นิพนธ์ต้นฉบับ

Increased Circulating Calprotectin and Renal Impairment in Patients with Kidney Stones.

Anuthep Burami[1] M.D., Wattanachai Ungjaroenwathana[2] M.D., Chanchai Boonla[3] M.D., Supoj Ratchanon[1] M.D., Wanwisa Mahakobut[3] M.D., Piyaratana Tosukhowong[3] M.D.

Abstract

Background: Diagnosis of kidney stone relies on clinical imaging and manifestation of flank pain or gross hematuria or urinary tract infection. To date, there is no reliable biomarker for screening or diagnosing of kidney stone. Calprotectin, an inflammatory protein produced by activated leukocytes, is present in the matrix of stones and has been suggested to play an important role in stone formation. Increased plasma calprotectin is reported in various inflammatory-mediated disorders. We investigated whether plasma calprotectin was increased in patients with kidney calculi. Its clinical usefulness is also evaluated.

Methods: A total of 190 subjects divided into kidney stone (n=103) and healthy control (n=87) groups were recruited for the study, a cross-sectional study. Blood and spot urine samples of the patients were collected preoperatively. Plasma calprotectin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Plasma creatinine and eGFR were also measured.

Result: Concentration of plasma calprotectin in kidney stone patients was significantly higher than that in controls. Likewise, urinary calprotectin of the patient group was significantly greater than the control. Positive correlation between plasma and urinary calprotectin was observed. Overall renal function of kidney stone patients was impaired, as indicated by increased plasma creatinine and decreased eGFR. Plasma creatinine was positively, while eGFR was negatively, correlated with plasma calprotectin. ROC analysis of plasma calprotectin revealed an area under curve of 0.739 (95%CI; 0.663-0.815). At 430 ng/ml cutoff, the test imparted sensitivity and specificity of 84% and 50%, respectively.

Conclusion: This study reports for the first time that circulating calprotectin in patients with renal calculi is elevated compared to healthy population. Additionally, elevated plasma calprotectin is associated with worse renal function. We hypothesize that increased plasma calprotectin in the patients might be due to inflammatory reaction in the stone-forming kidneys. Our data suggest that plasma calprotectin could be used as an adjunct marker for diagnosing kidney stone and assessing renal impairment.

Departments of [1] Surgery and [3] Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[2] Division of Urological Surgery, Sappasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani 34000

การเพิ่มขึ้นของโปรตีนคาลโปรเทคตินในเลือดและการเสื่อมของไตในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

อนุเทพ บูรมิ[1] พ.บ., วัฒนชัย อึ้งเจริญวัฒนา[2] พ.บ.,
ชาญชัย บุญหล้า[3] พ.บ., สุพจน์ รัชชานนท์[1] พ.บ.,
วันวิสา มหาโคบุตร[3] พ.บ., ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์[3] พ.บ.

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: การวินิจฉัยผู้ป่วยโรคนิ่วไตอาศัยอาการทางคลินิกคือปวดหลัง ปวดเอว ภาวะปัสสาวะมีเม็ดเลือดแดงหรือการติดเชื้อในระบบปัสสาวะ ร่วมกับภาพถ่ายรังสี ปัจจุบันยังไม่มีตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับการตรวจกรองหรือการวินิจฉัยโรคนิ่วไต คาลโปรเทคตินเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบถูกสร้างโดยเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้น มีรายงานพบคาลโปรเทคตินในแมทริกซ์ของก้อนนิ่วจึงเชื่อว่าน่าจะมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการเกิดนิ่ว หลายรายงานวิจัยพบระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมาสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต รวมทั้งประเมินประโยชน์ทางคลินิกของการตรวจวัดคาลโปรเทคติน

วิธีการศึกษา: ศึกษาในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 190 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไต 103 ราย และกลุ่มควบคุมเป็นคนปกติที่มีสุขภาพดี 87 ราย โดยเก็บตัวอย่างเลือด และปัสสาวะช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งก่อนการรักษาทางศัลยกรรม ตรวจวัดระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมา และปัสสาวะโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay และวิเคราะห์ค่าครีเอตินีนในพลาสมาเพื่อประเมินค่าประสิทธิภาพการทำงานของไตและคำนวณค่า estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR)

ผลการทดลอง: ระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมา และปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างคาลโปรเทคตินในพลาสมาและในปัสสาวะ และยังพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วมีประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง โดยมีระดับครีเอตินีนในพลาสมาสูงขณะที่ eGFR ต่ำ ระดับครีเอตินีนในพลาสมามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ eGFR มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมา ผลการวิเคราะห์กราฟ ROC ของคาลโปรเทคตินในพลาสมาพบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.739 (95%CI; 0.663-0.815) และที่ค่า cutoff เท่ากับ 430 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า sensitivity และ specificity เป็น 84% และ 50% ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง: งานการวิจัยนี้เป็นงานแรกที่พบว่าระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมาของผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในคนปกติที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมาสูงยังมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของไตต่ำ คณะวิจัยตั้งสมมุติฐานว่าการเพิ่มขึ้นของคาลโปรเทคตินในพลาสมาของผู้ป่วยโรคนิ่วไตอาจเป็นผลมาจากการอักเสบในไตที่มีนิ่ว ข้อมูลวิจัยนี้ชี้แนะว่าการตรวจวัดระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมาน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้เพิ่มเติมสำหรับการวินิจฉัยโรคนิ่วไตและประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไตได้

