

Prvková analýza konkrementů močového traktu

Kuta J.¹, Machát J., Benová D., Kořistková T.

¹Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova univerzita, Brno

²Laboratoř na analýzu močových konkrementů, Brno

SOUHRN

Cíl studie: Cílem studie bylo prostřednictvím prvkové analýzy konkrementů močového traktu stanovit obsahy minoritních prvků v nich, prokázat souvislosti mezi obsahem minerálů a minoritních prvků, a tím posoudit, za jakých okolností lze použít močové konkrementy k biomonitoringu toxických/esenciálních prvků.

Typ studie: observační

Materiál a metody: 489 vzorků močových konkrementů z ČR bylo podrobena mineralogické analýze infračervenou spektrometrií a dále prvkové analýze s využitím hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Obsah prvků byl korelován s obsahem minerálů a dále byla provedena statistická analýza obsahů prvků u jednotlivých skupin minerálů.

Výsledky: Metoda ICP-MS je vhodná jak pro stanovení obsahu minoritních prvků, tak pro stanovení obsahu majoritních prvků, na jejichž základě je možno dopočítat zastoupení minerálů. Byly zjištěny asociace prvků s fosforečnanem vápenatým (Na, Zn, Sr, Ba), struvitem (K, Rb) i rozdíly v obsahu prvků v konkrementech z whewellitu a kyseliny močové.

Závěr: Močové konkrementy lze použít k monitoringu toxických/esenciálních prvků v organismu, nicméně pro spolehlivé hodnocení vlivu různých klinických faktorů (věk, pohlaví, stravovací návyky apod.) na obsah minoritních prvků je prvořadě stanovení mineralogického složení konkrementu.

Klíčová slova: močový konkrement, mineralogická analýza, prvkové složení

SUMMARY

Kuta J., Machát J., Benová D., Kořistková T.: Elemental analysis of urinary calculi

Objective: Quantification of minor elements in urinary calculi by means of elemental analysis, demonstration of the relations between mineral and minor element contents and finally evaluation of applicability of urinary stones for biomonitoring of toxic/essential elements.

Design: Observational

Material and Methods: 489 samples of urinary calculi from the Czech Republic was analyzed for mineralogical composition using infrared spectrometry and further for content of elements using inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS). Element content was statistically correlated to mineral content and differentiated according to mineral composition.

Results: ICP-MS method is suitable for quantification of minor elements as well as for major elements, whose determination enables calculation of mineral content. Two groups of elements including (Na, Zn, Sr, Ba) and (K, Rb) associate with calcium phosphate and struvite minerals, respectively. Also different content of elements in whewellite and uric acid concrements was confirmed.

Conclusion: Urinary stones can be used for monitoring of toxic/essential elements in the human body however mineralogical analysis is crucial for credible assessment of the effect of clinical factors (e.g. age, gender, eating habits, etc.) on minor element content.

Key words: Urinary calculi, mineralogical analysis, elemental composition

Úvod

Urolitiáza je časté onemocnění projevující se patologickou mineralizací močového traktu. V České republice bylo s touto diagnózou v roce 2009 hospitalizováno přes 22 tisíc pacientů [1]. Nejčastějšími složkami konkrementů močového traktu jsou šťavelany vápenaté (65,2 %) fosforečnany (18,3 %) a kyselina močová (8,7 %) [2]. Tyto složky se mohou vyskytovat čisté, většinou však tvoří směsné konkrementy. Pro léčbu má význam znalost mineralogického složení. Nejběžnější složky konkrementů uvádíme v Tabulce č. 1.

