis promotes citrate reabsorption and breakdown. Evidence demonstrates that in acidic urine, citrate turns into a dicarboxylate form which is enhanced in binding and reabsorbed by sodium-dicarboxylate cotransporter type 1 (NaDC-1) of the proximal tubular cells [34–36]. Our previous study shows that NaDC-1 expression of HK-2 cell is increased in acidic media [25]. While urinary acidification enhances citrate reabsorption, intracellular acidosis increases citrate utilization by activation of the ATP citrate lyase enzyme activity to break down citrate [37]. Regarding this, hypocitraturia in nephrolithiasis family members might be the result of genetic disease inherited in stone-forming families, or environmental factors such as a low citrate diet.

The present study is the first to clearly demonstrate that nephrolithiasis descendants had higher urinary supersaturation than the healthy controls. Approximately 20% (17.8 to 24.4%) of the nephrolithiasis descendants had urinary supersaturation indices exceeds nephrolithiasis level, which indicates the high probability of spontaneous urinary crystal formation. Moreover, supersaturation levels corresponded with protein and albumin excretion rate exclusively in stone-forming families. These results suggest that the elevated urinary supersaturation, which was due to increased calcium and decreased citrate excretion in the present study, may cause urinary protein and albumin wasting.

It is well-known that chronic acidosis induces hypercalcemia and hypercalciuria, and recent studies demonstrate that a low serum bicarbonate level which reflected acidemia, correlated with an increased albuminuria level and the progression of chronic kidney disease [38, 39]. However, it was not possible to demonstrate the difference in serum bicarbonate (data

not showed) or urinary pH among the nephrolithiasis and volunteer groups in the present study.

This study indicates that nephrolithiasis family members were characterized by hypercalciuria, hyperphosphaturia, hypocitraturia, and elevated urinary protein and albumin excretion. According this, it was hypothesized that the nephrolithiasis family members might have unidentified proximal tubular conditions which affect calcium, phosphate, citrate, protein, and albumin reabsorption. This could be an intrinsic or extrinsic cause since the present study cannot completely exclude the extrinsic effects. There is always a possibility that the parents and their children shared the same features, such as activity level, diet, environment hazards or certain infectious diseases, but the chance of having inherited nephrolithiasis cannot be completely ruled out.

A limitation of this study was that it was not possible to eliminate the chances of the nephrolithiasis descendants and the controls having undiagnosed kidney stone disease. No abdominal ultrasonography or computed tomography scan was performed. Researchers did not investigate genetic or other metabolic diseases associated with nephrolithiasis such as inflammatory bowel disease, malabsorption syndrome, idiopathic hypercalciuria, or familial hyperoxaluria. It was not possible to control extrinsic factors such as diet and lifestyle, which strongly affect the urinary excretion of minerals. This study did not repeat the 24-h urine collection, which could be varied without dietary controls. Finally, urinary supersaturation indices were not the best parameters to evaluate the risk of stone formation, since the equation did not concern other factors promoting stone formation such as urine pH, other proteins and glycoconjugates.

Conclusion

The nephrolithiasis family members, including non-stone-forming members, had a higher urinary excretion of calcium, phosphate, protein, and albumin, as well as lower urinary citrate excretion and higher urinary supersaturation indices compared with the general population. Immediate family members of stone-forming patients were at risk for nephrolithiasis, especially as about 20% of nephrolithiasis children had nephrolithiasis levels of urinary supersaturation. Furthermore, urinary saturation index corresponded with urinary protein and albumin wasting only in stone-forming families. Some intrinsic or extrinsic disease that causes proximal tubular dysfunction might be a trait of familial nephrolithiasis.

Acknowledgements We would like to thank Assistant Professor Dr. Thavorn Supaprom and Assistant Professor Dr. Kaew Udomsirichakorn from the Department of Science, Ubon Ratchathani University, and Mrs. Darunee Boonthong and Mrs. Tasanee Klinhom, nurses from the Division of Urology, Department of Surgery, Sunpasitthiprasong Hospital, as well as Yang Bowei, a graduate student from the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for assisting in subject enrollment, follow-up and sample delivery. We have deep gratitude for all the subjects in this study for their participation, as well as Assistant Professor Dr. Phisit Prapunwattana, Head of the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the staff from our Department and the Research Affair of the Faculty of Chulalongkorn University for their assistance. Finally, we would like to thank Professor Yoshihide Ogawa for his kind recommendation about the investigation of urinary supersaturation.

