

ODNOS KONCENTRACIJA OKSALATA I CITRATA U URINU ISPITANIKA SA BUBREŽNIM KAMENCIMA

RELATION OF OXALATE AND CITRATE CONCENTRATION
IN URINE OF THE EXAMINEES WITH KIDNEY STONES

Snežana Uletilović, Biljana Davidović, Živko Saničanin

Sažetak. Koncentracije oksalata i citrata u urinu su određene u grupi 60 ispitanika, oba pola i starosti od 25 do 55 godina. Eksperimentalna grupa se sastojala od 30 ispitanika koji su imali bubrežne kamence, a kontrolna od 30 zdravih ispitanika. U ispitanika eksperimentalne grupe utvrđene su značajno više koncentracije oksalata ($p < 0,01$) i značajno niže koncentracije citrata ($p < 0,01$), nego u kontrolnoj grupi. Utvrđena je i negativna korelacija između nivoa oksalata i citrata u urinu ispitanika eksperimentalne grupe.

Ključne riječi: Oksalati, Citrati, Bubrežni kamenci

Uvod

Bolest, uslovljena bubrežnim kamencima, je česta u industrijalizovanim zemljama. Učestalost ove bolesti u muškaraca je do 15%, a u žena do 6% [1]. Bubrežni kamenci se javljaju kao rezultat ugrađivanja mineralnih kristala u matriks proteina, što uzrokuje opstrukciju mokraćnih puteva, naročito uretre i uretera i javljanje bubrežnih kolika [2]. Od mineralnih kristala njačešći su minerali kalcijuma, (85 do 95%), a od minerala kalcijuma pretežno oksalati (78 do 80%) [3,4].

Hiperoksalaturija, najčešći uzrok kamenaca koji sadrže kalcijum, je rezultat pojačanog katabolizma glicina i cisteina (oko 40%) i askorbinske kiseline (oko 40%), a manjim dijelom (oko 10%) uslovljena je konzumiranjem hrane bogate oksalatima [5,6].

Citrati, koji u humanom organizmu nastaju ciklusom trikarbonskih kiselina, ili se unose hranom, mogu inhibitorno da utiču na obrazovanje kalcijum-oksalatnih kamenaca, jer sa kalcijumovim jonima grade rastvorljive kompleksne soli [7,8]. Kako se i oksalatni i citratni joni konkurentno vežu

za kalcijumove jone gradeći soli različite rastvorljivosti [9], izvjesno je da nastanak bubrežnih kamenaca, kalcijum-oksalatnog sastava, zavisi od odnosa koncentracija oksalata i citrata u urinu.

Cilj rada je bio da se odrede koncentracije oksalata i citrata u urinu ispitanika, koji su najmanje jednom imali bubrežne kolike uslovljene bubrežnim kamencima, i da se utvrdi da li između tih koncentracija postoji korelacija, na osnovu čega bi mogla da se izvrši prevencija nastanka bubrežnih kamenaca ishranom ili uzimanjem citratnih zamjena.

Ispitanici i metode

U istraživanje je bilo uključeno 60 ispitanika, oba pola i starosti od 25 do 55 godina. U eksperimentalnoj grupi je bilo 30 ispitanika, koji su najmanje jednom imali bubrežne kolike uslovljene bubrežnim kamencima, a u kontrolnoj grupi je bio isti broj zdravih ispitanika. Od ispitanika je za istraživanje uzet prvi jutarnji urin i do određivanja

čuvan na -25°C . Relevantni podaci o zdravstvenom stanju ispitanika su dobijeni upitnikom.