Table 1: Common constituents of urinary stones

Oxalates	
Whewellite	Ca(C ₂ O ₄).H ₂ O
Weddellite	Ca(C ₂ O ₄).2H ₂ O

Phosphates	
Carbonate apatite	Ca ₅ (PO ₄ CO ₃) ₃ (OH)
Hydroxylapatite	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)
Brushite	CaHPO ₄ .2H ₂ O
Struvite	MgNH ₄ PO ₄ .6H ₂ O
Other organic metabolites	
Uric acid	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃
Ammonium urate	NH ₄ C ₅ H ₃ N ₄ O ₃
Cystine	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂

Nejvýznamnějšími kovy v močových konkrementech jsou Ca a Mg. Od 70. let 20. století se objevuje řada prací, ve kterých je zkoumán také vliv dalších kovů na vznik konkrementů. Zpravidla se tak děje prostřednictvím stanovení obsahu zájmového kovu či kovů v konkrementu. Poté jsou hodnoceny souvislosti mezi obsa-

hem minoritního kovu a výskytem urolithiázy, přičemž u některých prvků byly pozorovány efekty podporující vznik urolithiázy (Fe, Cu), ale také efekty protektivní (Zn, Mg) [3]. Závěry těchto studií však nejsou jednoznačné.

Hodnoceny bývají také vlivy klinických faktorů na obsah prvků. Lze vycházet z předpokladu, že močové konkrementy jsou v permanentním kontaktu s močí a dochází zde k sorpci a případnému spolusrážení prvků s matricí konkrementu. Podrobná analýza konkrementů pak může poukázat na profesní expozici určitému toxickému prvku či na jeho zvýšený obsah v organismu, jako je tomu kupříkladu u rtuti díky jejímu uvolňování z amalgámových plomb [4]. Močové konkrementy lze tedy použít pro monitorovací účely podobně, jako například krev či moč [5]. Výhodou použití močových konkrementů v monitorovacích studiích pak může být fakt, že odrážejí příjem prvků v delším časovém intervalu ve srovnání s krví či močí, poněvadž konkrementy setrvávají v močovém traktu obvykle měsíce až roky do lékařského zákroku.

V mnohých publikovaných pracích však není brán v potaz další faktor, a to možná asociace minoritního prvku s určitým druhem minerálu. Opakovaně již byly prokázány asociace některých minoritních prvků, například Zn, Sr a Pb, s fosforečnanovými minerály [3, 6, 7]. Výsledky dalších prací, které hodnotí vliv mineralogického složení [3, 8, 9], kouření [10] či geografického původu [11, 12] na obsah minoritních prvků jsou tak zkrácené, protože mnohdy nízké obsahy fosforečnanových minerálů, či jejich přítomnost vůbec, zcela ignorují.

Relevantní výsledky takovýchto studií je možno získat pouze za předpokladu, že se vyloučí vliv tohoto základního faktoru, respektive pokud v dalším hodnocení bude vliv tohoto faktoru uvažován. Minoritní obsahy minerálů však unikají pozornosti běžně používaných metod mineralogické analýzy (infračervená spektrometrie, polarizační mikroskopie a rentgenová difrakce). Cílem práce je a) demonstrovat použitelnost metody stanovení minoritních obsahů fosforečnanových minerálů na základě prvkové analýzy b) demonstrovat potřebu stanovení nízkých obsahů minerálů pro to, aby mohly být zodpovědně hodnoceny další klinické faktory c) prezentovat obsahy prvků v konkrementech močového traktu v ČR a použitelnost močových konkrementů pro biomonitoring.

Materiál a metody

Vzorky

V práci bylo využito 489 vzorků získaných v letech 2009-10 laboratoří, jež se specializuje na rutinní mineralogickou analýzu konkrementů močového traktu pacientů v České republice. Vzorky byly po odběru omyty destilovanou vodou, usušeny na vzduchu a rozetřeny v achátové třecí misce. Na základě IRS analýzy byly vybrány vzorky ze skupin whewellit, kyselina močová, apatit, struvit a jejich směsi.

Mineralogické složení

Obsah minerálů byl stanoven metodou infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) na přístroji Nicolet Avatar 360 FTIR (Thermo Scienti-

fic, USA) s využitím softwaru Omnic (Thermo Nicolet Corporation, USA). Vzorky byly analyzovány ve formě tablet s bromidem draselným.