Funding Financial support for this study was granted by The Thailand Research Fund and the 90th anniversary of Chulalongkorn University fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

Compliance with ethical standards

Ethical approval All procedures performed in the present study involving human participation were approved by the Ethics Committee for Research in Human Subjects in the Fields of Thai Traditional and Alternative Medicine, and by Ethics committee of Sunpasitthiprasong Hospital. Written consent or assent was obtained from all participants after a detailed explanation of the procedures involved. In addition, parental approval was obtained at the same time for all descendant subjects.

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Tefekli A, Esen T, Ziylan O, Erol B, Armagan A, Ander H, Akinci M (2003) Metabolic risk factors in pediatric and adult calcium oxalate urinary stone formers: is there any difference? *Urol Int* 70(4):273–277
- Wong Y, Cook P, Roderick P, Somani BK (2016) Metabolic syndrome and kidney stone disease: a systematic review of literature. *J Endourol* 30(3):246–253
- Trinchieri A (2005) Bone mineral content in calcium renal stone formers. *Urol Res* 33(4):247–253
- West B, Luke A, Durazo-Arvizu RA, Cao G, Shoham D, Kramer H (2008) Metabolic syndrome and self-reported history of kidney stones: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) 1988–1994. *Am J Kidney Dis* 51(5):741–747
- Brikowski TH, Lotan Y, Pearle MS (2008) Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(28):9841–9846
- Ratkalkar VN, Kleinman JG (2011) Mechanisms of stone formation. *Clin Rev Bone Miner Metab* 9(3–4):187–197
- Edvardsson VO, Palsson R, Indridason OS, Thorvaldsson S, Stefansson K (2009) Familiality of kidney stone disease in Iceland. *Scand J Urol Nephrol* 43(5):420–424
- Ertan P, Tekin G, Oger N, Alkan S, Horasan GD (2011) Metabolic and demographic characteristics of children with urolithiasis in Western Turkey. *Urol Res* 39(2):105–110
- Marickar YM, Salim A, Vijay A (2009) Pattern of family history in stone patients. *Urol Res* 37(6):331–335
- Sritippayawan S, Borvornpadungkiti S, Paemane A, Predanon C, Susaengrat W, Chuawattana D, Sawasdee N, Nakjang S, Pongtepadiet S, Nettuwakul C, Rungroj N, Vasuvattakul S, Malasit P, Yenchitsomanus PT (2009) Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urol Res* 37(3):141–146
- Bergsland KJ, Coe FL, White MD, Erhard MJ, DeFoor WR, Mahan JD, Schwaderer AL, Asplin JR (2012) Urine risk factors in children with calcium kidney stones and their siblings. *Kidney Int* 81(11):1140–1148
- Saez-Torres C, Grases F, Rodrigo D, Garcia-Raja AM, Gomez C, Frontera G (2013) Risk factors for urinary stones in healthy schoolchildren with and without a family history of nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol* 28(4):639–645
- Park C, Ha YS, Kim YJ, Yun SJ, Lee SC, Kim WJ (2010) Comparison of metabolic risk factors in urolithiasis patients according to family history. *Korean J Urol* 51(1):50–53
- Kinder JM, Clark CD, Coe BJ, Asplin JR, Parks JH, Coe FL (2002) Urinary stone risk factors in the siblings of patients with calcium renal stones. *J Urol* 167(5):1965–1967
- Bergsland KJ, Kelly JK, Coe BJ, Coe FL (2006) Urine protein markers distinguish stone-forming from non-stone-forming relatives of calcium stone formers. *Am J Physiol Renal Physiol* 291(3):F530–F536
- Koyuncu HH, Yencilek F, Eryildirim B, Sarica K (2010) Family history in stone disease: how important is it for the onset of the disease and the incidence of recurrence? *Urol Res* 38(2):105–109
- Remer T, Neubert A, Maser-Gluth C (2002) Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research. *Am J Clin Nutr* 75(3):561–569
- Saez-Torres C, Rodrigo D, Grases F, Garcia-Raja AM, Gomez C, Lumbrales J, Frontera G (2014) Urinary excretion of calcium, magnesium, phosphate, citrate, oxalate, and uric acid by healthy schoolchildren using a 12-h collection protocol. *Pediatr Nephrol* 29(7):1201–1208
- Ariceta G (2011) Clinical practice: proteinuria. *Eur J Pediatr* 170(1):15–20
- Kirejczyk JK, Porowski T, Konstantynowicz J, Kozerska A, Nazarkiewicz A, Hoppe B, Wasilewska A (2014) Urinary citrate excretion in healthy children depends on age and gender. *Pediatr Nephrol* 29(9):1575–1582
- Koyun M, Guven AG, Filiz S, Akman S, Akbas H, Baysal YE, Dedeoglu N (2007) Screening for hypercalciuria in schoolchildren: what should be the criteria for diagnosis? *Pediatr Nephrol* 22(9):1297–1301