[1] *หน่วยศัลยศาสตร์ยูโรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

[2] *หน่วยศัลยศาสตร์ระบบปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี*

[3] *ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

บทนำ

โรคนิ่วไต (nephrolithiasis/ kidney stone/ renal calculi) เป็นโรคที่คุกคามคุณภาพชีวิตของประชากรทั่วโลก และยังคงเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งทางด้านสาธารณสุขของไทย เนื่องจากโรคนิ่วเป็นโรคที่มีอัตราการเกิดนิ่วซ้ำ (recurrence) สูง ผู้ป่วยบางรายเป็นนิ่วซ้ำ 5-6 ครั้งในเวลา 10 ปี [1] จากการศึกษาของ Bovornpadungkitti และคณะ พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 39 ภายในเวลา 2 ปีหลังการรักษา[2] การเกิดนิ่วซ้ำทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไตเสื่อมและภาวะไตวายเรื้อรัง โรคนิ่วไตนอกจากส่งผลกระทบต่อสุขภาพโดยตรงแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อวิถีชีวิตและการประกอบอาชีพ รวมทั้งทำให้สูญเสียงบประมาณในการดูแลรักษาโรคไตเสื่อมด้วยวิธีล้างไตเป็นจำนวนมาก

องค์ประกอบของแร่ธาตุในก้อนนิ่วที่พบในแต่ละประเทศไม่แตกต่างกันมากนัก ในประเทศไทย Tosukhowong และคณะ[3] ศึกษาองค์ประกอบของแร่ธาตุในก้อนนิ่วของผู้ป่วยนิ่วไตจากทุกภาคของประเทศไทย พบว่านิ่วส่วนใหญ่เป็นนิ่วนิ่วเนื้อผสม (ร้อยละ 60) ที่พบมากที่สุดคือ นิ่วผสมระหว่างแคลเซี่ยมออกอซาเลตและแคลเซี่ยมฟอสเฟต และเมื่อแบ่งนิ่วตามชนิดของแร่ธาตุที่พบมากที่สุดในก้อนนิ่วพบว่า นิ่วแคลเซียมออกซาเลตพบมากที่สุด (ร้อยละ 73.8) รองลงมาคือ นิ่วกรดยูริก (ร้อยละ 16) นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต (ร้อยละ 5.5) และนิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (ร้อยละ 4.7) อย่างไรก็ตามก้อนนิ่วไม่ได้ประกอบด้วยแร่ธาตุเพียงอย่างเดียว หลายการศึกษาพบว่ามีสารชีวโมเลกุลหลากหลายชนิดเป็นองค์ประกอบในก้อนนิ่วเรียกว่า stone matrix สารชีวโมเลกุลที่พบและมีการศึกษามากที่สุดคือ โปรตีน ดังนั้นจึงเชื่อว่าสารชีวโมเลกุลโดยเฉพาะโปรตีนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการการเกิดนิ่ว

ปัจจุบันยังไม่มีองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับอธิบายกลไกการเกิดนิ่วที่แท้จริง เนื่องจากไม่สามารถจำลองการเกิดนิ่วในมนุษย์ได้ อย่างไรก็ตามมีความพยายามศึกษาวิจัยหาต้นแบบของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติที่มีผลึกเกิดขึ้นในร่างกายตลอดเวลาและมีระบบการสลายผลึก เช่น ตัวไหมที่กินใบหม่อนเป็นอาหาร จะเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลตปริมาณมาก แต่ตัวไหมสามารถสลายผลึกที่เกิดขึ้นได้โดยไม่เป็นอันตราย[4] ดังนั้น ควรศึกษาและเรียนรู้กลไกเหล่านี้เพื่อหาแนวทางการรักษาและป้องกันการเกิดนิ่ว กลไกการเกิดนิ่วในคนที่ยอมรับในปัจจุบัน เชื่อว่าผลึกนิ่วจะเกิดขึ้นในปัสสาวะที่มีความอิ่มตัวยวดยิ่งของสารก่อนิ่ว เช่น แคลเซียมออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริค เป็นต้น จากนั้นผลึกจะมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์บุท่อไต กระตุ้นการผลิตสารอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์บุท่อไตและเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการทำลายและบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไต ซึ่งจะเป็นแหล่งให้ผลึกเล็กๆ เข้ามาเกาะติดได้ดีขึ้น ทำให้ผลึกติดค้างในท่อไตมากขึ้น ผลึกที่ติดค้างอยู่จะถูกนำเข้าสู่เซลล์บุท่อไตเพื่อย่อยสลายผลึกในไลโซโซม ผลึกบางส่วนจะถูกขนส่งต่อไปยังเนื้อไตเกิดเป็น Randall's plaque ผลึกนิ่วจะกระตุ้นให้เซลล์หลั่งสารไซโตไคน์และเคโมไคน์เพื่อดึงดูดเซลล์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น แมคโครฟาจ เข้ามาจับกินผลึกนิ่ว ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการอักเสบสูงมากขึ้น ส่งเสริมการเจริญของผลึกและก่อตัวเป็น nidus และกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด[5-6] และเมื่อเกิดการอักเสบเรื้อรัง จะกระตุ้นให้เกิดพังผืดในไต (renal fibrosis) ตามมา และส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลงและเสี่ยงต่อภาวะไตวายเรื้อรัง

