

## УТИЦАЈ КАМЕНА У УРИНСКОМ ТРАКТУ НА НИВО НИСКОМОЛЕКУЛСКИХ ИНХИБИТОРА КРИСТАЛИЗАЦИЈЕ У УРИНУ

Драгица МИЛЕНКОВИЋ<sup>1</sup>, Наташа ЛАЛИЋ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт за урологију и нефрологију, Клинички центар Србије, Београд;

<sup>2</sup>Институт за медицинску биохемију, Клинички центар Србије, Београд

### КРАТАК САДРЖАЈ

Калкулоза уринског тракта је болест чија се стопа инциденције стално повећава. Према актуелној хипотези, почетни поремећај у настајању камена је снижени ниво инхибитора кристалације у урину. Циљ нашег истраживања је био да се утврди да ли камен у уринском тракту и примењени метод лечења – дезинтеграција камена ударним таласима (*ESWL*) утичу на ниво нискомолекулских инхибитора кристалације (магнезијума, цитрата и пирофосфата) у урину. Истраживање је обухватило 128 болесника код којих је дијагностикован камен у горњим уринским путевима. Код свих је урађена дезинтеграција камена ударним таласима помоћу апарата *Lithostar (Siemens)*. Код 76 болесника (59%) изbacивање делова камена је завршено у периоду до једног месеца, док је код 52 болесника (41%) резидуалних делова камена било и три месеца после интервенције. Нивои магнезијума, цитрата и пирофосфата су одређивани у двадесетчетворочасовним узорцима урина: пре *ESWL*, између другог и трећег дана, као и после једног, односно три месеца. Анализа резултата је показала да камен или његови делови не утичу битно на ниво нискомолекулских инхибитора кристалације у урину, али да примењени метод лечења доводи до повећања нивоа магнезијума, цитрата и пирофосфата у урину у поређењу са вредностима пре примене *ESWL*. Због тога, поновно лабораторијско испитивање болесника не треба спроводити у периоду краћем од три месеца после лечења.

**Кључне речи:** урински камен; инхибитори кристалације; *ESWL*

### УВОД

Калкулоза уринског тракта је болест чија се стопа инциденције стално повећава [1]. Процењено је да се код око 15% људи у току просечног животног века од 75 година ствара камен у бубрегу [2]. Иако болест ретко доводи до смрти болесника, њен ток може бити компликован не само симптомима изазваним каменом (бол, инфекција, опструкциона уропатија), већ и компликацијама које се јављају у каснијим фазама болести (рецидиви, артеријска хипертензија и слабост бубрега) [3].

Стварање камена у уринском тракту је резултат бројних поремећаја: ензимских (примарна хипероксалурија и ксантинурија), ендокриних (хиперпаратиреоидизам, хипертиреоза) и транспортних на нивоу тубула бубрега (цистинурија, тубуларна ацидоза бубрега и ресорпциона хиперкалциурија бубрега) или танког црева (апсорпциона хиперкалциурија и секундарна хипероксалурија). За стварање камена су значајни и локални предиспонирајући фактори: инфекција, морфолошке промене уринских путева праћене стазом или рефлуксијом урина.

Према актуелној хипотези, прва етапа у стварању камена је постизање одређеног степена презасићености урина јонима калцијума, оксалата или фосфата (зона метастабилности) и стварање кристала калцијум-фосфата у нивоу Хенлеове (*Henle*) петље и дисталних тубула и кристала калцијум-оксалата у сабирним каналићима [4]. Везивањем новоствореног кристала за површину већ постојећег долази до повећања његове запремине, односно раста кристала [5]. Међусобним везивањем група кристалних честица у урину стварају се агрегати кристала. Урин здравих особа је, као сложени биолошки раствор, најчешће

презасићен, а прегледом његовог седимента се, у зависности од *pH* вредности, могу утврдити мали кристали калцијум-оксалата, калцијум-фосфата или мокраћне киселине. Међутим, ни после одређеног периода инкубације *in vitro* кристали се не увећавају. Такође су познати клинички примери да исти metaboлички поремећај код различитих особа не доводи увек до настанка камена. Према резултатима Смита (*Smith*) [6], камен се у уринском тракту јавља код 20-50% оболелих од примарног хиперпаратиреоидизма. Главни механизам који раздваја здраве особе од оних код којих се ствара камен јесте присуство веома ефикасних инхибитора у урину здравих особа који заустављају процесе кристалације до нивоа малих кристала, који се лако ослобађају урином. Код особа које ће у каснијем периоду доживети клиничке манифестације болести, због сниженог нивоа инхибитора, долази до даљег раста и агрегације кристала. Димензије тих кристалних честица постају веће од пречника сабирних каналића, па се ту задржавају или се везују за епителне ћелије у које мигрирају [7], те тако постају језгро будућег камена.

