

Aleksandra Brewczyńska, Sławomir Lewicki

Received: 07.05.2018

Accepted: 28.05.2018

Published: 29.06.2018

Analiza składu kamieni moczowych

An analysis of the composition of kidney stones

Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Biologii Komórki, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii im. Generała Karola Kaczkowskiego, Warszawa, Polska

Adres do korespondencji: Aleksandra Brewczyńska, Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Biologii Komórki, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa, tel.: +48 261 816 141, e-mail: brewczynska.a@gmail.com

Department of Regenerative Medicine and Cell Biology, The General Karol Kaczkowski Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland

Correspondence: Aleksandra Brewczyńska, Department of Regenerative Medicine and Cell Biology, The General Karol Kaczkowski Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Kozielska 4, 01-163 Warsaw, Poland, tel.: +48 261 816 141, e-mail: brewczynska.a@gmail.com

Streszczenie

Występowanie kamieni w układzie moczowym pacjenta to objaw zachodzącego procesu chorobowego, w efekcie którego dochodzi do wytrącania związków chemicznych i formowania się złożeń. Szacuje się, że formowanie się kamieni dotyczy nawet 10% populacji, a znalezienie pierwszego złożeń wiąże się z 25-procentowym prawdopodobieństwem nawrotu ich formowania w okresie 10 lat. Wobec tego z punktu widzenia diagnostyki bardzo ważna jest analiza każdego złożeń wydalonego samoistnie lub usuniętego operacyjnie. Szczegółowe określenie struktury i składu chemicznego kamieni pozwala ustalić przyczynę ich powstawania, wybrać właściwą metodę leczenia oraz zmodyfikować dietę chorego, a co za tym idzie – zapobiec nawrotom formowania złożeń. Znanych jest wiele sposobów badania kamieni moczowych, takich jak: jakościowa analiza chemiczna, mikroskopia polaryzacyjna, skaningowa mikroskopia elektronowa, spektroskopia w podczerwieni i tomografia komputerowa. W niniejszej pracy omówiono techniki analizy kamieni moczowych ze wskazaniem wad i zalet każdej z nich. W obecnym stanie wiedzy najskuteczniejsza wydaje się zwłaszcza spektroskopia w podczerwieni – jako szybka i precyzyjna metoda pomiarowa. Należy jednak pamiętać, że w diagnostyce kluczowe znaczenie ma podejście kompleksowe, a więc stosowanie kilku różnych metod badawczych, gdyż tylko ich równoczesne wykorzystanie pozwala porównać otrzymane wyniki i uzyskać pełną informację o stanie chorego. Współcześnie w celu usprawnienia identyfikacji złożeń i szybkiego wdrożenia odpowiedniej terapii badacze poszukują nowych, innowacyjnych metod badania kamieni moczowych, takich jak nanoskalowa cytometria przepływowa. Prace nad udoskonaleniem aktualnie stosowanych oraz poszukiwanie nowych – szybkich i skutecznych – technik badawczych dają nadzieję na wytypowanie jednej unikalnej metody, kompleksowo oceniającej kamień pobrany od pacjenta.

Słowa kluczowe: diagnostyka, kamienie moczowe, spektroskopia w podczerwieni, tomografia komputerowa

Abstract

The presence of stones in the patient's urinary tract is a sign of a disease process leading to the precipitation of chemical compounds and formation of deposits. It is estimated that kidney stone formation affects up to 10% of population, and the first identified deposit is associated with 25% risk of recurrence within 10 years. Therefore, it is very important from the diagnostic point of view to analyse every spontaneously excreted or surgically removed stone. Precise determination of the structure and chemical composition of stones allows to identify the reasons of their formation, choose appropriate treatment method and modify patient's diet, and thus prevent recurrence. A number of methods have been developed for the analysis of urinary stones, such as qualitative chemical analysis, polarised light microscopy, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and computed tomography. The paper discusses different analytic techniques for the evaluation of kidney stones, including their advantages and limitations. In the current state of knowledge, infrared spectroscopy seems to be the most effective, rapid and precise measuring technique. It should be noted, however, that a comprehensive approach, i.e. the use of several different techniques, is of key importance in the diagnosis, as only their simultaneous use allows to compare the obtained results and obtain full information about the patient's condition. Innovative methods for the analysis of kidney stones, such as nanoscale flow cytometry, are currently sought to improve deposit identification and rapid implementation of appropriate treatment. Works to improve the currently used techniques as well as the search for new quicker and more effective methods give rise to hopes that a single unique method for a comprehensive assessment of stones collected from patients will be selected.