Koncentracija oksalata, u urinu ispitanika obe grupe, je određena spektrofotometrijski [10], a za određivanje citrata prilagođena je enzimska metoda Welshmana i McCambridgea [11]. Uzorci urina, korišćenjem ove metode i prije određivanja citrata, su jednokratno odmrzavani i centrifugiranjem im je odvajan sediment. Potom je zapremina urina od 0,1 mL, razblaženog destilovanom vodom u odnosu 1:10, uzimana u epruvetu u kojoj se nalazilo 0,9 mL tris-HCl pufera, pH 8,2 i koncentracije 0,15 mol/L i 1 mL radnog reagensa. Korišćen je, pri svakoj seriji određivanja, svjež radni reagens i on se sastojao iz 0,05 mL tris-HCl pufera, koncentracije 1 mol/L i pH 8,2, iz 0,5 mL rastvora ZnSO_4 koncentracije 0,4 mmol/L, iz 0,4 mL rastvora $\text{NADH}^+ \text{H}^+$, koncentracije 0,5 mol/L i iz 0,05 mL rastvora malat dehidrogenaze (MDH), koncentracije 0,1 g/L.

Slijepa proba je pripremana na isti način, s tim što je umjesto urina uzimana ista zapremina destilovane vode. Za pripremanje standardnog dijagrama je korišćeno 5 različitih koncentracija limunske kiseline (0,375; 0,75; 1,5; 3,0 i 6 mmol/L) koje su pripremane na identičan način za mjerenje kao i uzorci urina.

Nakon dodatka pufera i radnog reagensa urinu standardu ili slijepoj probi, smjese su ostavljane 5 do 10 minuta, na sobnoj temperaturi, radi uspostavljanja ravnoteže. Nakon toga vršeno je spektrofotometrijsko očitavanje apsorbance na 340 nm u odnosu na vazduh. Poslije očitavanja apsorbance uzorcima je dodavano po 0,02 mL rastvora citratliaze (0,3 mg citratliaze u rastvoru 0,02 mL tris-HCl pufera, koncentracije 0,15 mol/L, rastvor stabilan 6 časova na 4°C) i vršena je inkubacija 5 do 8 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je očitavana apsorcija na istoj talasnoj dužini, kao i ranije, pri čemu je registrovano njeno minimalno sniženje. Na osnovu standardnog dijagrama i smanjenja apsorcije izračunate su koncentracije citrata u uzorcima urina koje su potom korigovane faktorom razblaženja.

Rezultati su analizirani standardnim statističkim metodama i izraženi kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Značajnost razlika, utvrđenih vrijednosti među grupama, je određena Student t-testom.

Rezultati

Srednje vrijednosti koncentracija oksalata, za ispitanike kontrolne i eksperimentalne grupe, su predstavljene u tabeli 1. Može se uočiti da su srednje vrijednosti za eksperimentalnu grupu statistički značajno više ($p < 0,01$).

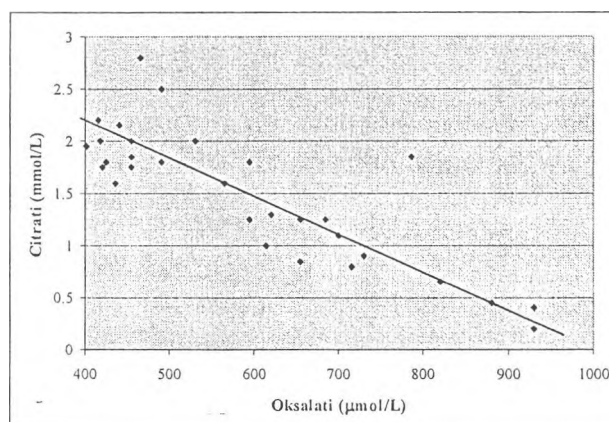
Tabela 2 pokazuje da su utvrđene i signifikantno više srednje vrijednosti citrata u urinu ispitanika koji nisu imali problema sa bubrežnim kamencima i koji predstavljaju kontrolnu grupu u odnosu na ispitanike koji su imali bubrežne kolike uslovljene bubrežnim kamencima i koji predstavljaju eksperimentalnu grupu ($p < 0,01$).

