

Možnosti analýzy močových konkrementov

Erik Drabiščák¹, Erik Dorko¹, Stanislav Jeleň²

¹Ústav verejného zdravotníctva a hygieny, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice, Slovensko

²Katedra geografie a geológie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica, Slovensko

Úvod: Analýza chemického zloženia konkrementov tvorí neoddeliteľnú súčasť manažmentu pacienta s urolitiázou. Presné výsledky sú dôležité pre správnu identifikáciu procesov v moči a metabolických abnormalít.

Materiál a metodika: Močové konkrementy mali humánny pôvod a boli získané vymočením po litotripsii. Vo všetkých vzorkách humánnych močových konkrementov boli analyzované morfológické znaky. Následne boli vzorky špeciálne upravené a analyzované. Využili sme spektroskopické metódy – infračervenú (FTIR) a Ramanovu spektroskopiu (RAMAN), práškovú difrakčnú analýzu (PXR) a elektrónovú mikroskopiu (SEM) s mikroanalýzou (EDS).

Výsledky: Bola opísaná vnútorná aj vonkajšia štruktúra homogénnych a zmiešaných kalcium-oxalátových konkrementov. Na základe molekulových vibrácií a ich intenzít identifikovaných FTIR bola stanovená prítomnosť homogénneho whewellit. Údaje získané metódou RAMAN poukazovali na prítomnosť dahllitu. Klasifikáciou medzirovinných vzdialeností a ich intenzít vo vzťahu k Millerovým indexom bol definovaný struvit. Prostredníctvom fotografií boli pozorované kryštálové tvary weddellitu. Mikroanalýzou bol stanovený vysoký obsah prvkov Ca, O a N a ich distribúcia v rámci vzorky.

Diskusia a záver: Za zlatý štandard pre rutinnú analýzu močových konkrementov možno považovať FTIR pre jej nenáročnosť, rýchlosť a presnosť analýzy v porovnaní s chemickou titračnou metódou. RAMAN, PXR a EDS sú presnejšie metódy, ale meranie a príprava vzoriek trvajú dlhšie a proces je nákladnejší.

Kľúčové slová: močové konkrementy, infračervená spektroskopia, prášková difrakčná analýza, elektrónová mikroskopia, elektrónová mikroanalýza

Posibilities in urinary concretion analysis

Introduction: Analysis of the chemical concretion composition is an inseparable part of managing a patient with urolithiasis. The exact results are essential for correctly identifying processes in the urine and metabolic abnormalities.

Material and methods: Urinary concretions had a human origin and were gained after urination after lithotripsy. In all samples of human urinary concretions, morphological signs were analysed. Subsequently, the samples were specially processed and analysed. We utilised spectroscopic methods – infrared (FITR) and Raman spectroscopy (RAMAN), powder X-ray diffraction analysis (PXR) and electronic microscopy (SEM) and microanalysis (EDS).

Results: Internal and external structures of homogenous and mixed calcium-oxalate concretions were described. Based on molecular vibrations and their intensity identified by FTIR, a homogenous whewellit was detected. Data gained by the method RAMAN pointed to the presence of dahllit. Struvite was seen with the classification of interplanar distances and their intensity concerning the Miller index. Via images, crystal shapes of weddellit were observed. High content of Ca, O, and N and their distribution in the sample were detected by microanalysis.

Discussion and conclusion: FTIR might be considered the gold standard for routine analysis of urinary concretions thanks to its easy maintenance, speed, and preciseness compared to the chemical titration method. RAMAN, PXR and EDS are more precise methods, but samples' measurement and preparation last longer, and the process is more financially demanding.

Keywords: urinary concretions, infrared spectroscopy, powder diffraction analysis, electron microscopy, electron microanalysis

Newslab, 2021; roč. 12 (2): 73 – 78

Úvod

Súčasťou manažmentu pacienta s urolitiázou je evaluácia extrahovaných alebo spontánne vylúčených močových konkrémentov. Toto hodnotenie má byť dostatočne presné na to, aby sa dokázala prítomnosť majoritných zložiek konkrémentu. Konkrementy môžu byť analyzované z hľadiska chemického zloženia, tvaru kryštálov, farby, tvrdosti a morfológie⁽¹⁾.