Keywords: diagnosis, kidney stones, infrared spectroscopy, computed tomography

Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (European Association of Urology, EAU) u każdego pacjenta ze wstępnym rozpoznaniem kamicy nerkowej należy oznaczyć skład chemiczny przynajmniej jednego złoгу wydalonego z układu moczowego samoistnie lub usuniętego operacyjnie⁽¹⁾. Podobny pogląd wyrażają zajmujący się kamicą nefrolodzy, zwłaszcza nefrolodzy dziecięcy, gdyż u każdego dziecka z kamicą w układzie moczowym powinno się wykonać szczegółową diagnostykę w zakresie metabolicznego podłoża choroby⁽²⁾. W analizie kamieni nerkowych kluczowe znaczenie ma badanie ich struktury oraz składu pierwiastkowego, które umożliwia identyfikację rodzaju złoгу. Pozwala to na sklasyfikowanie rodzaju kamicy nerkowej oraz na odpowiednie dobranie i ukierunkowanie leczenia⁽²⁾. Skład kamieni moczowych jest bardzo różnorodny. Mogą się one składać ze szczawianów wapnia lub fosforu, moczanów, kryształów kwasu moczowego, fosforanu amonowo-magnezowego (struwitu), węglanu wapnia, kryształów cystynowych bądź kryształów krzemowych⁽³⁾. Dokładne określenie struktury i składu chemicznego kamieni moczowych jest trudne, jednak z punktu widzenia diagnostyki informacja na temat rodzaju powstałych złoгу pomaga ustalić przyczynę ich powstawania, dobrać odpowiednią metodę leczenia oraz zweryfikować dietę chorego, co z kolei powinno się przyczyniać do zapobiegania nawrotom choroby⁽⁴⁾.

Istnieje wiele sposobów identyfikacji kamieni moczowych, wydaje się jednak, że najskuteczniejsze jest podejście kompleksowe, uwzględniające zastosowanie różnych technik, takich jak: jakościowa analiza chemiczna, mikroskopia polaryzacyjna, skaningowa mikroskopia elektronowa, spektroskopia w podczerwieni i tomografia komputerowa.

JAKOŚCIOWA ANALIZA CHEMICZNA

Badanie składu chemicznego złoгу ma istotne znaczenie w wyborze odpowiedniego sposobu leczenia i zaplanowaniu dalszej diagnostyki. Metodą powszechnie stosowaną w polskich laboratoriach do identyfikacji głównych składników mineralnych kamieni jest jakościowa analiza chemiczna. Analizie podlega zawartość następujących składników: szczawianu wapnia, fosforanu wapnia, fosforanu magnezowo-amonowego, kwasu moczowego, moczanów, cystyny. Badanie polega na dodaniu odpowiednich odczynników do dokładnie zmielonej próbki kamienia, rozpuszczonej w wodzie destylowanej. Zastosowanie selektywnych odczynników oraz analiza zachodzących reakcji, związana ze zmianą zabarwienia próbki, wytrąceniem się osadów lub wydzielaniem pęcherzyków gazu, pozwalają ustalić obecność poszczególnych jonów wchodzących w skład analizowanego kamienia^(5,6). Zwykle do celów analizy wystarczający jest niewielki kamień o średnicy 2–3 mm. Wiele kamieni ma strukturę dwuskładnikową lub wieloskładnikową, dlatego zaleca się pobieranie próbek z dwóch części kamienia, tj. z warstwy zewnętrznej oraz z jądra⁽⁷⁾. Obecnie przeważa pogląd, że w przypadku, gdy kamienie zawierają więcej niż