Истраживањима *in vitro* доказани су механизам и место деловања инхибитора кристалације [8]. Нискомолекулски инхибитори (магнезијум, цитрат и пирофосфат) заустављају раст калцијум-фосфатних и агрегацију калцијум-оксалатних кристала, док су макромолекулски инхибитори (гликопротеини и гликозаминогликани) доминантнији у заустављању агрегације калцијум-фосфатних и раста и агрегације калцијум-оксалатних кристала [9]. Клиничке студије су показале значајно смањене вредности инхибитора кристалације у урину особа са калкулозом у поређењу са здравим испитаницима [10-15]. Познавање поремећаја који су довели до стварања камена

је важно не само због бољег разумевања патогенезе болести, већ и због могућности проналажења ефикаснијег начина лечења и спречавања настанка рецидива. Први корак на том путу је правилна клиничка процена болесника са калкулозом уринских путева.

## ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се утврди да ли камен у уринским путевима и примењени метод лечења – дезинтеграција камена ударним таласима (ESWL) утичу на ниво нискомолекуларних инхибитора кристализације у урину.

## МЕТОД РАДА

Испитивање је обухватило 128 болесника код којих је радиографским и ехосонографским испитивањима потврђен камен у горњим уринским путевима. Примењена је дезинтеграција камена ударним таласима (ESWL) помоћу апарата *Lithostar (Siemens)*. Код свих болесника је у непосредном постинтервентном току радиографски доказана задовољавајућа дезинтеграција камена. Болесници су сврстани у две групе: група *R0* је обухватила 76 болесника који су у потпуности измокрили делове дезинтегрисаног камена у периоду до једног месеца, док су групу *R+* чинила 52 болесника код којих су и три месеца после примене ESWL били делови дезинтегрисаног камена. Болесници обе групе су били сличне старости (просечно, 48 година и 51 годину) с очуваном функцијом бубрега на нивоу просечне вредности клиренса креатинина од 100,47 ml/min, односно 87,59 ml/min (Табела 1).

Сви болесници су били на уобичајеном начину исхране и уносу течности. Двадесетчетворочасовни

узорци урина су сакупљани у четири временска интервала: пре примењене терапијске процедуре (0), између другог и трећег дана (A), после једног месеца (B) и три месеца после примене ESWL (C). У серуму су одређивани нивои уреје, креатинина, натријума (Na), калијума (K), хлора (Cl), фосфата и мокраћне киселине, а у урину, поред поменутих параметара, и нивои магнезијума (Mg), цитрата и пирофосфата. Ниво Mg је одређиван колориметријским методом са ксилидил-плавим (*Merkotest*) при pH 3-4 и разблажењу од 1:4. Ниво цитрата је одређиван ензимским методом са цитратлијазом (*Boehringer*), пирофосфат-ензимским методом преко Варбурговог (*Warburg*) оптичког теста (*Sigma*).

Нивои инхибитора у урину су приказани у односу на грам креатинина као  $\bar{X} \pm SD$ , да би се избегле евентуалне разлике везане за пол, величину диурезе и евентуалне грешке услед неправилног сакупљања двадесетчетворочасовних узорка урина. Разлике у нивоима инхибитора у различитим временским интервалима у односу на примењену терапију у свакој групи болесника, као и између група у појединим интервалима анализирани су применом Вилкоксонског теста (*Wilcoxon matched-pairs signed test*). Разлике су сматране значајним за вредности  $p < 0,01$ .

## РЕЗУЛТАТИ

Резултати испитивања су приказани у табели 2. Анализа нивоа Mg у урину болесника који су у потпуности измокрили делове разбијеног камена (*R0*) показује стално повећање у сва три посматрана временска периода после примене ESWL. Међутим, ове разлике нису статистички значајне ( $p > 0,05$ ). У групи болесника код којих још постоје делови разбијеног камена (*R+*) вредности Mg у урину између дру-

ТАБЕЛА 1. Одлике испитаника.

TABLE 1. Characteristics of evaluated patients.