Vlastnosti konkrémentov úzko súvisia s prevládajúcim rizikovým faktorom, preto je pre liečbu pacientov s urolitiázou potrebné vykonať analýzu správne. Konkrementy môžu byť chemicky aj morfológicky homogénne alebo pozostávajú z viacerých frakcií. Homogénne konkrémenty sú výsledkom jednoduchších procesov odohrávajúcich sa v prostredí s konštantnými vlastnosťami. Viaczložkové konkrémenty vznikajú v prostredí s variabilnejšími vlastnosťami. Výsledný charakter konkrémentu je závislý od charakteru prostredia, v ktorom konkrément vzniká, a od jeho variability v čase. Evaluácia jednotlivých frakcií viaczožkových konkrémentov môže odhaliť problém (metabolickú zmenu), ktorý bol vyšetrením krvi alebo moču nezistený. Presnou analýzou konkrémentu dokážeme lepšie určiť rizikové faktory vzniku urolitiázy. Vo vzťahu k rizikovým faktorom dokážeme určiť rizikové potraviny a následne upraviť stravovacie návyky tak, aby nedochádzalo k recidívam^(1,2).

Prevažné množstvo laboratórií na Slovensku aj vo svete používa zastaranú chemickú titračnú analýzu. Pri vysokej miere nepresností a chýb dochádza často k nesprávnemu určeniu chemického zloženia konkrémentu (viac ako 50 % konkrémentov je určených chybné)⁽²⁾.

Materiál a metodika

Všetky vzorky majú humánny pôvod. Nie sú známe bližšie údaje o pacientoch.

Morfologické štúdie. Konkrementy boli pozorované binokulárnou lupou Nikon SZM 1500 s SD-Fi2 kamerou s maximálnym zväčšením 11,25x z vonkajšej, po sekcii konkrémentu z vnútornej strany pri odrazenom svetle.

Infračervená spektroskopia (FTIR). Vzorky boli homogenizované na prášok. Výsledkom merania je spektrum s charakteristickými molekulovými vibráciami, ktoré sa prejavujú ako absorpčné pásy. Spektrálny záznam bol vyhotovený prístrojom Nicolet iS50 v rozmedzí 4 000 – 400 cm^{-1} použitím techniky zoslabeného úplného odrazu (ATR) na diamantovom kryštále. Záznam pozostáva zo 64 skenov v 2 cm^{-1} krokoch.

Ramanova spektroskopia (RAMAN). Analýzy boli vykonané bez dodatočnej úpravy vzorky spektrometrom LabRAM-HR 800 – verzia UV-VIS-NIR vybaveného mikroskopom Olympus BX-41 s maximálnym zväčšením 100x. Mikroskop pozostáva z CCD detektora Synapse chladeného Peltierovým článkom ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) s difrakčnou mriežkou 600 vrypov/mm. Na meranie boli použité lasery s vlnovou dĺžkou 532 nm (Nd: YAG) a 633 nm (He-Ne). Celková dĺžka záznamu dosahovala 8 – 120 minút.

Prášková difrakčná analýza (PXRD). Práškové preparáty boli vložené do prístrojovej komory tak, aby sa zabránilo horizontálnemu usporiadaniu kryštálov a analyzované rtg. difraktometrom Bruker D8 Advance SolXE. Žiarenie s napätím 40 kV a prúdom 40 mA z W vlákna dopadalo na Cu anódu s $\lambda = 1,540562\text{ \AA}$. Boli zaznamenané skeny v krokoch $0,02^{\circ}/0,8\text{ s}$ v rozmedzí $2 - 65^{\circ}$. Výsledkom merania je difrakčná tabuľka, ktorá udáva hodnoty medzirovinných vzdialeností a intenzít vo vzťahu k Millerovým indexom. Priemerné referenčné hodnoty boli vypočítané z doposiaľ publikovaných hodnôt.

Elektrónová mikroskopia (SEM) a mikroanalýza (EDS). Na vzorky bola nanosená vrstva uhlíka, v prípade EDS boli vzorky narezané. Analýza bola vykonaná mikroskopom JEOL JSM-6390LV. Prostredníctvom mikroanalyzátoru JEOL JXA 8530 F so spektrometrom SDD a rozlíšením 133 eV sa vykonala distribúcia prvkov v konkrémentoch.