According to the European Association of Urology (EAU), chemical composition of at least one kidney stone spontaneously excreted or surgically removed from the urinary tract should be assessed in each patient with the preliminary diagnosis of urolithiasis⁽¹⁾. A similar opinion is expressed by nephrologists dealing with this disease, paediatric nephrologists in particular as detailed diagnosis to identify the metabolic cause of the disease should be performed in each child with urolithiasis⁽²⁾. The analysis of kidney structure and elemental composition, which allows for the identification of the type of deposits, is of key importance for the evaluation of kidney stones. This enables determination of the type of urolithiasis as well as appropriate selection and targeting of treatment⁽²⁾. The composition of kidney stones may vary significantly. They may consist of calcium oxalates or phosphorus, urate, uric acid crystals, magnesium ammonium phosphate (struvite), calcium carbonate, cystine crystals or silicon crystals⁽³⁾. Although accurate determination of the structure and chemical composition of kidney stones is difficult, from the diagnostic point of view it helps determine the cause of their formation, select appropriate treatment method as well as verify patient's diet, which may in turn prevent disease recurrence⁽⁴⁾.

Although there are many methods for the identification of kidney stones, it seems that the comprehensive approach including different techniques, such as qualitative chemical analysis, polarised light microscopy, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and computed tomography, is most effective.

QUALITATIVE CHEMICAL ANALYSIS

An analysis of the chemical composition of deposits is important for the choice of appropriate treatment method and for the planning of further diagnosis. Qualitative chemical analysis is a method widely used in Polish laboratories to identify the main mineral components of stones. The following components are analysed: calcium oxalate, calcium phosphate, magnesium ammonium phosphate, uric acid, urate, cystine. The analysis involves adding appropriate reagents to a finely ground specimen of stone dissolved in distilled water. The use of selective reagents and the analysis of reactions associated with changes in the colour of the sample, precipitation or formation of gas bubbles allow to determine the presence of different ions included in the analysed kidney stone^(5,6). A small kidney stone about 2–3 mm in diameter is usually sufficient for the analysis. There are many stones with two- or multiple-component structure; therefore sample collection from two parts of the stone, i.e. from the external layer and the core, is recommended⁽⁷⁾. Currently, the prevailing view is that if stones contain more than one type of material (inhomogeneous kidney stones), precise information on their structure may be obtained only from physical analysis, while chemical analysis is only supplementary⁽⁸⁾. It should be noted that

jeden minerał (kamienie niejednorodne), dokładne informacje odnośnie do ich budowy może przynieść tylko analiza fizyczna, analiza chemiczna stanowi zaś jedynie jej uzupełnienie⁽⁸⁾. Należy bowiem pamiętać, że analizy chemiczne są stosunkowo niedokładne ze względu na fałszywie pozytywne i fałszywie negatywne wyniki i nie pozwalają na rozróżnienie kamieni pod kątem występowania różnych faz krystalicznych⁽⁹⁾.

Wśród dostępnych metod analizy kamieni moczowych tradycyjnie stosowana jest analiza chemiczna ze względu na łatwość wykonania i niski koszt, choć ta technika jest czasochłonna i wymaga dużej ilości materiału⁽¹⁰⁾. Według niektórych autorów metody chemiczne analizy składu kamieni wykazują stopień błędu na poziomie 6,5–94%, co potwierdza ich dużą niespecyficzność⁽¹¹⁾.