Prvkové složení

Obsah zájmových prvků byl stanoven metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP-MS) po rozkladu vzorku v $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ (25 mg vzorku + 2 ml HNO_3 + 0,2 ml H_2O_2) v PFA kádince na topné plotně. Měření obsahu prvků na ICP-MS (Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Japonsko) bylo prováděno s kolizní celou v He-módu, aby byl minimalizován vliv polyatomických interferencí na stanovení. Metodou ICP-MS byly stanoveny majoritní prvky Ca, P, Mg a minoritní Na, Al, K, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Zr, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, Pb. Z validačních parametrů byla ověřena správnost na sadě matricových referenčních materiálů biologického a minerálního původu, výtěžnost na reálných vzorcích s přidavkem analytu a opakovatelnost na sadě reálných vzorků.

Výsledky a diskuse

U všech zájmových prvků byla validací metodiky prokázána vhodnost její aplikace pro analýzu močových konkrementů. Z dalšího vyhodnocení byly vyloučeny prvky, u kterých je ve většině vzorků stanovený obsah prvku pod mezí detekce či v její blízkosti (V, Cr, Mn, Co, As, Zr, Sb, s mezemi detekce v rozsahu 0,01 – 0,1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a Cu s mezí detekce 7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Mineralogická analýza vzorků konkrementů byla provedena na přístroji FTIR, nicméně možnosti techniky FTIR jsou limitovány při spolehlivé kvantifikaci nízkých obsahů minoritních minerálů. Vzhledem k popsané asociaci některých prvků s fosforečnanovými minerály je na místě kvantifikace také nízkých obsahů fosforečnanových minerálů. Proto byly stanoveny z tohoto pohledu významné majoritní prvky na ICP-MS (Ca, Mg, P). Na základě znalosti obsahu těchto prvků a z předpokladu o chemickém složení zastoupených minerálů je možné ze stechiometrie vypočítat jejich obsah. Obsah fosforečnanů hořečnatých lze vyjádřit jako struvit, prakticky jediný fosforečnan hořečnatý, který se v konkrementech nachází. Předpokladem tedy je, že veškerý hořčík ve vzorku je přítomen v tomto minerálu. Obsah fosforečnanových minerálů s obsahem vápníku je pak možno vyjádřit jako hydroxylapatit, vypočtený z obsahu fosforu, jenž není asociován se struvitem. Funkčnost metody, využívající takového výpočtu pro stanovení obsahu minerálu (fosforečnan vápenatý, vyjádřený jako apatit) je demonstrována v obr. 1. Rozptyl výsledků je dán jak limity na straně metody početní (přítomnost jen uvažovaného minerálu), tak limity na straně metody IRS (reprezentativnost vzorku konkrementu vzhledem k jeho velikosti, homogenita tablety, problematika spolehlivé kvantifikace složek z IR spektra). Vzhledem k nejistotám obou metod (cca 10% relativně) lze prohlásit, že výsledky stanovení obsahu apatitu na základě prvkového složení jsou v dobré shodě s výsledky mineralogické analýzy metodou infračervené spektrometrie.

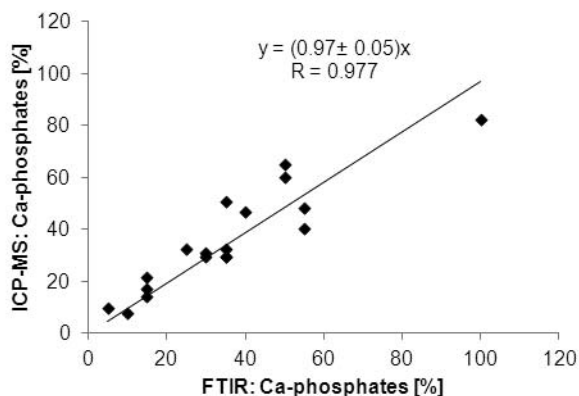


Fig. 1. Ca-phosphate mineral content: Correlation between FTIR and calculation based on ICP-MS data. Numbers in parentheses denote the slope of linear regression \pm standard deviation.