Výsledky

Morfologické štúdie

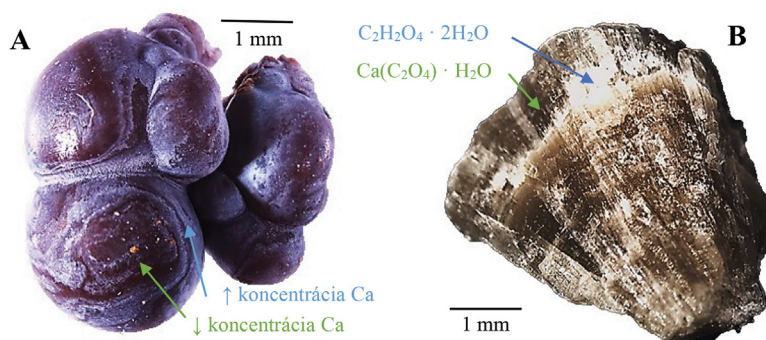
Pozorovanie vzoriek pod binokulárom (**obrázok 1 A, B**) odhalilo rozdiely v morfológických vlastnostiach konkrémentov. Pozorujeme odlišné sfarbenie, vnútornú aj povrchovú štruktúru. Pri konkrémentoch sú prítomné koncentrické vrstvy. Na určenie chemického zloženia bola vykonaná analýza FTIR.

Infračervená spektroskopia (FTIR) a Ramanova spektroskopia (RAMAN)

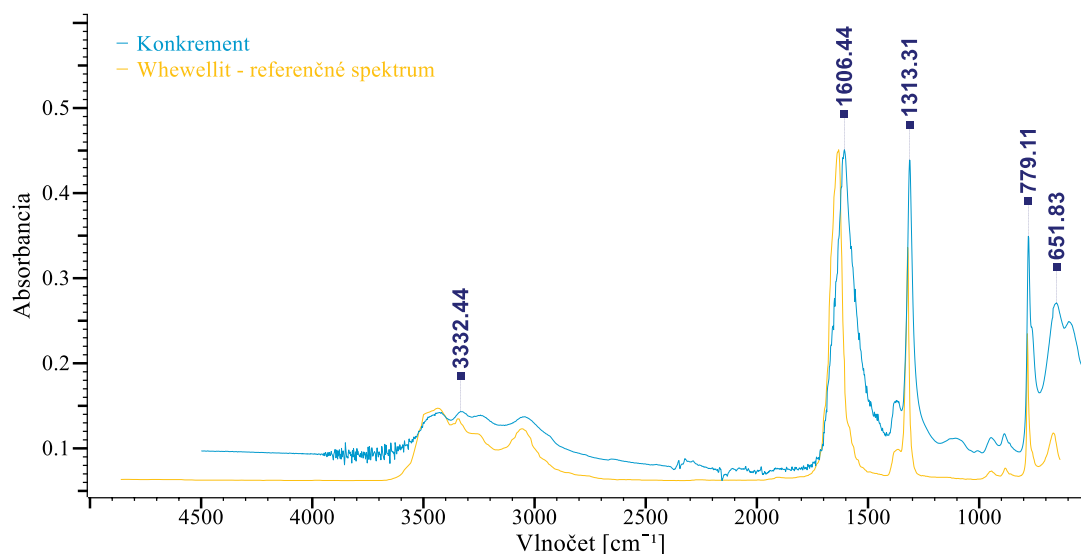
Metódou FTIR bol vo vzorke na **obrázku 1A** identifikovaný *whewellit* $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$. Rozdielne sfarbenie koncentrických vrstiev je spôsobené odlišnou koncentráciou Ca. *Whewellit* bol určený dvoma spôsobmi:

a) namerané spektrum bolo porovnané s databázou ATR-IR – Inorganics 1 – Bio-Rad Sadtler a na základe najvyššej zhody určený *whewellit* (**obrázok 2**),