Wytyczne EAU klasyfikują metodę analizy chemicznej jako przestarzałą i zalecają używanie innych metod analiz składu kamieni. Specjalistyczne laboratoria wykonujące analizę kamieni nerkowych powinny być zatem wyposażone w dodatkowe urządzenia do analiz, takie jak mikroskop polaryzacyjny, dyfraktometr rentgenowski, spektroskop w podczerwieni⁽¹²⁾.

MIKROSKOPIA

Mikroskopia, zarówno optyczna, jak i elektronowa, stanowi użyteczne narzędzie do obserwacji kamieni moczowych. Pozwala szybko uzyskać wiele informacji o badanych próbkach, które można dalej przetwarzać i wizualizować. Metoda ta umożliwia ponadto – na podstawie analizy różnych własności fizycznych i optycznych ocenianego materiału – określenie sposobu krystalizacji i formy występowania faz mineralnych, ustalenie składu pierwiastkowego, a co za tym idzie – identyfikację i klasyfikację rodzaju złogów. Uzyskane wyniki pozwalają decydować o dalszym toku postępowania z zastosowaniem kolejnych narzędzi diagnostycznych oraz odpowiednim ukierunkowaniu leczenia^(13,14). Poniżej omówiono dwa rodzaje mikroskopii stosowane najczęściej do oceny składu kamieni nerkowych.

Mikroskopia polaryzacyjna

W 1947 roku Prien i Frondel wskazali mikroskopię polaryzacyjną jako narzędzie do identyfikacji składników krystalicznych kamieni moczowych na podstawie pomiaru współczynnika załamania światła⁽¹⁵⁾. Zastosowanie polaryzacyjnej mikroskopii optycznej umożliwia ocenę fizycznych i strukturalnych cech kamieni moczowych na podstawie różnicy we właściwościach optycznych^(16,17). Działanie mikroskopu optycznego opiera się na zjawisku dwójłomności substancji. Obraz powstaje w wyniku nałożenia na siebie dwóch wiązek światła spolaryzowanego. W urządzeniu występują dwa polaryzatory liniowe ustawione do siebie pod kątem 90°. Jeżeli w badanym obiekcie znajdują się obszary zdolne do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego, to interferencja

chemical analysis is relatively inaccurate due to false positive and false negative results and does not allow for the differentiation between kidney stones in terms of different crystalline phases⁽⁹⁾.

Among the available methods for the analysis of kidney stones, chemical analysis is traditionally used due to its easy application and low costs, although it is time-consuming and requires large amounts of material⁽¹⁰⁾. According to some authors, chemical analyses of kidney stone composition have a high error rate ranging between 6.5 and 94%, which confirms their high non-specificity⁽¹¹⁾.

The EAU guidelines classify chemical analysis as outdated and recommend other analytic techniques for the evaluation of kidney stones. Therefore, specialist laboratories performing kidney stone analysis should be fitted with additional analytical equipment, such as a polarised light microscope, an X-ray diffractometer, an infrared spectroscopy⁽¹²⁾.

MICROSCOPY

Both optical and electron microscopy are a useful tool for the observation of kidney stones. They allow for rapid acquisition of data on the analysed samples, which may be further processed and visualised. Furthermore, based on the analysis of different physical and optical properties of the evaluated material, it is possible to determine the type of crystallisation and the forms of mineral phases, elemental composition, and thus to identify and classify the type of deposits. The obtained results allow to decide about further management using other diagnostic tools as well as to choose appropriate course of treatment^(13,14). Two most common types of microscopy used for the assessment of kidney stone composition are discussed below.