ผลการศึกษาของ Boonla และคณะ[7] ยืนยันว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นสูงกว่ากลุ่มคนปกติ และระดับความเครียดจากออกซิเดชั่นที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของท่อไตที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย และเมื่อเร็วๆ นี้ Boonla และคณะ[8-9] รายงานว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีประสิทธิภาพการทำงานของไตต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ พบการอักเสบและพังผืดเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และระดับพยาธิสภาพดังกล่าวสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่เสื่อมลง รายงานการศึกษาโปรตีนในก้อนนิ่ว พบว่าโปรตีนที่พบได้บ่อยที่สุดในก้อนนิ่วคือ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น myeloperoxidase, alpha-defensin and calgranulin[10,11] แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่ว และการตรวจวัดโปรตีนเหล่านี้น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ของนิ่วได้ (stone biomarker)

คาลโปรเทคติน (calprotectin) เป็นโปรตีนที่เกิดจากการรวมตัวกัน (heterodimer) ของโปรตีน calgranulin A (S100A8 หรือ MRP8) และ calgranuline B (S100A9 หรือ MRP14) จัดอยู่ในกลุ่ม S100 Family มีขนาด 20-24

kDa มีสมบัติจับกับแคลเซี่ยม (calcium binding protein) คาลโปรเทคตินมีชื่อเรียกอื่น ได้แก่ S100A8/A9, MRP8/14 และ 27E10 antigen คาลโปรเทคตินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ส่วนใหญ่สร้างและหลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophils)[12] และยังพบได้ในโมโนไซต์ (monocytes) แมโครฟาจ (macrophages) และเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells)[13] มีรายงานว่าพบโปรตีน calgranulin ในก้อนนิ่วและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต[14,15] การศึกษาของ Pillay และคณะพบการแสดงออกของ calgranulin ในเนื้อเยื่อไต และ calgranulin ในปัสสาวะมีบทบาทยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซี่ยมออกซาเลต [16] Merchant และคณะ[10] รายงานว่า S100A8 และ S100A9 เป็นโปรตีนที่พบได้บ่อย (high abundant protein) ในก้อนนิ่ว ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าทั้ง S100A8 และ S100A9 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อนิ่ว ในปัจจุบัน S100A8/A9 หรือคาลโปรเทคติน นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะอักเสบ (inflammatory marker)[13] และพบว่าผู้ป่วยโรคที่สัมพันธ์กับการอักเสบมีระดับของคาลโปรเทคตินในพลาสมาของสูงกว่าปกติ[17-21] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวัดระดับของคาลโปรเทคตินในเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อตรวจวัดระดับคาลโปรเทคตินในพลาสมาและปัสสาวะ (plasma and urinary calprotectin) ของผู้ป่วยโรคนิ่วไต วิเคราะห์ความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไต และประเมินประโยชน์ในทางคลินิกของการตรวจวัดคาลโปรเทคติน

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มประชากรตัวอย่างและสารตัวอย่าง

กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 103 ราย โดยเป็นเพศชายหรือเพศหญิง อายุ 18 ปีขึ้นไป ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคนิ่วไตจากข้อมูลภาพถ่ายรังสีเอ็กซ์ (KUB X-ray film) หรือคลื่นเสียงความถี่สูงที่ไต (ultrasonography of kidneys) หรือภาพถ่ายรังสีพร้อมการฉีดสีเข้าเส้นเลือด (intravenous pyelogram) (และ) เข้ารับการผ่าตัดหรือสลายนิ่วในโรงพยาบาลศูนย์สรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ส่วนกลุ่มที่สองคือกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นอาสาสมัครที่อาศัยในจังหวัดอุบลราชธานี และกรุงเทพมหานคร มีอายุและเพศที่ตรงกับกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไต (age and sex matched controls) และไม่มีโรคประจำตัว จำนวน 87 ราย โดยอาสาสมัครได้รับการตรวจคัดกรองโดยตรวจปัสสาวะ (urinalysis) ครีเอตินีนในพลาสมา ตรวจด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงไต และผลการตรวจดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ปกติ