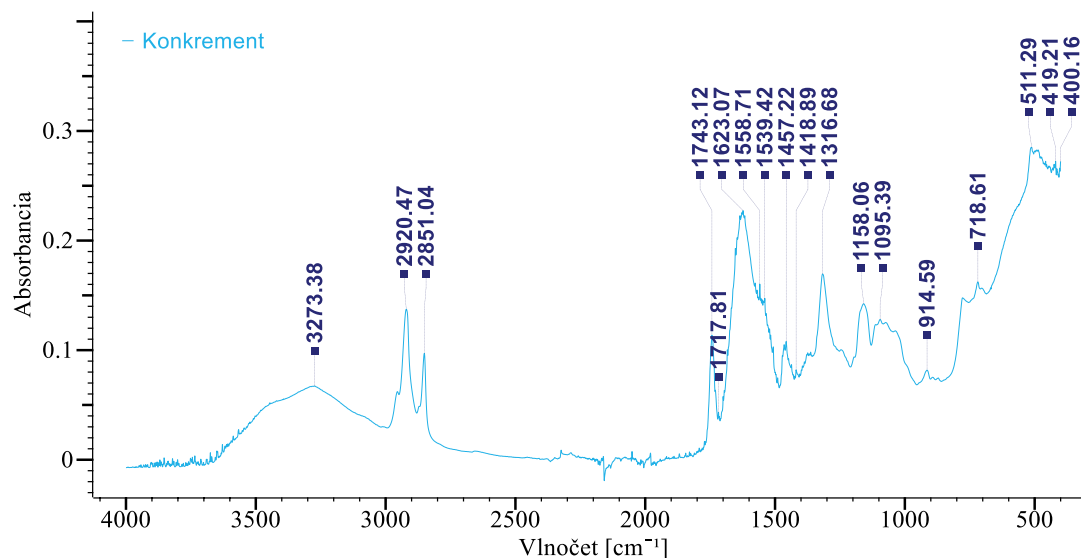
Obrázok 1. A čistý whewellit; B zmiešaný konkrément whewellitu a dihydrátu kys. etándiovej



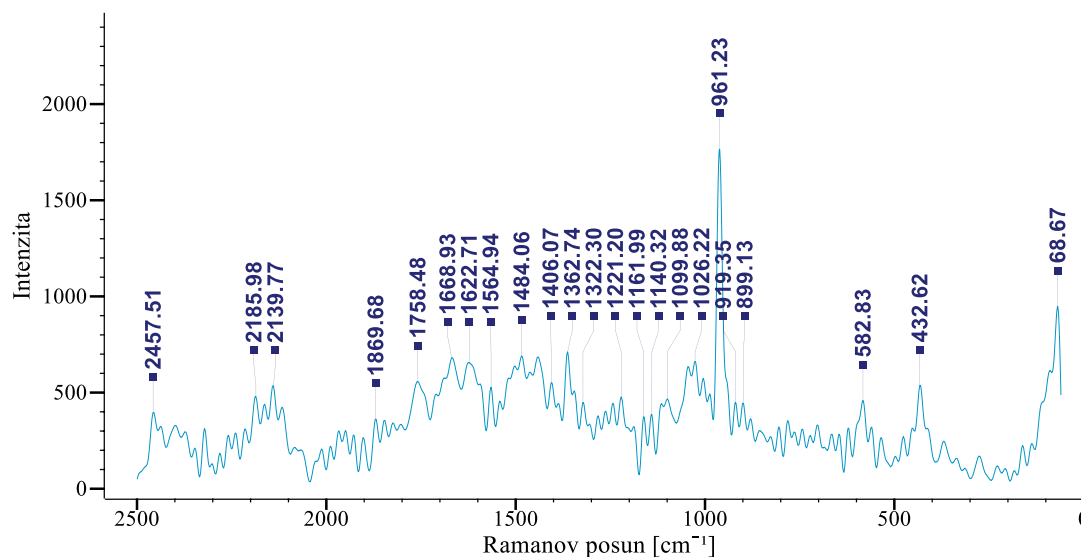
Obrázok 2. FTIR záznam – porovnanie nameraných a referenčných hodnôt pre whewellit – zhoda pozície vlnových čísel a absorbcie je dostatočne silná na to, aby sme vzorku mohli označiť ako whewellit