Polarised light microscopy

In 1947, Prien and Frondel proposed polarised light microscopy as a tool for the identification of crystal components of kidney stones based on the measurement of refractive index⁽¹⁵⁾. The use of polarised light microscopy allows for the assessment of physical and structural features of kidney stones based on different optical properties^(16,17). Optical microscopy is based on the phenomenon of birefringence of a substance. The image is created by overlapping of two polarised light beams. There are two linear polarisers inclined to each other at angle of 90° in the device. If the investigated object contains areas capable of rotating the plane of polarised light, then the interference of the penetrating beam with the reference beam will result in the visualisation of these areas in the microscopic image⁽¹⁸⁾. The possible assessment of mineral phases (the manner of crystallisation) as well as the possible analysis of small amounts of material render polarised light microscopy superior to chemical methods⁽¹⁹⁾.

wiązki penetrującej z wiązką odniesienia spowoduje uwidocznienie tych obszarów w obrazie mikroskopowym⁽¹⁸⁾. Zdolność do oceny występowania faz mineralnych (sposobu krystalizacji), jak również możliwość analizy małej ilości materiału stanowią o wyższości mikroskopii polaryzacyjnej nad metodami chemicznymi⁽¹⁹⁾.

Mikrofotografie powstałe w świetle odbitym spolaryzowanym mogą także służyć do wyboru reprezentatywnych fragmentów próbek do kolejnych analiz, np. z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Mikroskopia optyczna to niewątpliwie metoda oceny wstępnej. Mimo że dostarcza cennych informacji na temat badanego złoży, to powiększenie, jakie pozwala uzyskać, może się okazać niedostateczne do analiz procesów krystalizacji złoży kamiennych w skali nanometrowej⁽¹⁸⁾.

Skaningowa mikroskopia elektronowa

Skaningowy mikroskop elektronowy (*scanning electron microscope*, SEM) z przystawką analityczną do dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (*energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDS) jest narzędziem wykorzystywanym w badaniach do obserwacji, analizy i charakteryzacji powierzchni badanego materiału z uwzględnieniem jego morfologii i składu pierwiastkowego. W przedstawionym typie mikroskopu określony obszar analizowanej powierzchni zostaje poddany działaniu skanującej, skupionej i skoncentrowanej wiązki elektronowej o ustalonej energii. Technologia SEM opiera się na wysyłaniu z katody wolframowej wytwarzanych elektronów, które są skupione w wiązkę elektronów. Pierwotna wiązka elektronów wnika w powierzchniową warstwę próbki i powoduje wybijanie elektronów, najczęściej z atomów położonych najbliżej powierzchni materiału. Wzbudzony i zanalizowany sygnał elektronów wtórnych (*secondary electrons*, SE) pozwala określić morfologię powierzchni i pokrój kryształów, z których zbudowany jest badany materiał w analizowanym mikroobszarze. Natomiast wzbudzone i zanalizowane charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie pozwala na określenie składu pierwiastkowego warstwy wierzchniej badanego obiektu. Jest to obserwacja dokonywana w elektronach wstecznie rozproszonych (*backscattered electrons*, BSE)⁽²⁰⁾. Wiązka jest centrowana i ogniskowana na powierzchni próbki poprzez soczewki elektromagnetyczne⁽¹⁶⁾. Liczne dane literaturowe opisujące analizy mineralogiczne kamieni moczowych wykazują, że mogą być one zbudowane jednorodnie lub stanowić kompleks różnych faz mineralnych^(9,21). Ocena struktury i składu chemicznego kamieni moczowych z wykorzystaniem SEM EDS umożliwia prowadzenie mikroanaliz próbki w dowolnie wybranym punkcie, liniowo (po zadanej linii) lub powierzchniowo, co pozwala stworzyć mapę rozkładu pierwiastków całej badanej powierzchni. W efekcie zastosowania odpowiedniej kalibracji można uzyskiwać również wyniki ilościowe⁽²²⁾. Taka analiza jest zautomatyzowana i skomputeryzowana, ponieważ odpowiednie oprogramowanie

Microphotographs created in the reflected polarised light may be also used for the selection of representative fragments of samples for further analyses, e.g. using scanning electron microscopy. Optical microscopy is undoubtedly a tool for preliminary assessment. Although it provides valuable information about the analysed deposit, the possible magnification may be insufficient for the analysis of the process of crystallisation of stones in the nanometre scale⁽¹⁸⁾.

