

Prínos IČ spektroskopie do analýzy močových konkrementov v Medirexe, a. s.

Katarína Schenková, Iveta Gáboríková

Medirex, a. s., Bratislava

Infračervená (IČ) spektroskopia umožňuje relatívne presnú a spoľahlivú analýzu chemického zloženia močového konkrementu, čo je nevyhnutný predpoklad pre správnu konzervatívnu liečbu a prevenciu recidív. V roku 2016 sme touto metódou analyzovali v Medirexe, a. s., 812 konkrementov. V našom súbore sme zaznamenali výraznú prevahu mužov oproti ženám (2,3 : 1). Urolitiáza postihuje hlavne vekovú kategóriu 30- až 69-ročných, s vrcholom vo veku 60 – 69 rokov. Najčastejšími nálezmi v našom súbore bol whewellit v 28 % prípadov, dvojzložkový whewellit – weddellit v 23 %, trojzložkový whewellit – weddellit – apatit v 14 % a jednozložkový uricit v 13 %. Iné typy močových konkrementov sa vyskytli výrazne zriedkavejšie. Zavedenie metodiky IČ spektroskopie výrazne spresnilo analýzu močových konkrementov.

Kľúčové slová: urolitiáza, močový konkrement, IČ spektroskopia

The benefit of IR spectroscopy for urine stone analysis in Medirex, a. s.

Infrared spectroscopy allows relatively accurate and reliable analysis of the chemical composition of urinary stones, which is crucial for correct conservative treatment and prevention of recurrence of urinary stones. In 2016 we analyzed 812 stones in Medirex, a. s. There was a strong man dominance over women in our group of patients (2.3:1). Urolithiasis mainly affects the age group 30 – 69-years, with a peak of 60 – 69 years. The most frequent findings in our group of patients were whewellite in 28% of cases, whewellite – weddellite in 23%, whewellite – weddellite – calcium phosphate in 14% and uricite in 13%. Other types of urinary stones occurred significantly more rarely. The establishment of the IR spectroscopy method significantly improved the analysis of urinary stones.

Keywords: urolithiasis, urinary stone, IR spectroscopy

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 27 – 30

Úvod

Urolitiáza je časté ochorenie vyskytujúce sa v priemyselne vyspelých krajinách, a to vo všetkých vekových kategóriách, pričom relatívne vysoké percento pacientov má sklon k recidívam. Tvorba močového kameňa je výsledkom viacstupňového procesu, v ktorom je rovnováha medzi faktormi umožňujúcimi kryštalizáciu solí moču a faktormi, ktoré ju inhibujú, narušená.

Urolitiáza vzniká ako následok metabolickej poruchy, infekcie močových ciest alebo ako následok morfológických a funkčných zmien uropoetického systému. Konzervatívna liečba rovnako ako prevencia recidív spočíva v úprave metabolických porúch, ktoré mohli vznik močového konkrementu spôsobiť alebo podporiť. Preto sa veľký dôraz v terapii a prevencii recidív urolitiázy kladie na presné určenie chemického zloženia močového konkrementu⁽¹⁾.

Mokrú cestu analýzy, ktorá je založená na chemickom dôkaze jednotlivých funkčných skupín a iónov prítomných v močovom kameni, poskytuje veľa falošne pozitívnych aj falošne negatívnych výsledkov. Vykazuje vysokú nespoľahlivosť, preto ju Európska asociácia pre urológiu (EAU) neakceptuje ako metódu na identifikáciu chemického zloženia močového konkrementu⁽²⁾.

Infračervená (FT-IR) spektroskopia je metóda odporúčaná touto asociáciou ako fyzikálna metóda na identifikáciu jednotlivých zložiek močových konkrementov. Právom sa pokladá za zlatý štandard medzi dostupnými metódami v laboratórnych podmienkach pre svoju presnosť, spoľahlivosť a rýchlosť vyhotovenia^(2,3). Ide o nedeštruktívnu analytickú metódu, pri ktorej vzorka nie je analýzou poškodená, ale poskytuje informácie o svojom zložení.

Podstatou IČ spektroskopie je interakcia infračerveného žiarenia so študovanou hmotou. V prípade pohltienia fotónu hovoríme o absorpčnej infračervenej spektroskopii. Energia fotónov infračerveného žiarenia (1 – 60 kJ/mol) nepostačuje na excitáciu elektrónov v molekulových orbitaloch, ale je dostatočná na zmenu vibračného a rotačného stavu molekuly. Získané hodnoty vibračných energií súvisia s pevnosťou chemických väzieb, s molekulovou geometriou, hmotnosťou jadier a slúžia na identifikáciu molekulovej štruktúry danej látky.