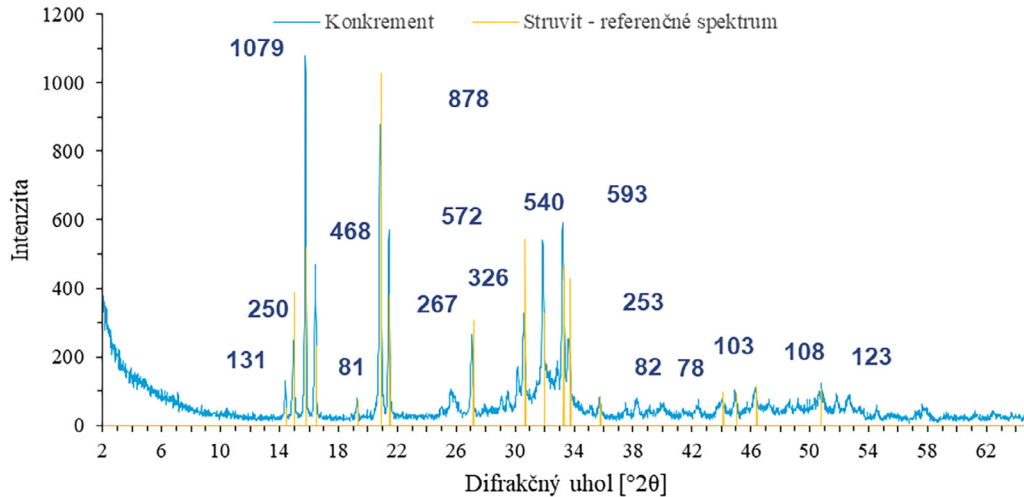
Obrázok 3. FTIR záznam – absorpčné maximá zodpovedajú prítomnosti whewellitu a dihydrátu kys. etándiovej



Obrázok 4. Ramanove spektrum dahllitu



Obrázok 5. Difraktogram struvitu – porovnanie pozícií a intenzít difraktovaných lúčov s referenčnými



b) bol identifikovaný *whewellit* na základe prítomnosti funkčných skupín charakteristických pre tento minerál. Vibrácie s $\sigma = 652, 3\ 000 - 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ reprezentujú H_2O . Absorpčné maximum s $\sigma = 779\ \text{cm}^{-1}$ je charakteristickou vibráciou C–H väzby a vibrácie skupín C=O a C–O sa prejavujú v miestach s $\sigma = 1\ 313\ \text{cm}^{-1}$, resp. $\sigma = 1\ 606\ \text{cm}^{-1}$.

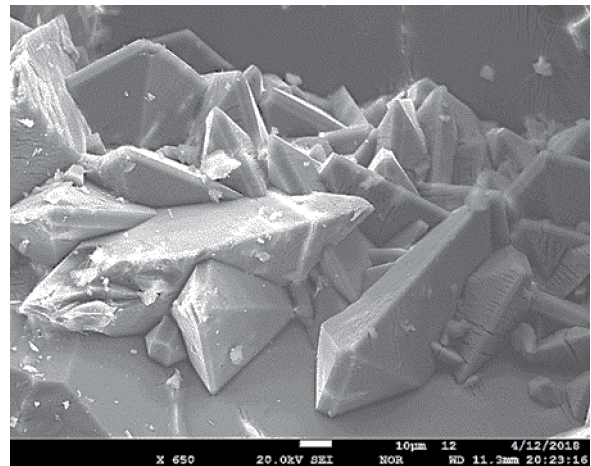
Vo vzorke na **obrázku 1B** boli svetlé koncentrické vrstvy tvorené dihydrátom kys. etándiovej $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tmavé časti tvoril *whewellit* $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$. Výsledok merania zobrazuje **obrázok 3**. Vibrácie s $\sigma = 915$ a $1\ 539\ \text{cm}^{-1}$ zodpovedajú NH_2 skupine. Absorpčné maximum s $\sigma = 1\ 316\ \text{cm}^{-1}$ patrí amidovej C–N skupine. Vibrácia s $\sigma = 1\ 457\ \text{cm}^{-1}$ reprezentuje CH_2 skupinu. Karboxylová dvojitá C=O väzba je vyjadrená vibráciou s $\sigma = 1\ 743\ \text{cm}^{-1}$. Ostatné absorpčné maximá patria *whewellitu*.

Metódou RAMAN (**obrázok 4**) bola zistená prítomnosť *dahlitu* $\text{Ca}_5(\text{PO}_4\text{CO}_3)_3(\text{OH})$ (**obrázok 3**) identifikáciou vibrácií fosforečnanových $(\text{PO}_4)^{-3}$ molekúl v miestach s $\sigma = 433, 583, 961, 1026\ \text{cm}^{-1}$. Absorpčné maximum s $\sigma = 1\ 099\ \text{cm}^{-1}$ je charakteristické pre $(\text{CO}_3)^{2-}$ skupinu a vibrácia s $\sigma = 1\ 565\ \text{cm}^{-1}$ je identifikačná pre amidovú C–N–H skupinu. Vibrácie sú typické pre *dahlit*.