Група Group	Број испитаника (%) Number of patients (%)	Просечна старост (године) Average age (years)	Cl <sub>Cr</sub> (ml/min)
R0	76 (59%)	48	100.47
R+	52 (41%)	51	87.59

R0 – без резидуалних делова камена; R+ – са резидуалним деловима камена

R0 – without residual stone fragments; R+ – with residual stone fragments

ТАБЕЛА 2. Средње вредности уринских инхибитора кристализације у испитиваном периоду.

TABLE 2. Mean values of the urinary inhibitors of crystallization in evaluated period.

Инхибитор Inhibitor	Група Group	Пре ESWL Before ESWL		После ESWL After ESWL		
		0	2-3. дан From 2 <sup>nd</sup> to 3 <sup>rd</sup> day A	Један месец One month B	Три месеца Three months C	
Mg (mmol/g Cr)	R0	2.25±1.09	2.49±1.44	2.73±1.14	2.84±1.49	
	R+	2.75±1.19	2.63±1.39	2.48±1.36	2.86±1.47	
Цитрат Citrate (mg/g Cr)	R0	237.32±190.93	161.05±136.25*	286.75±188.87*	303.42±183.64*	
	R+	263.03±195.10	130.45±116.53*	271.19±207.63*	319.74±194.46*	
Пирофосфат Pyrophosphate (μmol/g Cr)	R0	12.23±7.21	13.33±10.25	12.04±6.46	11.14±6.82	
	R+	13.86±9.66	17.61±10.84	10.80±6.67	12.37±6.86	

\* $p < 0.01$ : O/A, O/B, O/C, A/B, A/C;  $p > 0.05$ : B/C

гог и трећег дана и месец дана после примене *ESWL* су незнатно смањене у поређењу са нивоима пре интервенције ( $p > 0,05$ ). После три месеца просечна вредност *Mg* се повећава, али не значајно ( $p > 0,05$ ). Иако су у обе испитиване групе болесника средње вредности *Mg* три месеца после примене *ESWL* ( $2,84 \pm 1,49 \text{ mmol/l}$ , односно  $2,86 \pm 1,47 \text{ mmol/l}$ ) веће од почетних ( $2,25 \pm 1,09 \text{ mmol/l}$ , односно  $2,75 \pm 1,19 \text{ mmol/l}$ ), није утврђена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ).

Анализа промене нивоа цитрата у урину је показала исти тренд код обе испитиване групе болесника: значајно снижење у периоду између другог и трећег дана после примене *ESWL* у односу на почетни ниво ( $p_{O/A} < 0,0014$ ), повећање после месец дана ( $p_{O/B} < 0,036$ ) и даље повећање после три месеца ( $p_{O/C} < 0,0083$ ). Промене нивоа цитрата у урину у појединим временским интервалима су такође значајне ( $p_{A/B} < 0,0003$ ,  $p_{A/C} < 0,00001$ ), осим за повећање нивоа цитрата између првог и трећег месеца после примене *ESWL* ( $p_{B/C} > 0,05$ ).

Анализа средњих вредности пирофосфата у урину код обе групе болесника је показала благо повећање нивоа у првим данима после примене *ESWL* ( $p_{O/A} > 0,05$ ), снижење вредности после месец дана ( $p_{O/B} > 0,05$ ) и враћање на вредности које се статистички значајно не разликују од почетних ( $p_{O/C} > 0,05$ ).

Поређење средњих вредности *Mg*, цитрата и пирофосфата у урину обе групе болесника пре примене *ESWL*, као и у сваком од каснијих временских интервала није показало статистичку значајност у разликама.

## ДИСКУСИЈА

У овом раду је анализиран утицај камена у уринским путевима на ниво нискомолекуларних инхибитора кристализације у урину. Полазећи од механизма њиховог деловања, претпоставља се да камен доводи до ефекта потрошног снижења нивоа инхибитора у урину. Према дефиницији, инхибитор кристализације је супстанција која спречава или успорава процесе стварања кристала везивањем за одређена места на њиховој површини. То доводи до промене електричног набоја и смањеног привлачења других кристала у урину. За постизање овог ефекта довољно је да само 1% површине кристала буде покривен инхибитором [8]. Чињеница која ово потврђује јесте да природни инхибитори заустављају раст кристала при веома малим концентрацијама у урину. Према наводима Смита [6], пирофосфат у концентрацији од  $10^{-6} \text{ mol}$  зауставља раст калцијум-фосфатних кристала. Ова концентрација је око 1.000 пута мања у поређењу с јонском концентрацијом калцијума у урину, што значи да један молекул пирофосфата може да веже 1.000 молекула калцијум-фосфата. Поред поменутог механизма деловања, цитрат и *Mg*, везујући се за јоне калцијума, односно оксалата, стварају растворљива једињења и смањују степен засићености урина калцијумом, односно оксалатом.