IČ spektroskopia poskytuje informácie o semikvantitatívnom, poprípade kvantitatívnom zastúpení majoritných aj minoritných zložiek močového konkrementu⁽⁴⁾.

Poznáme asi 40 látok, ktoré môžu byť súčasťou močového konkrementu. Zloženie a názvy močových konkrementov sú uvedené v **tabuľke 1**⁽⁵⁾.

Metodika

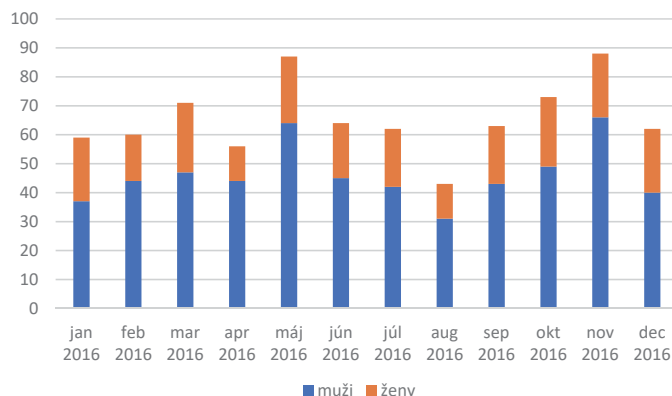
FT-IR analýza vyžaduje prípravu tabletky s priemerom 13 mm, ktorá vznikne zmiešaním jemného prášku kameňa (0,1 – 0,5 mg) so suchým bromidom draselným – KBr (približne 200 mg). Zmes je v špeciálnej forme pod tlakom asi 500 MPA spracovaná do priehľadnej KBr tabletky. Po jej vložení do kyvetového držiaka spektrometra Nicolet iS10 (Thermo Scientific Inc.) sa začína merať IČ spektrum v oblasti od 4 000 do 400 cm^{-1} (32 skenov), pričom ako pozadie spektra (64 skenov – blank) je meraný vzduch.

Interferogramy neznámych vzoriek sme spracovali aplikáciou SW OMNIC9 (Thermo Scientific Inc.) a získané dáta sme porovnali s referenčným spektrom dostupnej knižnice (Kidney Stone Library-Basic, Kidney Stone coded – Nicolet CZ, s. r. o.).

Tabuľka 1. Zloženie a mineralogický názov močových konkrementov

Konkrementy	Mineralogický názov
Kalciumoxaláty	
kalciumoxalát-monohydrát	whewellit
kalciumoxalát-dihydrát	weddellit
Močová kyselina	
močová kyselina	uricit
močová kyselina-dihydrát	
Uráty	
natrium-monohydrát	
amoniumhydrogenurát	
Kalciumfosfáty	
hydroxylapatit	apatit
β -trikalciumfosfát	whitlockit
monokalciumfosfát-dihydrát	brushit
Infekčné kamene	
karbonátapatit	dahlit
magnesiumamoniumfosfáthexa-hydrát (tripelfosfát)	struvit
Geneticky podmienené	
cystín	
xantín	
Organické kamene	
fibrín	
artefakty	
Liekové kamene	

Graf 1. Analyzované močové konkrementy v jednotlivých mesiacoch roku 2016 v závislosti od pohlavia



Výsledok automatického porovnania na identifikáciu spektra bol poskytnutý ako súbor možností s najväčšou zhodou, pravdepodobnosťou konkrétneho výsledku, pričom 99 % a vyššia pravdepodobnosť indikujú perfektnú zhodu neznámeho a referenčného spektra. V každom prípade sme vizuálne porovnali vybrané spektrá použitej knižnice so vzorkou a konečný výsledok sme vydali v podobe percentuálneho zastúpenia jednotlivých zložiek močového konkrementu.

Výsledky

V roku 2016 sme metódou IČ spektroskopie analyzovali spolu 812 konkrementov, z toho 24 (3 %) bolo od zvierat. Zo 788 vzoriek ľudského pôvodu bol jeden konkrement zo stoličky dojčiat, ostatné boli močové konkrementy. U 7 pacientov nebolo možné vydať výsledok z rôznych dôvodov (málo materiálu, interferencia).