กลุ่มประชากรตัวอย่าง และกลุ่มควบคุม จะได้รับการเก็บสารตัวอย่างเลือดเมื่องดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง (fasting heparinized blood) และเก็บปัสสาวะ ณ เวลาใดเวลาหนึ่งในช่วงเช้า (midstream morning spot urine) โดยนำตัวอย่างเลือดมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บสารตัวอย่างพลาสมา และปัสสาวะที่ -20 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะนำไปวิเคราะห์คาลโปรเทคตินด้วยวิธี ELISA (Hycult® Biotech, Uden, Netherland) วิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีน ตามหลักการของ Jaffe คำนวณค่า estimated glomerular filtration rate (eGFR) ตามสูตร The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation[22] และตรวจวัดระดับ total antioxidant status (TAS) ในปัสสาวะโดย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method[23]

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัยแสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) สำหรับข้อมูลที่กระจายตัวปกติ และแสดงเป็น median และ interquartile range (IQR) สำหรับข้อมูลที่กระจายตัวไม่ปกติ เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดย Student t-test หรือ Mann-Whitney test ตามความเหมาะสมของข้อมูล วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรโดย Spearman's rank correlation test กำหนดนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 103 ราย อายุเฉลี่ย 51.84 $\pm$ 11.86 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 83 ราย (ร้อยละ 80.0) เพศ

หญิง 20 ราย (ร้อยละ 20.0) และกลุ่มควบคุมจำนวน 87 ราย อายุเฉลี่ย 56.83 ± 14.00 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 43 ราย (ร้อยละ 49.1) เพศหญิง 44 ราย (ร้อยละ 50.9) (ตารางที่ 1) ค่าดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.5 ± 3.7 kg/m^2 และในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 23.6 ± 3.3 kg/m^2 อายุและเพศระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเพื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิกระหว่างกลุ่มและลดผล (confounding effect) ของอายุและเพศ คณะวิจัยได้คัดเลือกกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต จำนวน 62 ราย โดยมีอายุเฉลี่ย 55.71 ± 12.69 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 42 ราย (ร้อยละ 67.7) เพศหญิง 20 ราย (ร้อยละ 32.3) อายุเฉลี่ยและสัดส่วนเพศระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุม (age, sex and BMI matched controls) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเป็นนิ่วทึบแสง 102 (ร้อยละ 99) ราย และนิ่วไม่ทึบแสง 1 (ร้อยละ 1) ราย เข้ารับการรักษาด้วยวิธี Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) 78 (ร้อยละ 75.7) ราย Percutaneous Nephrolithotomy (PCNL) 8 (ร้อยละ 7.7) ราย ผ่าตัดเปิด (Opened stone surgery) 16 (ร้อยละ 15.5) ราย และ DJ stent 1 (ร้อยละ 1.1) ราย

ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่า plasma creatinine สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.001) ขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่า eGFR ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.001) (ตารางที่ 1) เช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอายุ เพศ และ BMI ตรงกัน (age, sex and BMI matched controls, n = 62) พบว่าระดับ plasma creatinine ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.005) และค่า eGFR ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.007) (ตารางที่ 1) ข้อมูลวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าภาพรวมของประสิทธิภาพการทำงานของไตในผู้ป่วยโรคนิ่วไตไทยต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

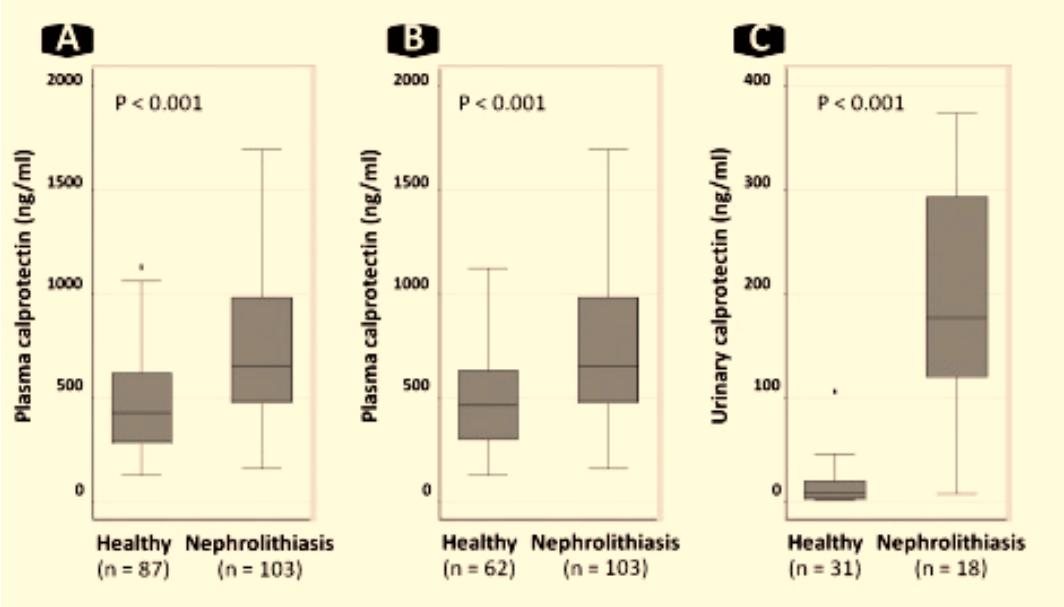
ระดับ plasma calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.001) (รูปที่ 1A) และเมื่อเปรียบเทียบ plasma calprotectin ระหว่างทั้งสองกลุ่มที่มีเพศและอายุตรงกันแล้ว พบว่าระดับ plasma calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (724.34 ± 333.08 vs. 457.63 ± 218.65 ng/ml, P < 0.001) (รูปที่ 1B) และเมื่อวัดระดับ urinary calprotectin พบผลคล้ายคลึงกัน คือ ระดับ urinary calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.001) (รูปที่ 1C) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง plasma calprotectin และ uriinary calprotectin (Spearman's rho = 0.335, P = 0.046)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง plasma calprotectin กับภาวะความเสื่อมของหน้าที่ไตโดยใช้ตัวบ่งชี้ plasma creatinine และ eGFR กับพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง plasma calprotectin กับ plasma creatinine (Spearman's rho = 0.329, P < 0.001) และพบ