Ефекат камена у смислу потрошног снижења нивоа оксалата у урину доказан је истраживањима *in vitro*. Анант (*Ananth*) и сарадници [16] су 2002. годи-

не мерењем кристала калцијум-оксалата добијених после перкутане нефролитотомије и суспендованих у артефицијелном урину у одређеним временским интервалима показали да раст кристала зависи од његове површине. Користећи тај модел, Лаубе (*Laube*) и сарадници [17] су 2003. године поставили математичку формулу којом се израчунава ефекат камена на смањење нивоа литогених супстанција у урину услед континуираног раста камена. Неопходни параметри су: промена запремине камена између два мерења, временски период између мерења, концентрација литогене супстанције и запремина урина. Резултати су показали значајно смањење вредности цитрата и нормалне вредности калцијума и оксалата у 24-часовном урину болесника са калцијум-оксалатним каменом. Међутим, када је извршена корекција коришћењем математичке формуле [18], нивои оксалата су били значајно виши, у рангу хипероксалурије. Ови резултати показују да, уколико се при анализирању лабораторијских налаза не узме у обзир потрошно смањење вредности уринских параметара одговорних за стварање камена, евентуални метаболички поремећај може остати неоткривен.

Утицај камена на промену састава урина у погледу нискомолекуларних инхибитора кристализације није израчунаван, а у нашем раду је анализиран упоређивањем нивоа *Mg*, цитрата и пирофосфата у урину болесника код којих је утврђен камен пре терапијског поступка (*ESWL*), као и у различитим временским интервалима после њега. Такође је анализиран ниво инхибитора у зависности од тога да ли је после постигнуте успешне дезинтеграције камена завршено измокравање његових ситних делова или се они и даље налазе у уринским путевима. Наши резултати указују на то да само камен битно не утиче на ниво сваког од испитиваних инхибитора због одсуства значајности разлика у њиховим средњим вредностима у 24-часовном урину пре и после лечења, као и без обзира на то да ли је завршено измокравање делова разбијеног камена или се они још налазе у уринским путевима.

Запажене су, међутим, промене у нивоима инхибитора у урину које се односе на сам терапијски поступак. Познато је да је принцип деловања *ESWL* усмеравање енергије ударних таласа насталих брзим електричним пражњењима у води на површину камена, где долази до ефекта компресије и његовог разбијања до ситних честица [19]. Повећање просечних вредности *Mg* и пирофосфата у урину у интервалима непосредно после примене *ESWL* (између другог и трећег дана) који се одржавају и после три месеца, иако није статистички значајан, може се објаснити ослобађањем ових инхибитора током процеса дезинтеграције камена. Ниво цитрата у урину такође показује тенденцију повећања и статистички је високо значајан у интервалима између првог и трећег месеца после примене *ESWL*, док је у непосредном постинтервентном току забележено његово значајно снижење. С обзиром на важну улогу инхибитора кристализације у најранијој фази настајања камена, неопходна су даља истраживања која би детаљније расветлила механизме ових промена.

## ЗАКЉУЧАК

Резултати нашег истраживања су показали да камен у уринским путевима не утиче битно на ниво Mg, цитрата и пирофосфата у урину и није контраиндикација за спровођење одређених дијагностичких протокола. Међутим, литотрипсија ударним таласима, као метод лечења, доводи до повећања нивоа ових нискомолекулских инхибитора кристализације у урину који се одржавају и после три месеца. Иако је степен повећања вредности статистички значајан само за цитрат, ради добијања поузданих резултата, поновну лабораторијску оцену болесника не треба спроводити у периоду крајем од три месеца после примене ESWL.