Prášková difrakčná analýza (PXRD)

Obrázok 5 zobrazuje difrakčný záznam *struvitu* (NH_4) $\text{Mg}(\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a porovnanie údajov s referenčným spektrom pre *struvit* získané z publikovaných priemerných hodnôt⁽³⁻⁶⁾.

Obrázok 6. SEM fotografia prizmatických dipyramidálnych kryštálov typických pre *weddellit*



Elektrónová mikroskopia (SEM)

Na **obrázku 6** sú viditeľné prizmatické dipyramidálne kryštály. Tento tvar je typický pre *weddellit* $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, aj keď podobné kryštály môže vytvárať aj iný minerál.

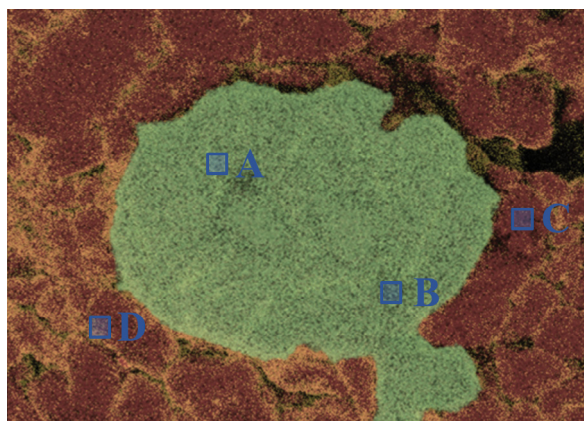
Elektrónová mikroanalýza (EDS)

Výsledky EDS analýzy dokumentuje **tabuľka 1 a obrázok 7**. **Tabuľka 1** zobrazuje zastúpenie prvkov a oxidov na

Tabuľka 1. Výsledky kvantitatívnej EDS analýzy

Prvky	Miesta analýz				Oxidy	Miesta analýz			
	A	B	C	D		A	B	C	D
N	-	-	89,39	86,81	Na₂O	0,29	0,33	-	-
Na	0,22	0,25	-	-	SiO₂	2,21	4,01	7,35	13,19
Si	1	1,86	3,43	6,16	P₂O₅	2,68	2,17	-	-
P	1,16	1,17	-	-	SO₃	1,36	1,26	-	-
S	0,69	0,63	-	-	CaO	93,46	92,23	2,52	-
Ca	66,83	65,94	1,8	-					
O	30,1	30,02	4,64	7,03					
Cl	-	-	0,74	-					
Spolu	100	100,1	100	100					

Obrázok 7. Zložená mapa distribúcie prvkov



(■ – Si, ■ – N+O, ■ – Ca+O)

vybraných miestach vzorky. Zo získaných údajov predpokladáme na základe stechiometrických výpočtov a porovnania s databázou⁽⁷⁾ vznik nasledujúcich minerálov: oxid vápenatý CaO , kremeň SiO_2 a malé množstvá apatitu $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ a anhydritu CaSO_4 . V miestach (C a D) s dominantným obsahom N predpokladáme vznik bližšie nešpecifikovanej organickej zložky a kremeňa SiO_2 . **Obrázok 7** zachytáva rozmiestnenie prvkov vo vzorke a ich vzájomnú afinitu. N a Ca preukazujú vysokú afinitu k O, Si sa ukladá v okrajových častiach NO a CaO tvorí samostatnú jednotku.

Diskusia a záver

Metódu morfológických štúdií využívame ako doplnkovú podobne ako iní autori (8). Výhodou je nízka cena analýzy, jednoduchosť obsluhy, nenáročné hodnotenie výsledkov a krátky čas merania (do 10 min.). Ak na povrchu konkrementu nie sú dostatočne vyvinuté kryštálové tvary, metóda nepostačuje na presnú analýzu konkrementov.