Mesačne sme analyzovali priemerne 67,6 vzorky, najviac bolo v novembri (92 vzoriek), najmenej v auguste (65 vzoriek).

V našom súbore sme zaznamenali výrazný rozdiel medzi pohlaviami. Muži (552 močových kameňov – 70 %) mali výraznú prevahu oproti ženám (236 močových kameňov – 30 %). Tento rozdiel medzi pohlaviami je evidentný v každom mesiaci roku 2016 (**graf 1**), rovnako ako vo všetkých vekových kategóriách nad 30 rokov, v mladších vekových skupinách je menej výrazný (**graf 2**).

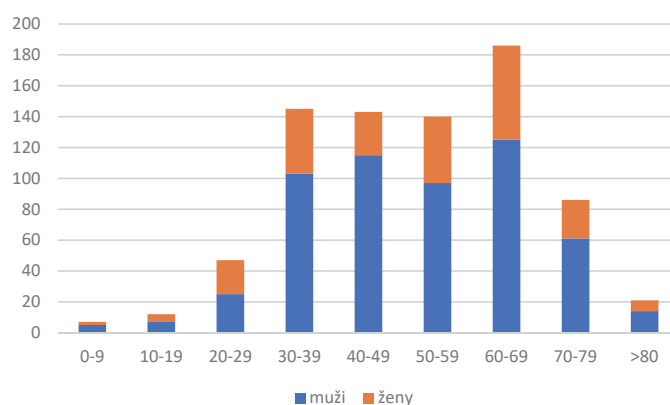
Zvýšený výskyt močových konkrementov sme zaznamenali vo vekovom rozmedzí 30 – 69 rokov. Najviac zastúpenou vekovou skupinou je kategória 60- až 69-ročných pacientov. Najmladší pacient bol 2-ročný chlapec s močovým konkrementom, najstarším pacientom v našom súbore bola 91-ročná žena. Veková distribúcia v našom súbore spolu s rozdielmi medzi pohlaviami je znázornená v **grafe 2**.

Výskyt jednotlivých typov močových konkrementov v našom súbore spolu s frekvenciou ich výskytu znázorňuje **tabuľka 2**.

Najčastejším nálezom boli jednozložkové močové konkrementy – 354 pacientov (45 %). Dvojsložkové kamene sme zaznamenali u 263 pacientov (34 %), trojsložkové boli v 162 prípadoch (21 %) a viac ako tri zložky u 1 pacienta (0,1 % – **tabuľka 2**).

V jednozložkových konkrementoch sme najčastejšie diagnostikovali whewellit – 28 %. Druhý najčastejší pri jednozložkovom močovom konkreme bol kameň z kyseliny močovej (uricit), v 13 %. Čistý weddellit sme zaznamenali len u 1 %

Graf 2. Veková distribúcia pacientov v našom súbore v závislosti od pohlavia



pacientov. Iné zloženie jednozložkového konkrementu bolo raritné. Tieto zriedkavé typy spolu s počtom a percentuálnym zastúpením sú znázornené **v tabuľke 2**.

Najčastejším dvojzložkovým močovým konkrementom bol whewellit – weddellit, v 23 % prípadov. Okrem toho sme relatívne často zaznamenali kombináciu whewellit – uricit v 3 %, whewellit – apatit v 2,5 % a dahlit – struvit u 2 % pacientov. U 3 % pacientov sme diagnostikovali dvojzložkový konkrement s iným, raritnejším chemickým zložením – **tabuľka 2**.