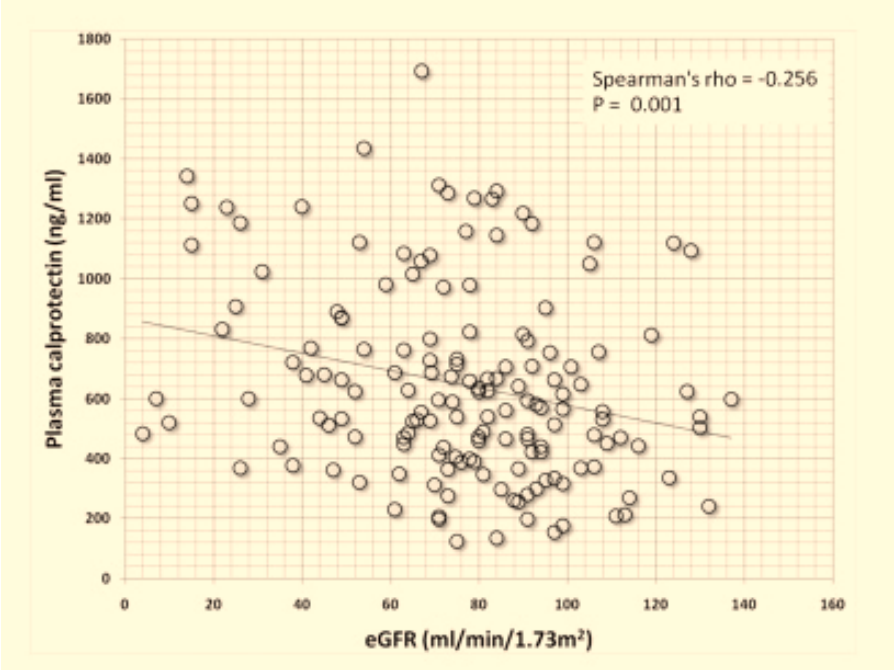
ตารางที่ 1 *ข้อมูลทั่วไปและผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนที่มีสุขภาพดี*

Clinical characteristics	Nephrolithiasis	Healthy controls		P values	
		All	Matched*	All	Matched*
Number of subjects	103	87	62		
Male/Female	83/20	43/44	42/20	<0.001	0.062
Age (years)	51.84 ± 11.86	56.83 ± 14.00	55.71 ± 12.69	0.009	0.050
BMI (kg/m^2)	22.54 ± 3.71	23.56 ± 3.36	23.51 ± 3.51	0.055	0.108
Plasma creatinine (mg/dl)	1.51 ± 1.46	0.87 ± 0.22	0.93 ± 0.22	<0.001	0.005
eGFR (ml/min/1.73 m^2)	71.81 ± 30.67	85.11 ± 17.41	84.41 ± 17.29	0.001	0.007

* age, sex and BMI matched controls



รูปที่ 1 *แสดงระดับ plasma และ urinary calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับกลุ่มควบคุม A: plasma calprotectin ในกลุ่มตัวอย่างประชากรทุกรายที่ศึกษา พบระดับ plasma calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.001) B: plasma calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับ age, sex and BMI matched healthy controls ระดับ plasma calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.001) C: urinary calprotectin เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม 31 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่ว 18 ราย พบว่า urinary calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.001)*



รูปที่ 2 *แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง plasma calprotectin และตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต eGFR พบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง plasma calprotectin กับ eGFR (Spearman's rho = -0.256, P = 0.001)*

ความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง plasma calprotectin กับ eGFR (Spearmanกs rho = -0.256, P = 0.001) (รูปที่ 2)