Metóda FTIR spĺňa predpoklady na rutinné používanie a považujeme ju za najlepšiu metódu na analýzu konkrementov^(1,9). Poskytuje údaje na semikvantitatívnej úrovni (má vysokú špecifickosť a senzitivitu) a minimalizuje množstvo chýb v porovnaní s chemickou titračnou analýzou^(10,11). Je relatívne lacná (15 €/analýza)⁽¹²⁾, jednoduchá na obsluhu, hodnotenie výsledkov je stredne náročné, vzorka vyžaduje homogenizáciu a meranie trvá < 10 min. Namerané hodnoty sú podobné ako publikované údaje^(13,14).

RAMAN poskytuje v porovnaní s FTIR výsledky na kvantitatívnej úrovni so senzitivitou 96,3 % a špecificitou 98,5 – 99,5 %⁽¹⁵⁾. Cena analýzy je 17 €/vzorku⁽¹⁶⁾, merania možno ro-

biť bodovo, vzorky nevyžadujú špeciálnu úpravu a analýza aj následné hodnotenie výsledkov sú stredne náročné. Nevýhodou je dĺžka merania, ktorá môže byť v rozmedzí 10 – 180 min. Na použitie metódy RAMAN a FTIR postačuje množstvo vzorky $\geq 0,5 \text{ mm}^3$ ⁽¹⁷⁾ a metódy sú vhodné na analýzu liekových a iných menej častých konkrementov. Hodnoty a intenzita vibrácií sú totožné sa zhodujú s meraniami iných autorov⁽¹⁸⁾.

PXRD analýza je kvalitná kvantitatívna metóda na identifikácii štruktúry kryštalickej látky. Meranie trvá 20 – 180 min a predlžuje sa s klesajúcou hmotnosťou vzorky. Cena analýzy je 50 €/vzorku⁽¹⁵⁾, konkrement je potrebné homogenizovať, analýza je stredne náročná a hodnotenie výsledkov náročné. Nevýhodou je nemožnosť merania amorfných konkrementov^(19,20). Namerané hodnoty sú dostatočne podobné priemerným hodnotám z doposiaľ publikovaných prác v rámci databázy AMCS⁽²¹⁾.

Metóda SEM poskytuje fotografie vo vysokom rozlíšení (dokáže rozlíšiť komponenty s veľkosťou od 1 nm). Dĺžka analýzy stúpa so zvyšovaním chemickej heterogenity konkrementu a trvá 20 – 120 min. Cena 1 analýzy je 20 €⁽¹⁶⁾, je potrebné naparenie vzorky uhlíkom, je náročná na obsluhu aj hodnotenie výsledkov^(22,23). Kryštály na SEM fotografii sú tvarom podobné kryštálom *weddellitu* z iných publikácií⁽²⁴⁾ a databáz⁽²⁵⁾.

Metóda EDS ponúka kvantitatívne výsledky chemického zloženia a distribúciu vybraných prvkov. Dĺžka analýzy (30 – 120 min.) podobne ako pri SEM stúpa chemickou heterogenitou konkrementu. Povrch vzorky je potrebné upraviť, aby bol hladký, a napariť uhlíkom. Cena 1 analýzy je 20 €, meranie a vyhodnocovanie výsledkov je relatívne náročné^(16,23). Výsledky EDS tabuľky pre jednotlivé merané body sú pri porovnaní s databázou dostatočne zhodné⁽⁷⁾. **Obrázok 7** zobrazuje rozloženie prvkov a ich vzájomnú afinitu a pomáha lepšie pochopiť vznik konkrementu.

V porovnaní so zastaranou⁽¹⁾ chemickou titračnou analýzou sú všetky opísané metódy výskumu močových konkrementov kvalitatívne lepšie. Nedochádza k takému vysokému množstvu chýb – falošne pozitívnym a falošne negatívnym výsledkom. V slovenských laboratóriách vždy prevažuje používanie chemickej titračnej analýzy. Týmto sme chceli ponúknuť iné, spoľahlivejšie možnosti analýz močových konkrementov.

Grantová podpora

Výskum bol podporený grantmi KEGA 008UPJŠ-4/2020, KEGA 010UPJŠ-4/2021 a VVGS VUaVP35 2020-1653.