Podobně lze vypočítat obsah štavellanů vápenatých (whewellit, weddelit) a kyseliny močové, a to z obsahu vápníku, jenž není asociován s fosforečnanem vápenatým. Vzhledem k šíření chyb v tomto postupu však mají obdržené výsledky větší nejistotu (cca 20 % relativně).

Vzhledem k tomu, že metodou ICP-MS je možno stanovit obsah fosforu, hořčíku i vápníku v konkrementech spolehlivě v rozsahu již od tisícín procenta, je možno tímto způsobem stanovit i velmi nízké obsahy fosforečnanových minerálů, jenž unikají FTIR analýze. Vypočtené obsahy fosforečnanů Mg a Ca jsou následně využity pro zjištění asociace minoritních a stopových prvků s těmito minerály prostřednictvím korelačních grafů (obr. 2 a 3). V grafech jsou ze zájmových prvků uvedeny jen ty, které vykazují zřetelnou závislost jejich obsahu v konkrementu na obsahu fosforečnanového minerálu. U dalších kvantifikovaných prvků (Al, Fe, Ni, Cu, Se, Mo, Cd, Sn, Pb) nebyla taková závislost pozorována.

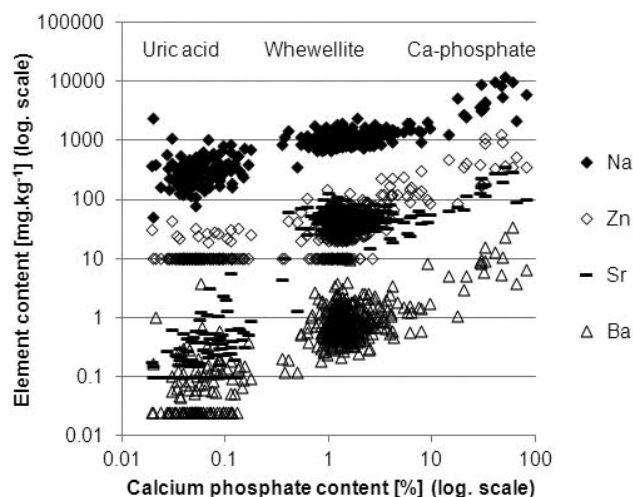


Fig. 2. Correlation between element content and calcium phosphate mineral content.

Pomocí FTIR bylo ve vzorcích stanoveno nejméně 15 % struvitu a nejméně 5 % apatitu. Stanovením majoritních prvků na ICP-MS a dopočtením obsahu minerálů tak lze vyhodnotit i obsah minerálů pod těmito hodnotami. Je však otázkou, zda lze i u nízkých dopočtených obsahů minerálů spoléhat na použité aproximace (přítomnost veškerého prvku v jednom typu minerálu), či

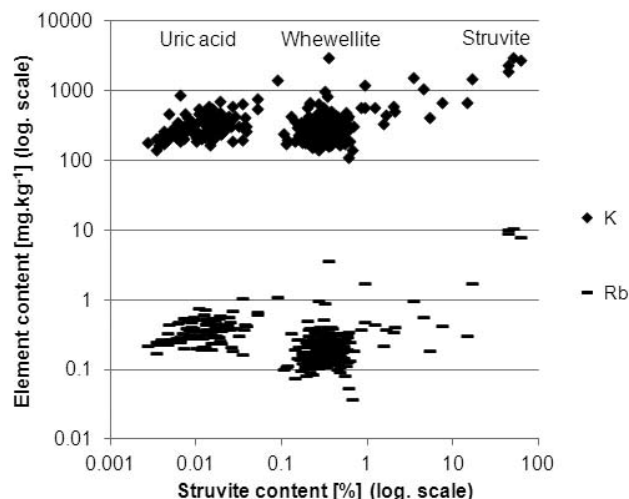


Fig. 3. Correlation between element content and struvite mineral content.

zda není prvek (fosfor, hořčík) přítomen v jiné formě, například v organických sloučeninách (zejména fosfor). Za relevantní lze použité aproximace prohlásit u vzorků s dopočteným obsahem minerálů asi od 1 %.