Tabuľka 2. Výskyt jednotlivých typov močových konkrementov v našom súbore

Frekvencia výskytu jednotlivých močových konkrementov		
Jednozložkové kamene		
Whewellit	219	28 %
Weddellit	10	1 %
Močová kyselina	102	13 %
Proteín	8	< 1 %
Dahlit	5	< 1 %
Cystín	4	< 1 %
Brushit	4	< 1 %
artefakty (tehla, keramika)	2	< 1 %
Spolu	354	45 %
Dvojzložkové kamene		
Whewellit – weddellit	180	23 %
Whewellit – uricit	25	3 %
Whewellit – apatit	20	2,50 %
Dahlit – struvit	16	2 %
Whewellit – dahlit	5	< 1 %
Weddellit – dahlit	5	< 1 %
Weddellit – apatit	3	< 1 %
Struvit – amoniumhydrogenurát	2	< 1 %
Calciumfosfát amorfný – struvit	2	< 1 %
Kalciumbilirubinát, bilirubín	1	< 1 %
Natrium-monohydrát – amoniumhydrogenurát	1	< 1 %
Kyselina močová – whitlockit	1	< 1 %
Weddellit – kyselina močová	1	< 1 %
Whewellit – kalcit	1	< 1 %
Spolu	263	34 %
Trojzložkové kamene		
Whewellit – weddellit – apatit	110	14 %
Whewellit – weddellit – dahlit	13	2 %
Struvit – dahlit – whewellit	6	< 1 %
Struvit – dahlit – calciumfosfát amorfný	5	< 1 %
Struvit – dahlit – amoniumhydrogenurát	4	< 1 %
Struvit – dahlit – whitlockit	4	< 1 %
Whewellit – weddellit – kyselina močová	4	< 1 %
Weddellit – dahlit – brushit	3	< 1 %
Whewellit – weddellit – amorfný kalciumfosfát	3	< 1 %
Struvit – dahlit – weddellit	2	< 1 %
Whewellit – dahlit – brushit	2	< 1 %
Dahlit – whitlockit – weddellit	2	< 1 %
Natrium-monohydrát – whewellit – kyselina močová	1	< 1 %
Amoniumhydrogenurát – weddellit – kyselina močová	1	< 1 %
Whewellit – kyselina močová – amorfný kalciumfosfát	1	< 1 %
Whewellit – weddellit – amoniumhydrogenurát	1	< 1 %
Spolu	162	21 %
Viac ako tri zložky		
whewellit – weddellit – apatit – struvit	1	< 1 %
Spolu	780	

Pri trojzložkových konkrementoch bolo najčastejšie chemické zloženie whewellit – weddellit – apatit, v 14 % prípadov. Oveľa zriedkavejšia bola kombinácia whewellit – weddellit – dahlit (2 %). Iné zloženie trojzložkového močového konkrementu sme zaznamenali u 5 % pacientov – jednotlivé trojkombinácie spolu s percentuálnym zastúpením sú znázornené **v tabuľke 2**.

Viac zložiek ako tri sme diagnostikovali len v jednom prípade – išlo o 36-ročnú ženu a močový konkrement mal zloženie whewellit – weddellit – apatit – struvit.

V jednom, už spomínanom prípade nepochádzal kameň z močových ciest, ale išlo o koprolit u dvojmesačného dojčťa. Jeho chemické zloženie sme identifikovali ako trikalciumdicitrátetrahdydrát.

IČ spektroskopia umožňuje aj identifikáciu artefaktov. Pri analýze močových konkrementov sme v jednotlivých prípadoch našli spektrá typické pre tehlu a surový materiál pre keramiku.

Močové konkrementy od zvierat sme analyzovali v 24 prípadoch (3 % zo všetkých vzoriek). Od psa pochádzalo 22 močových kameňov, jeden od králik a jeden od mačky.

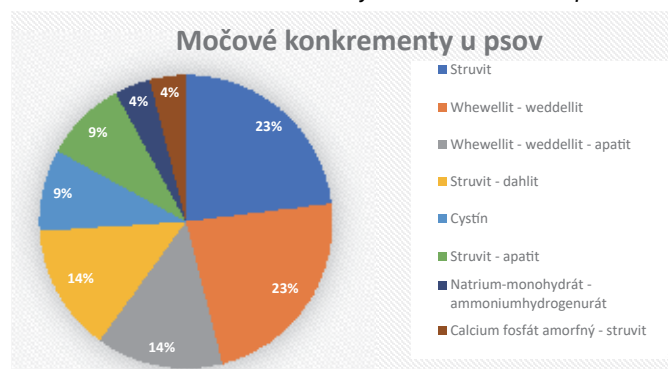
Z hľadiska chemického zloženia močových konkrementov u psov mal najčastejšie zastúpenie struvit (5 prípadov – 23 %) spolu s dvojzložkovým kalciumoxalátovým konkrementom – whewellit – weddellit (rovnako 5 prípadov – 23 %). Okrem toho sme v troch prípadoch (14 %) zaznamenali trojzložkový konkrement whewellit – weddellit – apatit a dvojzložkový kameň v zložení struvit – dahlit. V dvoch prípadoch (9 %) sa vyskytol čistý cystínový konkrement a dvojzložkový kameň zložený zo struvitu a z apatitu. Jednotlivé typy močových konkrementov u psov spolu s percentuálnym zastúpením znázorňuje **graf 3**.