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานค่าอ้างอิง (cutoff) ของระดับ plasma calprotectin ในคนไทย การศึกษานี้ได้วิเคราะห์ทางสถิติ Receiver operating characteristic (ROC) analysis เพื่อหาค่าอ้างอิงของระดับ plasma calprotectin ที่เหมาะสม และประเมินคุณค่าของการตรวจวัดระดับ plasma calprotectin สำหรับใช้ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจากคนปกติ ผลการวิเคราะห์ ROC curve analysis ของการตรวจวัดระดับ plasma calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (n = 103) และกลุ่มควบคุม (n = 62) ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) เท่ากับ 0.739 (95% CI; 0.663-0.815) คณะวิจัยเลือกค่าอ้างอิงที่เหมาะสมของระดับ plasma calprotectin ที่ 430 ng/ml นั่นคือผลการตรวจวัดเป็นบวกเมื่อมีค่า plasma calprotectin > 430 ng/ml จำนวนผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีระดับ plasma calprotectin สูงผิดปกติ (ให้ผลบวก) มีร้อยละ 83.5 (86/103) ขณะที่จำนวนของกลุ่มควบคุมที่มีระดับ plasma calprotectin สูงผิดปกติมีเพียงร้อยละ 50 (31/62) (ตารางที่ 2)

เมื่อคำนวณค่าการวินิจฉัย (diagnostic values) ของการตรวจวัดระดับ plasma calprotectin โดยใช้ค่าอ้างอิง 430 ng/ml ได้ค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 83.5 และร้อยละ 50 ตามลำดับ ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) เท่ากับร้อยละ 73.50 ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) เท่ากับร้อยละ 64.58 และค่าความถูกต้องของการวินิจฉัย (Accuracy) เท่ากับร้อยละ 70.91 (ตารางที่ 2)

การอภิปรายผล

งานวิจัยนี้พบว่าระดับ plasma calprotectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และระดับ plasma calprotectin ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่เสื่อมลง เนื่องจาก calprotectin หรือ S1000A8/A9 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบสังเคราะห์จากเซลล์เม็ดเลือดขาว ข้อมูลวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับการอักเสบสูงขึ้น จากงานวิจัยของคณะวิจัยเมื่อเร็วๆนี้ พบว่าไตที่มีนิ่วของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (stone-containing kidneys) มีการอักเสบเกิดขึ้น มีเม็ดเลือดขาวจำนวนมากในเนื้อเยื่อไตที่อยู่ติดกับก้อนนิ่ว และมีระดับของสารตัวกลางการอักเสบ monocyte chemoattractant protein 1 และ interleukin-6 ในเนื้อเยื่อไตสูงกว่าปกติ[8] คณะวิจัยเชื่อว่าระดับ plasma calprotectin ที่สูงขึ้นน่าจะสะท้อนถึงระดับการอักเสบในไตของผู้ป่วย

ในปัจจุบันยอมรับกันว่า calprotectin เป็นตัวบ่งชี้ภาวะอักเสบที่สำคัญและพบว่ามีระดับสูงขึ้นในพลาสมาของผู้ป่วยโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ Malickova และคณะ พบว่าผู้ป่วยโรคไตวายระยะสุดท้าย (End-stage renal disease) มีระดับ plasma calprotectin สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของ plasma calprotectin ก่อนและหลังการฟอกเลือด[18] รายงานวิจัยในผู้ป่วยโรคอ้วน (obesity) ซึ่งจัดว่ามีการอักเสบระดับต่ำ (low-grade systemic inflammation) พบว่ามีระดับ plasma calprotectin สูงกว่าคนปกติเช่นกัน และยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง plasma calprotectin กับค่า BMI[19] รายงานวิจัยในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีภาวะ

ตารางที่ 2 *ผลการจำแนกกลุ่มประชากรตามค่า cutoff ของ plasma calprotectin และค่าการวินิจฉัย (diagnostic values)*

Plasma calprotectin test	Nephrolithiasis (%)	Healthy controls (%)	Total
- Positive (≥ 430 ng/ml)	86 (83.5)	31(50.0)	117
- Negative (< 430 ng/ml)	17 (16.5)	31 (50.0)	48
Total	103 (100)	62 (100)	165

Sensitivity	83.50%
Specificity	50.00%
Positive predictive value	73.50%
Negative predictive value	64.58%
Accuracy of test	70.91%

allograft rejection พบว่ามีระดับ serum MRP8/14 สูงขึ้นและเสนอว่า MRP8/14 หรือ calprotectin เป็นตัวบ่งชี้ที่มีความไวสูงเหมาะสมสำหรับใช้ในการติดตามผลการปลูกถ่ายอวัยวะ[20] ในผู้ป่วยวัณโรคปอด (pulmonary tuberculosis)[24] และผู้ป่วยตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน (acute pancreatitis)[25] พบว่ามีระดับ plasma calprotectin สูงกว่าคนปกติเช่นกัน นอกจากนี้ plasma S100A8/A9 ยังพบสูงขึ้นในผู้ป่วยไส้ติ่งอักเสบเฉียบพลัน (acute appendicitis) และเสนอว่าน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยได้[26,27] อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาระดับ plasma calprotectin ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตมาก่อน การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นว่าระดับ plasma calprotectin สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคนิ่วไต และเมื่อวิเคราะห์คุณค่าในการวินิจฉัยของ plasma creatinine พบว่ามีค่า area under ROC curve เท่ากับ 0.739 (95% CI; 0.663-0.815) บ่งชี้ว่า plasma calprotectin สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การวินิจฉัยได้ในระดับปานกลาง (adequate diagnostic potential) โดยมีค่าความไวของการตรวจวัดที่ร้อยละ 84 และค่าความจำเพาะร้อยละ 50 (AUC = 0.5 บ่งชี้ว่าไม่สามารถใช้เป็น biomarker ในการจำแนกผู้ป่วยออกจากคนปกติได้ ขณะที่ AUC = 1.0 จัดเป็น perfect biomarker ที่สามารถจำแนกผู้ป่วยออกจากคนปกติได้อย่างสมบูรณ์ ค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100)