## ЛИТЕРАТУРА

- Hesse A, Brande E, Wilbert D, Kohrmann KU, Alken D. Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1997 vs 2000. *Eur Urol* 2003; 44:709-13.
- Hesse A, Tiselius HG, Jahn A. Urinary stones: Diagnosis, treatment and prevention of recurrence. 2<sup>nd</sup> revised and enlarged ed. Basel: Karger; 2002. p.7.
- Strohmaier WL. Course of calcium stone disease without treatment. What can we expect? *Eur Urol* 2000; 37:339-44.
- Tiselius HG, Ackermann D, Hess B, Boeve E. Stone disease: Diagnosis and medical treatment. *Eur Urol* 2002; 41(5):1-11.
- Nancollas HG. Physical chemistry of crystall nucleation, growth and dissolution of stones. In: Wickham JEA, Buck AP, editors. Renal tract stones. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone; 1990. p.71-85.
- Smith HL. Pathogenesis of renal stones. *Mineral Electrolyte Metab* 1987; 13:214-9.
- Lieske JC, Deganello S, Tobak FG. Cell-crystal interactions and kidney stone formation. *Nephron* 1999; 81(1):8-17.
- Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int* 1978; 13:33361-71.
- Fleisch H. Role of inhibitors and promoters of crystal nucleation, growth and aggregation in the formation of calcium stone. In: Wickham JEA, Buck AD, editors. Renal tract stones. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone; 1990. p.295-306.
- Nikkila M, Koivula T, Jokela H. Urinary citrate excretion in patients with urolithiasis and normal subjects. *Eur Urol* 1989; 16:382-5.
- Pak C. Citrate and renal calculi. *Mineral Electrolyte Metab* 1987; 13:257-66.
- Strohmaier W, Seilnacht J, Gernot S. Hypocitraturia and „normal“ urine pH increase risk for stone recurrence in stone formers. *Eur Urol* 2002; 1:206.
- Ryall R, Harnett R, Hibberd C, Mazzachi B, Marchall O. Urinary risk factors in calcium oxalate stone disease: Comparison of men and women. *Br J Urol* 1987; 60:480-8.
- Scwille PO, Rumenapf G, Wolfel G, Kohler R. Urinary pyrophosphate in patients with recurrent calcium urolithiasis and in healthy controls: A re-evaluation. *J Urol* 1988; 140:239-45.
- Milenković D, Petronić V, Lalić N, et al. Modified predictive risk index for urinary calculosis. In: Edit Borghi L, Micchi T, Briganti A, Schinchi T, Novarini A. Kidney stones. Proceedings of the 8<sup>th</sup> European symposium on urolithiasis. Editoriale Bios 1999; 397-9.
- Ananth K, Kavanagh JP, Walton RC, Rao PN. Enlargement of calcium oxalate stones to clinically significant size in vitro stone generator. *BJU International* 2002; 90:939-44.
- Laube N, Pulmann M, Hergarten S, Hesse A. The influence of urinary stones on the composition of a 24 h urine sample. *Clin Chem* 2003; 49:281-5.
- Laube N, Pulmann M, Hergarten S, Schmidt M, Hesse A. The alteration of urine composition due to stone material present in the urinary tract. *Eur Urol* 2003; 44:595-9.
- Brendel W, Chaussy CH, Frosmann B, Schmidt E. A new method of noninvasive destruction of renal calculi by shock waves. *BRJ Surgery* 1979; 66:197-205.

## THE EFFECT OF URINARY TRACT CALCULOSIS TO LEVELS OF LOW MOLECULAR INHIBITORS OF CRYSTALLIZATION IN THE URINE

Dragica MILENKOVIĆ<sup>1</sup>, Nataša LALIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Urology and Nephrology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade;

<sup>2</sup>Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade

## ABSTRACT

The incidence of urinary tract calculosis continuously progresses. The triggering event in the process of stone formation is decreased urinary level of crystallizing inhibitors. The aim of our study was to investigate whether the existing stone or applied therapeutic procedure - extracorporeal shock waves lithotripsy (ESWL) - has effect on urinary levels of Mg, citrate and pyrophosphate. Study included 128 patients with the upper urinary tract stones. ESWL using the Lithostar (Siemens) device was used as a mode of treatment. Out of all patients, 76 (59%) were free of stone particles before 1 month, while 52 (41%) had residual stone fragments even 3 months after ESWL. Mg, citrate and pyrophosphate were measured in 24<sup>h</sup>-

urine specimens: before, between days 2 and 3, as well as 1 and 3 months after ESWL. The analysis of the results revealed that stone itself had no effect on urinary crystallizing inhibitors. Detected increased urinary levels of Mg, citrate and pyrophosphate after ESWL, compared with pre-treatment values, could be attributed to applied therapeutic procedure.

**Key words:** urinary stone; crystallizing inhibitors; ESWL

Dragica MILENKOVIĆ  
Institut za urologiju i nefrologiju  
Klinički centar Srbije  
Resavska 51, Beograd