LITERATÚRA

1. Türk C, Neisius A, Petrik A, et al. EAU Guidelines on Urolithiasis. 2021st ed. EAU Guidelines Office; 2021.
2. Gilad R, Williams JC, Usman KD, et al. Interpreting the results of chemical stone analysis in the era of modern stone analysis techniques. J Nephrol 2017; 30(1): 135-140.
3. Ferraris G, Fuess H, Joswig W. Neutron diffraction study of $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (struvite) and survey of water molecules donating short hydrogen bonds 1986; 42(3): 253-258.
4. Mathew M, Schroeder LW, IUCr. Crystal structure of a struvite analogue, $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Acta Cryst 1979; 35(1): 11-13.
5. Whitaker A, Jeffery JW, IUCr. The crystal structure of struvite, $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Acta Cryst 1970; 26(10): 1429-1440.
6. Graeser S, Postl W, Bojar H-PB, et al. Struvite-(K), $\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, the potassium equivalent of struvite a new mineral. Eur J Mineral 2008; 20(4): 629-633.
7. <http://webmineral.com/chemical.shtml>
8. Cruz-May TN, Herrera A, Rodríguez-Hernández J, et al. Structural and morphological characterization of kidney stones in patients from the Yucatan Maya population. J Mol Struct 2021; 1235: 130267.

9. Kravdal G, Helgø D, Moe MK. Infrared spectroscopy is the gold standard for kidney stone analysis. *Tidsskr Den Nor legeförening* 2015; 135(4): 313-314.
10. Khan AH, Imran S, Talati J, et al. Fourier transform infrared spectroscopy for analysis of kidney stones. *Investig Clin Urol* 2018; 59(1): 32-37.
11. Primiano A, Persichilli S, Gambaro G, et al. FT-IR Analysis of Urinary Stones: A Helpful Tool for Clinician Comparison with the Chemical Spot Test. *Dis Markers* 2014; 2014: 1-5.
12. <https://www.ruvzke.sk/sites/default/files/cennik/cennik.pdf>
13. Sekkoum K, Cheriti A, Taleb S, et al. FTIR spectroscopic study of human urinary stones from El Bayadh district (Algeria). *Arab J Chem* 2016; 9(3): 330-334.
14. Muthuselvi C, Arunkumar A, Rajaperumal G. Growth and Characterization of Oxalic Acid Doped with Tryptophan Crystal for Antimicrobial Activity. *Chem Sin* 2016; 7(4): 55-62.
15. Cui X, Zhao Z, Zhang G, et al. Analysis and classification of kidney stones based on Raman spectroscopy. *Biomed Opt Express* 2018; 9(9): 4175.
16. <http://www.geo.sav.sk/wp-content/uploads/Cennik-UVZ-SAV.pdf>.
17. Castiglione V, Sacré PY, Cavalier E, et al. Raman chemical imaging, a new tool in kidney stone structure analysis: Case-study and comparison to Fourier Transform Infrared spectroscopy. *PLoS One* 2018; 13(8).
18. Kalimullina AR, Pisareva EV, Timchenko EV, et al. Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy. *J Opt Technol* 2018; 85(3): 130-135.
19. Uvarov V, Popov I, Shapur N, et al. X-ray diffraction and SEM study of kidney stones in Israel: Quantitative analysis, crystallite size determination, and statistical characterization. *Environ Geochem Health* 2011; 33(6): 613-622.
20. Srivastava A, Swain KK, Vashisht B, et al. Studies of kidney stones using INAA, EDXRF and XRD techniques. *J Radioanal Nucl Chem* 2013; 300: 191-194.
21. Downs RT, Hall-Wallace M. The American Mineralogist Crystal Structure Database. *Am Mineral* 2003; 88: 247-250.
22. Singh VK, Rai PK. Kidney stone analysis techniques and the role of major and trace elements on their pathogenesis: a review. *Biophys Rev* 2014; 6(3-4): 291-310.
23. Racek M, Racek J, Hupáková I. Scanning electron microscopy in analysis of urinary stones. *Scand J Clin Lab Invest* 2019; 79(3): 208-217.
24. Saffo MB, Lowenstam HA. Calcareous Deposits in the Renal Sac of a Molgulid Tunicate. *Science* 1978; 200(4346): 1166-1168.
25. <https://www.mindat.org/gm/4254>

Mgr. Erik Drabiščák

Ústav verejného zdravotníctva a hygieny
Lekárska fakulta UPJŠ
Šrobárova 2, 040 01 Košice
e-mail: erik.drabiscak@student.upjs.sk