Worcester และคณะ[28] รายงานว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่า creatinine clearance ต่ำกว่าคนปกติ แสดงว่าผู้ป่วยมีประสิทธิภาพการทำงานของไตโดยรวมต่ำลง สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของคณะวิจัยรวมทั้งงานวิจัยนี้ที่พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่า plasma creatinine สูงขึ้นและ corrected creatinine clearance ต่ำลงกว่าปกติ พบการอักเสบและพังผืดเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อไตที่มีก้อนนิ่ว และระดับการอักเสบและพังผืดที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ต่ำลง[8,9] ผลการวิจัยครั้งนี้พบความสัมพันธ์ระหว่าง plasma calprotectin ที่สูงขึ้นกับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่เสื่อมลง (plasma creatinine สูงขึ้น และ eGFR ลดลง) แสดงว่า calptrotectin น่าจะมีแหล่งกำเนิดมาจากไตที่มีการอับเสบ ดังนั้นการวัดระดับ plasma calprotectin น่าจะมีประโยชน์ในการช่วยประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไตและพยาธิสภาพในไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการ พบโปรตีน calgranulin A (S1000A8) และ calgranulin B (S100A9) ปริมาณมากในก้อนนิ่ว (stone matrix)[6,11,29,30] จึงเชื่อว่า calprotectin มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่ว Pillay และคณะพบว่า calgranulin สามารถยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซี่ยมออกซาเลตได้ และพบการแสดงออกของ calgranulin ในเนื้อเยื่อไตและเซลล์บุท่อไตเพาะเลี้ยง (renal tubular epithelial cell line)[16] Bergsland และคณะ พบว่าโปรตีน calgranulin B หลั่งออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าในปัสสาวะของคนปกติ[15] สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่พบระดับ urinary calprotectin สูงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวัด urinary calprotectin ในงานวิจัยนี้ยังน้อยอยู่ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อยืนยันผลในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น และประเมินหาคุณค่าทางคลินิกของ urinary calprotectin

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการเป็นนิ่วไตกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีน calprotectin ในเลือด และพบว่าระดับ calprotectin ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง คณะวิจัยเชื่อว่าระดับ calprotectin ที่สูงขึ้นน่าจะมาจากการอักเสบในไตของผู้ป่วย และการตรวจวัด plasma calprotectin น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ทางคลินิกเป็นตัวบ่งชี้เพิ่มเติมในการวินิจฉัยโรคนิ่วไตและประเมินระดับการอักเสบในไตได้ อย่างไรก็ตามโปรตีน calprotectin เป็น inflammatory protein ที่พบสูงขึ้นในหลายโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบรวมทั้งโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และตับอ่อน ดังนั้นแม้การตรวจวัด plasma calprotectin จะให้ค่า sensitivity สูงแต่มีค่า specificity ต่ำ จึงต้องระมัดระวังในการใช้เพื่อการวินิจฉัย

คณะวิจัยตั้งสมมุติฐานว่า ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่ว และในไตของผู้ป่วยที่มีนิ่วอยู่ (stone-containing kidneys) มีระดับความเครียดจากออกซิเดชั่นและการอักเสบสูง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเสื่อมของไต ทำให้ผู้ป่วยโรคนิ่วไตเหล่านี้มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง ดังนั้นการรักษาโรคนิ่วไตนอกจากการเอานิ่วออกโดยวิธีทางศัลยกรรมแล้วควรต้องให้การรักษาด้วยยาร่วมกับการแนะนำการปฏิบัติ

ตัวด้านต่างๆ (lifestyle modification) เช่น การออกกำลังกายที่เหมาะสม การบริโภคผักสีเขียวต่างๆ และอาหารที่มีกรดไขมันชนิด omega-3 หรือ fish oil เพื่อลดภาวะอักเสบและชะลอความเสื่อมลงของไต ซึ่งจะส่งผลต่อการลดความเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วซ้ำและการเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง

เอกสารอ้างอิง

1. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. **J Clin Invest** 2005; 115(10): 2598-608.
2. Bovornpadungkitti S, Sriboonlue P, Tungsanga K. Recurrence rates after renal stone surgery in Khon khaen hospital. **Thai J Urol** 1992; 13.
3. Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, Dissayabutra T, Tungsanga K. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: update 2007. **Asian Biomed** 2007; 1(1): 87-95.
4. Ryall RL. The future of stone research: rummagings in the attic, Randall's plaque, nanobacteria, and lessons from phylogeny. **Urol Res** 2008; 36(2): 77-97.
5. Coe FL, Evan AP, Worcester EM, Lingeman JE. Three pathways for human kidney stone formation. **Urol Res** 2010; 38(3): 147-60.
6. Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. **Front Biosci** 2004; 9: 1450-82.
7. Boonla C, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. **Urol Res** 2007; 35(4): 185-91.
8. Boonla C, Hunapathed C, Bovornpadungkitti S, Poonpirome K, Tungsanga K, Sampatanukul P, et al. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in stone-containing kidneys. **BJU Int** 2008; 101(9): 1170-7.
9. Boonla C, Krieglstein K, Bovornpadungkitti S, Strutz F, Spittau B, Tosukhowong P. Fibrosis and evidence for epithelial-mesenchymal transition in kidneys of patients with staghorn calculi. **BJU Int (Article in Press)** 2011.
10. Merchant ML, Cummins TD, Wilkey DW, Salyer SA, Powell DW, Klein JB, et al. Proteomic analysis of renal calculi indicates an important role for inflammatory processes in calcium stone formation. **Am J Physiol Renal Physiol** 2008; 295(4): F1254.
11. Mushtaq S, Siddiqui AA, Naqvi ZA, Rattani A, Talati J, Palmberg C, et al. Identification of myeloperoxidase, alpha-defensin and calgranulin in calcium oxalate renal stones. **Clin Chim Acta** 2007; 384(1-2): 41-7.
12. Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K, Geczy CL. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. **J Leukocyte Biol** 2009; 86(3): 577.
13. Striz I, Trebichavsk I. Calprotectin a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. **Physiol Res** 2004; 53: 245-53.
14. Bennett J, Dretler SP, Selengut J, Orme-Johnson WH. Identification of the calcium-binding protein calgranulin in the matrix of struvite stones. **J Endourol** 1994; 8(2): 95-8.
15. Bergsland KJ, Kelly JK, Coe BJ, Coe FL. Urine protein markers distinguish stone-forming from non-stone-forming relatives of calcium stone formers. **Am J Physiol Renal Physiol** 2006; 291(3): F530-6.
16. Pillay SN, Asplin JR, Coe FL. Evidence that calgranulin is produced by kidney cells and is an inhibitor of calcium oxalate crystallization. **Am J Physiol** 1998; 275(2 Pt 2): F255-61.
17. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewe R, van der Heijde D, Uhlig T, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 2007; 66(8): 1093-7.
18. Malickova K, Brodsk H, Lachmanov J, Dusilov Sulkov S, Janatkov I, Mare kov H, et al. Plasma calprotectin in chronically dialyzed end-stage renal disease patients. **Inflamm Res** 2010; 59(4): 299-305.
19. Mortensen OH, Nielsen AR, Erikstrup C, Plomgaard P, Fischer CP, Krogh-Madsen R, et al. Calprotectin--a novel marker of obesity. **PloS one** 2009; 4(10): e7419.
20. Striz I, Jaresova M, Lacha J, Sedl cek J, V tko S. MRP 8/14 and procalcitonin serum levels in organ transplantations. **Annals of transplantation: quarterly of the Polish Transplantation Society** 2001; 6(2): 6.

21. Sudan D, Vargas L, Sun Y, Bok L, Dijkstra G, Langnas A. Calprotectin: a novel noninvasive marker for intestinal allograft monitoring. **Ann Surg** 2007; 246(2): 311-5.

22. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med** 2009; 150(9): 604-12.

23. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature** 1958; 181: 1199-200.

24. Pechkovsky DV, Zalutskaya OM, Ivanov GI, Misuno NI. Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2000; 29(1): 27-33.

25. Carroccio A, Rocco P, Rabitti PG, Di Prima L, Forte GB, Cefalu AB, et al. Plasma calprotectin levels in patients suffering from acute pancreatitis. **Dig Dis Sci** 2006; 51(10): 1749-53.

26. Bealer JF, Colgin M. S100A8/A9: a potential new diagnostic aid for acute appendicitis. **Acad Emerg Med** 2010; 17(3): 333-6.

27. Thuijls G, Derikx JP, Prakken FJ, Huisman B, van Bijnen Ing AA, van Heurn EL, et al. A pilot study on potential new plasma markers for diagnosis of acute appendicitis. **Am J Emerg Med** 2011; 29(3): 256-60.

28. Worcester EM, Parks JH, Evan AP, Coe FL. Renal function in patients with nephrolithiasis. **J Urol** 2006; 176(2): 600-3; discussion 603.

29. Chen WC, Lai CC, Tsai Y, Lin WY, Tsai FJ. Mass spectroscopic characteristics of low molecular weight proteins extracted from calcium oxalate stones: preliminary study. **J Clin Lab Anal** 2008; 22(1): 77-85.

30. Tawada T, Fujita K, Sakakura T, Shibutani T, Nagata T, Iguchi M, et al. Distribution of osteopontin and calprotectin as matrix protein in calcium-containing stone. **Urol Res** 1999; 27(4): 238-42.