V této skupině vzorků (> 1 % fosforečnanového minerálu) pak lze spolehlivě pozorovat asociace minoritních prvků s minerály. Bylo zjištěno, že ve významné míře dochází k asociaci Na, Zn, Sr, Ba s fosforečnanem vápenatým (vyjádřeným jako apatit) a K a Rb se struvitem. Tyto výsledky v podstatě potvrzují asociace již dříve popsané v některých pracích [3, 6, 7], kde je zvýšený obsah prvků vysvětlován substitucí vápníku, respektive amonia, v krystalové mřížce minerálu.

Důležité u takových prvků je, že i minimální obsah fosforečnanového minerálu (zejména apatitu) ve whewellitových konkrementech, který zůstává při analýze na FTIR neidentifikován nebo ve vyhodnocení ignorován, může ovlivnit jejich obsah. Pro vyhodnocení vlivu dalších faktorů na obsah minoritního prvku v konkrementu je tak nanejvýš žádoucí, aby byl i nízký obsah fosforečnanového minerálu kvantifikován a zahrnut mezi relevantní faktory.

Vzorky kyseliny močové a whewellitu v analyzovaném souboru jsou zastoupeny převážně čistými minerály (tj. metodou FTIR identifikované jako „100 %“). Pro demonstraci případné asociace prvků s těmito dvěma typy minerálů tak není forma korelačního grafu vhodná. V dalším postupu tedy byly srovnávány rozdíly mezi obsahem prvků v těchto dvou skupinách čistých minerálů. Vzhledem k asociaci některých prvků s fosforečnanovými minerály by bylo korektní srovnávat obsahy takových prvků v souborech whewellitu a kyseliny močové se stejnými obsahy fosforečnanů (tj. <0,5 % fosforečnanu vápenatého a zároveň <0,2 % struvitu). Reálně to však není možné, protože takový je jenom 1 vzorek whewellitu. Ve whewellitových konkrementech je vždy vyšší obsah fosforu. Srovnávané soubory tedy mají následující obsahy fosforečnanových minerálů:

Kyselina močová: fosforečnan vápenatý < 0,5 %, struvit < 0,2 %

Whewellit: fosforečnan vápenatý < 3 %, struvit < 0,9 %

Table 2: Content of elements in samples of pure whewellite and uric acid stones

Element	P	Mg	Na	K	Fe	Zn	Se	Rb	Sr	Mo	Cd	Sn	Ba	Pb
	%		mg.kg ⁻¹											
Limit of Detection	0.005	0.001	50	60	5	20	0.2	0.05	0.2	0.05	0.02	0.2	0.08	0.1
Whewellite stones (n=330)														
Percentile 10%	0.204	0.020	848	192	48	<20	0.3	0.12	31.0	0.20	0.06	<0.2	0.40	2.0
Quartile 1	0.246	0.025	933	228	56	21	0.4	0.14	37.5	0.26	0.08	0.2	0.53	2.6
Median	0.288	0.031	1048	276	65	31	0.5	0.17	45.9	0.34	0.12	0.6	0.73	3.6
Quartile 3	0.343	0.038	1220	335	80	45	0.7	0.22	54.6	0.47	0.25	1.3	1.11	4.8
Percentile 90%	0.442	0.044	1400	388	103	63	1.0	0.27	67.8	0.64	0.48	2.7	1.80	6.8
Uric acid stones (n = 108)														
Percentile 10%	0.007	<0.001	164	202	<5	<20	<0.2	0.21	<0.2	<0.05	<0.02	<0.2	<0.08	<0.1
Quartile 1	0.008	0.001	209	226	<5	<20	0.2	0.26	<0.2	<0.05	<0.02	<0.2	<0.08	<0.1
Median	0.012	0.001	320	287	5	<20	0.3	0.34	0.2	0.06	<0.02	<0.2	<0.08	0.1
Quartile 3	0.018	0.002	412	371	9	<20	0.4	0.45	0.4	0.09	<0.02	<0.2	0.12	0.1
Percentile 90%	0.024	0.003	563	488	15	24	0.5	0.55	0.6	0.14	0.05	0.2	0.29	0.3
Comparison of both mineral groups														
Mann-Whitney U-test probability	<0.001		0.136		<0.001									
Whewellite/ Uric acid content	24	31	3	1	13	>2	2	0.5	229	6	>6	>3	>9	36