Jedna vzorka močového konkrementu (100 % uhličitán vápenatý – kalcit alebo vaterit) pochádzala od králik a jedna od mačky (trojzložkový whewellit – weddellit – apatit).

Diskusia

Nahradenie zastaraného spôsobu analýzy močových konkrementov mokrou cestou IČ spektroskopiou prinieslo výrazný pokrok do tejto analýzy. IČ spektroskopia spresnila analýzu konkrementov, umožnila identifikáciu viacerých zložiek pri viaczložkových močových konkrementoch spolu s ich percentuálnym zastúpením, identifikáciu aj tých typov kameňov, ktoré boli starým spôsobom analýzy neidentifikovateľné (uhličitán vápenatý), zachytávanie aj atypických a zriedkavých foriem močových konkrementov (proteínové kamene).

Graf 3. Chemické zloženie močových konkrementov u psov



IČ spektroskopie má však svoje limity: presnosť analýzy môže byť rôzna v závislosti od typu konkrémentu, jeho zloženia a prítomnosti nečistôt. Ani výsledok nie je spoľahlivý v prípade, ak sa komponent vyskytuje v objeme < 10 %.

Najčastejším močovým konkrémentom v našom súbore boli kalciumoxalátové kamene (100 % whewellit, dvojzložkový konkrément whewellit – weddellit, resp. trojzložkový v kombinácii s apatitom). Častý bol aj konkrément z kyseliny močovej. Zápalovú zložku sme pozorovali asi u 9 % pacientov. Tento nález je v súlade s literárnymi zdrojmi: Daudon⁽⁶⁾ udáva 71,8 % kalciumoxalátových konkrémentov a 12,8 % konkrémentov z kyseliny močovej. Rovnako sú naše dáta porovnateľné s českou populáciou⁽⁵⁾.

V súbore sme zaznamenali výraznú dominanciu mužov oproti ženám (2,33 : 1), ktorá je evidentná hlavne po 30. roku života. V nižších vekových kategóriách je rozdiel medzi pohlaviami menej výrazný, v skupine 20- až 30-ročných je dokonca pomer M/Ž len 1,13 : 1. Tento jav je opisovaný aj v dostupných publikáciách: Daudon udáva vo francúzskej populácii pomer M/Ž 2,1 : 1⁽⁶⁾, Hossain v japonskej populácii pomer M/Ž 2,68 : 1⁽⁷⁾ a Sanchez-Martin v španielskej populácii pomer M/Ž 1,26 : 1⁽⁸⁾. Nižší výskyt urolitiázy u žien je pravdepodobne spôsobený viacerými faktormi. Za hlavné sa považuje nízka hladina testosterónu v krvi a vyššia koncentrácia citrátov v moči⁽⁹⁾.

Výskyt urolitiázy je najčastejší medzi 40. – 50. rokom života⁽⁹⁾, resp. medzi 20. – 60. rokom⁽¹⁰⁾. V našom súbore je však evidentný posun do vyššieho veku, kde medzi 30. – 60. rokom života je relatívne rovnomerné rozloženie pacientov (približne 18 % v každej dekáde), ale vo vekovej skupine 60- až 69-ročných pozorujeme vrchol výskytu (24 % pacientov) a pokles nastáva až v ďalšej dekáde.

Zaujímavý je záchyt niektorých konkrémentov s raritným chemickým zložením. Za zmienku stojí nález konkrémentu

uhličitanu vápenatého u 76-ročnej ženy, kde bolo jadro konkrémentu zložené zo 100 % whewellitu a obal zo 100 % kalcitu (uhličitanu vápenatého). Kalcit je extrémne vzácny (0,01 – 0,25 % zo všetkých konkrémentov), vyskytuje sa v kombinácii s oxalátmi (42 – 59 %), urátmi (13 – 26 %) alebo fosfátmi (13 %)^(11,12,13,14). Naopak, relatívne často ho nájdeme u zvierat (kôň, koza, morča, králik), kde je uhličitan vápenatý ako prímies krmných zmesí. V našom súbore sme zachytili takýto konkrément u králiku.