Tabela 1. Vrijednosti koncentracija oksalata u urinu ispitanika kontrolne i eksperimentalne grupe

Grupe (n=30)	Vrijednosti oksalata ($\mu\text{mol/L}$)	
Kontrolna	419 \pm 195	$p < 0,01$
Eksperimentalna	591 \pm 205	$p < 0,01$

Tabela 2. Vrijednosti koncentracija citrata u urinu ispitanika kontrolne i eksperimentalne grupe

Grupe (n=30)	Vrijednosti oksalata (mmol/L)	
Kontrolna	3,09 \pm 0,96	$p < 0,01$
Eksperimentalna	1,48 \pm 0,56	$p < 0,01$



Slika 1. Korelacija vrijednosti koncentracija oksalata i citrata u urinu grupe ispitanika koji imaju bubrežne kamence ($r = -0,78$)

Na slici 1 je predstavljena korelacija koncentracija oksalata i citrata u urinu ispitanika eksperimentalne grupe. Kako se, i jedni i drugi joni u urinu konkurentno vežu za iste, kalcijumove jone, povećanje koncentracije jednih izaziva smanjenje koncentracije drugih, odnosno između njih postoji negativna korelacija sa koeficijentom $r = -0,78$.

Diskusija

Vrijednosti koncentracija oksalata i za kontrolnu i za eksperimentalnu grupu, dobijeni spektrofotometrijskim određivanjem, su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim enzimskim određivanjem [12]. Vrijednosti oksalata ispitanika eksperimentalne grupe u odnosu na vrijednosti kontrolne grupe su značajno više, jer od 30 ispitanika eksperimentalne grupe njih 23 (76,7%) je imalo hiperoksalaturiju (koncentracija oksalata u 24-časovnom urinu veća od 890 μmol) [13].

Dobijene vrijednosti koncentracija citrata u urinu ispitanika eksperimentalne grupe su statistički značajno niže nego u ispitanika kontrolne grupe, a i jedne i druge vrijednosti su istog nivoa kao kod ranijih istraživanja [6,14]. U eksperimentalnoj grupi hipocitaturiju (koncentracija citrata u 24-časovnom urinu manja od 1,6 mmol) je imalo 16 od 30 ispitanika (53,3%), što je nešto više od vrijednosti koje je utvrdio Akinci sa saradnicima [15] i značajno više od rezultata koje je dobio Ooster (33,0%) [16].

Kako su oksalati glavni promotori, a citrati glavni inhibitori nastajanja kalcijum-oksalata dobijeni rezultati su potvrdili pretpostavku da su njihove koncentracije u urinu međusobno povezane i da povećanje koncentracije jednih uslovljava smanjenje koncentracije drugih i obrnuto, jer se konkurentno vežu za iste katjone, kalcijumove jone. Promjena koncentracije citratnih jona izaziva promjenu i drugog značajnog promotora kalcijum-oksalatnih kamenaca, a to je nizak pH. Pošto su citrati uglavnom vezani za katjone kalijuma, koji doprinose bazičnosti, to sniženje koncentracije citrata snižava, a povećanje koncentracije citrata povećava pH urina. Povezanost koncentracija oksalata i citrata u urinu ispitanika eksperimentalne grupe je očigledna sa slike 1, koja pokazuje njihovu visoku negativnu korelaciju, sa koeficijentom korelacije $r = -0,78$. Slika, takođe, pokazuje da 7 ispitanika eksperimentalne grupe (23,3%) ima

visoku koncentraciju citrata, što znači da su i u njih, najvjerovatnije, prisutni neoksalatni kamenci.

Zaključak

Narušavanje odnosa koncentracija oksalata i citrata u urinu u korist oksalata je primarni uzrok nastanka kalcijum-oksalatnih kamenaca. Otkrivanje takvog odnosa, mjerenjem njihovih koncentracija, može da posluži u prevenciji nastajanja ili obnavljanja kamenaca te etiologije.

Endogene izvore kalcijum-oksalatnih kamenaca je teško eliminisati ili smanjiti, jer su oni genetski uslovljeni vrstom metabolizma.

Egzogeni izvori oksalata mogu da se maksimalno redukuju izbjegavanjem prehrambenih namirnica koje sadrže oksalate, kao što su, na primjer, čokolada, pomorandže, bobičasto voće, jabuke, orasi, kafa, čaj, biber, grah, spanać, vitamin C, gazirana pića (razne vrste, tzv. kola).