V Tabulce 2 jsou uvedeny obsahy prvků v těchto dvou skupinách konkrementů (10% a 90% percentil, horní a dolní kvartil, medián). Všechny prvky vykazují vyšší obsahy u whewellitových konkrementů, s výjimkou Rb a K. U kyseliny močové jsou v naprosté většině prvky pod mezí detekce, takže regulérní statistické srovnání významnosti rozdílů v obsazích prvků je problematické. Pro prvky, jejichž obsahy jsou nad mezí detekce, je poté proveden Mann-Whitneyův U-test (test výběrů, zda pocházejí ze stejného základního souboru).

Z tabulky a výsledků statistických testů tam, kde je bylo možné provést, vyplývá, že v případě všech prvků, s výjimkou draslíku, jsou rozdíly mezi skupinami konkrementů z whewellitu a kyseliny močové významné. S výjimkou rubidia a draslíku jsou obsahy všech sledovaných prvků ve whewellitových konkrementech vyšší. Jde jak o všechny prvky, které výše prokázaly asociaci s fosforečnanem vápenatým (Na, Zn, Sr, Ba), tak i o prvky, které tuto asociaci nevykázaly (Fe, Se, Mo, Cd, Sn, Pb). Podobně tomu bylo také v případě rtuti, jež byla samostatně zpracována v další studii [4]. Zvýšené obsahy prvků ve whewellitových konkrementech oproti konkrementům z kyseliny močové tak nejsou pravděpodobně způsobeny jen případnou (byť minimální) příměsí fosforečnanů vápenatých ve whewellittech. Kyselina močová zřejmě nemá schopnost vázat kovy do svojí struktury.

V případě sodíku a draslíku je situace mírně rozdílná – vzhledem k jejich podstatně vyšší koncentraci v moči (Na cca 150 mmol.l⁻¹, K 50 mmol.l⁻¹) jsou obsaženy v močových konkrementech obojího druhu. Vyšší

obsah Na ve whewellitových konkrementech odpovídá schopnosti výměny za Ca v krystalové mřížce oxalátu. Porovnání obsahů Na a K v kamenech a běžných koncentrací těchto prvků v moči však napovídá, že v případě draslíku dochází u kamenů z kyseliny močové k jeho obohacení v matici, podobně, jako je tomu u rubidia (vyšší obsah v konkrementech z kyseliny močové). Příčinou zde může být koexistence močanu amonného v konkrementu spolu s kyselinou močovou, kdy jsou amonné ionty nahrazovány podobně velkými ionty draslíku či rubidia. Stejným mechanismem je vysvětlován vyšší obsah K i Rb v případě struvitu [7].