22. Hoppe B, Kemper MJ (2010) Diagnostic examination of the child with urolithiasis or nephrocalcinosis. *Pediatr Nephrol* 25(3):403–413
23. Tiselius HG (1991) Aspects on estimation of the risk of calcium oxalate crystallization in urine. *Urol Int* 47(4):255–259
24. Ogawa Y, Hatano T (1996) Comparison of the Equil2 program and other methods for estimating the ion-activity product of urinary calcium oxalate: a new simplified method is proposed. *Int J Urol* 3(5):383–385
25. Chuaypen N, Boonla C, Dissayabutra T, Predanon C, Ruangvejvorachai P, Waiwijit U, Tosukhowong P (2013) Increased intrarenal expression of sodium-dicarboxylate cotransporter-1 in nephrolithiasis patients with acidic urine pH. *Asian Biomedicine* 7(4):571–577
26. DeFoor W, Asplin J, Jackson E, Jackson C, Reddy P, Sheldon C, Erhard M, Minevich E (2006) Urinary metabolic evaluations in normal and stone forming children. *J Urol* 176(4 Pt 2):1793–1796
27. Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B (2012) Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *J Clin Endocrinol Metab* 97(6):1847–1860
28. Arrabal-Polo MA, Arrabal-Martin M, Giron-Prieto MS, Poyatos-Andujar A, Garrido-Gomez J, Zuluaga-Gomez A, Arias-Santiago S (2012) Osteopenia/osteoporosis in patients with calcium nephrolithiasis. *Urol Res* 40(6):709–716
29. Manz F, Kehrt R, Lausen B, Merkel A (1999) Urinary calcium excretion in healthy children and adolescents. *Pediatr Nephrol* 13(9):894–899
30. Blaine J, Chonchol M, Levi M (2015) Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10(7):1257–1272
31. Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, Ratchanon S, Chaisawasdi S, Boonla C, Tungsanga K (2008) Citraturic, alkalizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. *Urol Res* 36(3–4):149–155
32. Stitchantrakul W, Kochakarn W, Ruangraksa C, Domrongkitchaiporn S (2007) Urinary risk factors for recurrent calcium stone formation in Thai stone formers. *J Med Assoc Thai* 90(4):688–698
33. Nakagawa Y, Carvalho M, Malasit P, Nimmannit S, Sritippaywan S, Vasuvattakul S, Chutipongtanate S, Chaowagul V, Nilwarangkur S (2004) Kidney stone inhibitors in patients with renal stones and endemic renal tubular acidosis in northeast Thailand. *Urol Res* 32(2):112–116
34. Domrongkitchaiporn S, Stitchantrakul W, Kochakarn W (2006) Causes of hypocitraturia in recurrent calcium stone formers: focusing on urinary potassium excretion. *Am J Kidney Dis* 48(4):546–554
35. Rudman D, Kutner MH, Redd SC 2nd, Waters WC, Gerron GG, Bleier J (1982) Hypocitraturia in calcium nephrolithiasis. *J Clin Endocrinol Metab* 55(6):1052–1057
36. Zuckerman JM, Assimos DG (2009) Hypocitraturia: pathophysiology and medical management. *Rev Urol* 11(3):134–144
37. Tosukhowong P, Borvonpadungkitti S, Prasongwatana V, Tungsanga K, Jutuporn S, Dissayabutra T, Reungjui S, Sriboonlue P (2002) Urinary citrate excretion in patients with renal stone: roles of leucocyte ATP citrate lyase activity and potassium salts therapy. *Clin Chim Acta* 325(1–2):71–78
38. Lee YJ, Cho S, Kim SR (2014) Association between serum bicarbonate levels and albuminuria in stage 3 and stage 4 chronic kidney disease: a cross-sectional study. *Clin Nephrol* 81(6):405–410
39. Driver TH, Shlipak MG, Katz R, Goldenstein L, Sarnak MJ, Hoofnagle AN, Siscovick DS, Kestenbaum B, de Boer IH, Ix JH (2014) Low serum bicarbonate and kidney function decline: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Kidney Dis* 64(4):534–541