Koncentracija citrata u urinu može da se poveća unošenjem citratnih zamjena, kao što je npr. kalijum-citrat koji, pošto bazno hidrolizuje, povećava i pH urina, ali unošenje mora da bude kontrolisano, jer predoziranje može da izazove hiperkalijemiju.

Literatura

1. Bihl G, Mayers A. Recurrent renal stone disease - advances on pathogenesis and clinical management. *Lancet*. 2001; 358: 651-5.
2. Moyad MA. Calcium oxalate kidney stones: another reason to encourage moderate calcium intakes and other dietary changes. *Urol Nurs*. 2003; 23: 310-3.
3. Komberly G, Laurie B, Saeed R, Hassan E. Monohydrate: effect of urinary species. *J Colloid Inter Sci*. 2002; 256: 168-74.
4. Barbas C, Garcia A, Saavedra L, Muros M. Urinary analysis of nephrolithiasis markers. *J Chrom B*. 2002; 781: 433-55.
5. Halbe A, Shor R, Wong N, Sutton A. Effect of vitamin D3 on the conversion of ethylene glycol to glycolate and oxalate in ethylene glycol-fed rats. *Clin Chim Acta* 2003; 330: 135-9.
6. Tekin A, Tekgul S, Necmentin A, Mehmet B, Sezer K. J Children with calcium urolithiasis. *Urol*. 2002; 168: 2572-4.
7. Canderella R, Vescini F, Buffa A, Stefani S. Citrate and mineral metabolism: kidney stones and bone disease. *Front Biosci*. 2003; 8: 1084-106.

8. Greischar A, Nakagawa Y, Coe F. Influence of urinary pH and citrate concentration on the upper limit of metastability for calcium phosphate. *J Urol.* 2003; 169: 867-70.
9. Massey LK. Dietary influences on urinary oxalate and risk of kidney stones. *Front Biosci.* 2003; 8: 584-94.
10. Uletilović S, Saničanin Ž, Nalesnik M. Spektrofotometrijsko određivanje nivoa oksalata u urinu. *Glas Hem Teh RS.* 2003; 44: 421-5.
11. Welshman SG, McCambridge H. The estimation of citrate in serum and urine using a citrate lyase technique. *Clin Chim Acta.* 1973; 46: 243-6.
12. Thode J, Amyx C, Valdes R, Kessler G. Effect of tetrasodium EDTA on enzymatic determinations of urinary oxalate. *Clin Chem.* 1987; 33: 833-5.
13. Bhairvi U, Trivedi MD. Newphrolithiasis: How it happens and what to do about it. *Postgrad Med.* 1996; 100: 1-16.
14. Pak YC. Citrate and renal calculi. *Miner Eelect Met.* 1994; 20: 371-7.
15. Akinci M, Esen T, Kocak T, Ozsoy C, Tellaloglus. Role of inhibitor deficiency in urolithiasis. I. Rationale of urinary magnesium, citrate, pyrophosphate and glycosaminoglycan determinations. *Eur Urol.* 1991; 19: 240-3.
16. Osther PJ. Citrate and kidney stones. *Ugeskr Laeger.* 1993; 22: 3835-9.
17. Pak YC, Haller J, Pearle M, Odvina C, Poindexter J, Petersson R. Prevention of stone formation and bone loss in absorptive hypercalciuria by combined dietary and pharmacological interventions. *J Urol.* 2003; 169: 265-9.

Summary. Oxalate and citrate concentration in urine were determined in the group of 60 examinees, both males and females, age between 25 and 55. Experimental group consisted of 30 examinees who had kidney stones, and 30 healthy examinees were in the control group. In the examinees from experimental group there were established significantly higher oxalate concentrations ($p < 0,01$) and significantly lower citrate concentrations ($p < 0,01$), than in the control group. It was also established a negative correlation between the oxalate and citrate level in the urine of examinees from experimental group.

Key words: Oxalates, Citrates, Kidney stones

Snežana Uletilović, Biljana Davidović, Živko Saničanin,
Katedre za medicinsku hemiju i biohemiju, Medicinski fakultet Banja Luka