Závěr

Prvková analýza konkrementů močových cest se jeví jako vhodný nástroj pro studium dlouhodobého příjmu, respektive vylučování, toxických a esenciálních prvků organismem. Lze např. srovnávat skupiny s různým geografickým původem, zaměstnáním či stravovacími návyky. Nicméně výsledky analýzy souboru vzorků ukazují, že srovnávání jakýchkoli obsahů prvků v močových konkrementech musí být doprovázeno kritickou analýzou obsahu minerálů ve zkoumaném souboru. Nízké obsahy fosforečnanových minerálů, které unikají rutinní analýze infračervenou spektrometrií, mohou být kvantifikovány za pomoci metody ICP-MS. I jejich minimální zastoupení v konkrementu ovlivní obsah prvků, asociujících se s fosforečnanem. Rozdíly mezi obsahy jsou však i u prvků, které se s fosforečnanem neasociují.

Jakékoli hodnocení obsahu prvků v souborech vzorků bez přesné znalosti jejich mineralogického složení tedy není seriózní.

Literatura

1. Zdravotnická ročenka ČR 2009. ÚZIS ČR, 2010. ISSN 1210-9991.
2. **Daudon, M., Doré, J. C., Jungers, P., Lacour, B.** Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach. *Urol. Res.* 2004, 32 (4), p. 241-247.
3. **Bazin, D., Chevallier, P., Matzen, G., Jungers, P., Daudon, M.** Heavy elements in urinary stones. *Urol. Res.* 2007, 35(4), p. 179-184.
4. **Kuta, J., Machát, J., Benová, D., Červenka, R., Kořistková, T.** Urinary calculi – atypical source of information on mercury in human biomonitoring. *Cent. Eur. J. Chem.* 2012, 10 (5), p.1475-1483.
5. **Spěváčková, V., Krsková, A., Čejchanová, M., Wranová, K., Šmíd, J., Černá, M.** Biologický monitoring v České republice – stopové prvky a profesionálně neexponovaná populace. *Klin. Biochem. Metab.* 2011, 19 (2), p. 101-107.
6. **Pal'chik, N. A., Moroz, T. N., Maksimova, T. N., Dar'in A. V.** Mineral and Microelement Compositions of Urinary Stones. *Russ. J. Inorg. Chem.* 2006, 51 (7), p. 1098–1105.
7. **Moroz, T. N., Palchik, N. A., Dar'in, A. V.** Microelemental and mineral compositions of pathogenic biomineral concretions: SRXFA, X-ray powder diffraction and vibrational spectroscopy data. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A-Accel. Spectrom. Dect. Assoc. Equip.* 2009, 603 (1-2), p. 141-143.
8. **Pineda, C. A.; Peisach, M.** Micro-analysis of kidney stones sequentially excreted from a single patient. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B-Beam Interact. Mater. Atoms.* 1994, 85 (1-4), p. 896-900.
9. **Pineda, C. A.; Rodgers, A. L., Prozesky, V. M., Przybyłowicz, W. J.** Elemental mapping analysis of recurrent calcium oxalate human kidney stones. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B-Beam Interact. Mater. Atoms.* 1995, 104 (1-4), p. 351-355.
10. **Stojewski, M., Czerny, B., Safranow, K. et al.** Does smoking have any effect on urinary stone composition and the distribution of trace elements in urine and stones? *Urol. Res.* 2009, 37 (6), p. 317-322.
11. **Pineda-Vargas, C. A.; Rodgers, A. L.; Eisa, M. E.** Nuclear microscopy of human kidney stones, comparison between two population groups. *Radiat. Phys. Chem.* 2004, 71 (3-4), p. 947-950.
12. **Pineda-Vargas, C. A., Eisa, M. E. M., Rodgers, A. L.** Characterization of human kidneystones using microPIXE and RBS: A comparative study between two different populations. *Appl. Radiat. Isotopes*, 2009, 63 (3), p. 446-468.

Práce byla finančně podporována Grantovou agenturou České republiky prostřednictvím grantu GA203/09/1394.

Do redakce došlo 9. 5. 2012

Adresa pro korespondenci:

*Mgr. Jan Kuta
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí
Masarykova univerzita
Kamenice 126/3
625 00 Brno
e-mail: kuta@recetox.muni.cz*