Rovnako raritný je nález močového konkrémentu u 69-ročného muža zloženého z 85 % z kalciumbilirubinátu a z 15 % z bilirubínu. V tomto prípade sa nám, bohužiaľ, nepodarilo dopátrať ku klinickým podrobnostiam.

Ďalšiu zaujímavú skupinu predstavujú proteínové konkrémenty. Organický matrix (bielkoviny, lipidy, karbohydráty) je súčasťou každého močového konkrémentu, jeho podiel je 2 – 10 %. Práve bielkovinová zložka sa považuje za rozhodujúcu v procese kryštalizácie⁽¹⁵⁾. V našom súbore sme našli 8 konkrémentov s prevažujúcou proteínovou zložkou, ktorá je najčastejšie tvorená najviac zastúpeným proteínom v moči – albumínom. Iné bielkoviny, ako hemoglobín, osteopontín, protrombín alebo fibrín môžu rovnako tvoriť močový konkrément, a to najčastejšie pri infekciách močového traktu alebo u hemodialyzovaných pacientov.

Zaujímavé je, že sa nám doposiaľ nepodarilo identifikovať žiadny liekový konkrément napriek tomu, že liekové kamene by mali byť zastúpené v 1-2 %⁽¹⁶⁾.

Záver

Zavedenie metodiky IČ spektroskopie výrazne spresnilo analýzu močových konkrémentov, umožnilo identifikovať ich chemické zloženie a prispelo k cielenej konzervatívnej liečbe a prevencii recidívy urolitiázy.

LITERATÚRA

1. Milichovský I, Kron I, Valanský L. Urolitiáza v ambulantnej a klinickej praxi. *Via pract* 2005; 2(10): 389-393.
2. Türk C, Knoll T, Petrik A et al. Guidelines on Urolithiasis. European Association of Urology, 2015.
3. Benramdane L, Bouatia M, Idrissi MOB et al. Infrared analysis of urinary stones, using a single reflection accessory and a KBr pellet transmission. *Spectroscopy Letters* 2008; 41(2): 72-80.
4. Singh I. Renal geology (quantitative renal stone analysis) by 'Fourier transform infrared spectroscopy'. *International Urology and Nephrology* 2008; 40(3): 595-602.
5. Masopust J. *Klinická biochemie*. Nakladatelství Karolinum Praha 1998. ISBN 80-7184-649-3.
6. Daudon M, Traxer O, Lechevallier E et al. Épidémiologie des lithiases urinaires.
7. *Prog Urol* 2008; 18(12): 802-814.
8. Hossain RZ, Ogawa Y, Hokama S, et al. Urolithiasis in Okinawa, Japan: a relatively high prevalence of uric acid stones. *Int J Urol* 2003; 10: 411-415.
9. Sanchez-Martin FM, Millan RF, Esquena FS, et al. Incidence and prevalence of published studies about urolithiasis in Spain. A review. *Actas Urol Esp* 2007; 31(5): 511-520.
10. Stejskal D. Urolitiáza v roce 2003. Etiopatogeneze, diagnostika, terapie. OLM a interní oddělení Nemocnice Šternberk. Dostupné na www.laborator.nemsne.cz/odbornici/biochemie/urolitiiaza.doc
11. Mello MF, Marchini GS, Camara C. A large 15-years database analysis on the influence of age, gender, race, obesity and income on hospitalization rates due to stone disease. *Int Braz J Urol* 2016; 42(6): 1150-1159.
12. Daudon M, Donsimoni R, Hennequin C, et al. Sex- and age-related composition of 10617 calculi analyzed by infrared spectroscopy. *Urol Res* 1995; 23: 319-326.
13. Miller NL, Lingeman JE. Management of kidney stones. *BMJ* 2007; 334: 468-472.
14. Schubert G. Stone analysis. *Urol Res* 2006; 34: 146-150.
15. Leusmann DB, Blaschke R, Schmandt W. Results of 5,035 stone analyses: contribution to epidemiology of urinary stone disease. *Scand J Urol Nephrol* 1990; 24: 205-210.
16. Pramanik R, Asplin JR, Jackson ME, et al. Protein content of human apatite and brushite kidney stones: significant correlation with morphologic measures. *Urol Res* 2008; 36(5): 251-258.
17. Daudon M, Frochot V, Bazin D, et al. Drug-induced kidney stones and crystalline nephropathy: pathophysiology, prevention and treatment. *Drugs* 2017. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0853-7>



MUDr. Katarína Schenková

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: katarina.schenkova@medirex.sk