Scanning electron microscopy

A scanning electron microscope (SEM) with an energy dispersive X-ray spectrophotometer attached is a tool used for observation, analysis and characteristics of the surface of the analysed material, including morphology and elemental composition. In the presented type of microscope, a specific area of the analysed surface is scanned by a focused and concentrated electronic beam of a predetermined energy. SEM technology is based on emitting an electron beam from a wolfram cathode. The primary electron beam penetrates into the surface layer of the sample and causes electrons to be emitted, usually from atoms located closest to the surface of the material. The excited and then analysed secondary electron (SE) signal allows to determine surface morphology and the habit of crystals which form the material in the analysed microarea. The excited and analysed characteristic X-rays allow to determine the elemental composition of the superficial layer of the investigated object. This observation is performed in backscattered electrons (BSE)⁽²⁰⁾. The beam is centered and focused on the surface of the sample through electromagnetic lenses⁽¹⁶⁾.

Substantial literature data describing mineralogical analyses of kidney stones indicates that their composition may be homogeneous or may be a complex of different mineral phases^(9,21). Assessment of the structure and chemical composition of kidney stones using SEM EDS allows for sample microanalysis in a selected point, linearly (along a selected line) or superficially, which allows to create a map showing the distribution of elements throughout the entire surface. Appropriate calibration may also produce quantitative results⁽²²⁾. Such an analysis is automated and computerised as an appropriate software allows for the evaluation of the investigated objects directly on the screen of the microscope as well as for creating a digital record of the created photographic documentation^(18,23–25). Electron microscopy combined with EDS allows for the determination of elemental composition at a content of about 0.1% by weight of samples of a size of several micrometers or for the creation of a map of elemental distribution in a larger area of the sample with micrometric spatial resolution⁽¹⁸⁾.

Kidney stones obtained from patients for SEM analysis require proper preparation. First, organic residues should be removed from their surface, then the investigated sample

pozwała na dokonywanie oceny badanych obiektów bezpośrednio na ekranie mikroskopu oraz na tworzenie cyfrowego zapisu stworzonej dokumentacji fotograficznej^(18,23–25). Dzięki mikroskopowi elektronowemu w połączeniu z EDS można ustalić skład pierwiastkowy przy zawartości około 0,1% wagowych próbek o rozmiarze kilku mikrometrów lub utworzyć mapę rozkładu pierwiastków w większym obszarze próbki z mikrometryczną rozdzielczością przestrzenną⁽¹⁸⁾.

Kamienie nerkowe pozyskane od pacjentów do analiz SEM muszą być odpowiednio przygotowane. Na wstępie należy usunąć z ich powierzchni pozostałości organiczne, a następnie oczyścić badaną powierzchnię próbki oraz napylić cienką warstwą substancji przewodzącej (np. złoto, platyna, węgiel). W celu dokonania właściwej interpretacji obrazów różnych powierzchni uzyskanych za pomocą mikroskopu elektronowego trzeba przeprowadzić próbę odniesienia, która oszacuje, w jakim stopniu materiał badawczy może ulec zniszczeniu podczas badania. W literaturze opisano bowiem przypadki zmiany strukturalnej badanych materiałów pod wpływem wiązki elektronów^(26–28). Mikrofotografie uzyskane za pomocą SEM pozwalają wykonać dokumentację kamieni nerkowych w dużym powiększeniu. Metoda ta umożliwia szybką identyfikację rodzaju kamieni na podstawie określenia ich składu chemicznego w mikroobszarach, bez konieczności stosowania procesu roztwarzania w roztworach kwasów i zasad (w ten sposób unika się niszczenia materiału badawczego i oszczędza czas)⁽²⁹⁾. Obserwacje mikrofotografii pozwalają ustalić formy skryształizowania oraz formy występowania faz mineralnych w złogu, a co za tym idzie – pozwalają na jego identyfikację. Ukazują one szczegółowo powierzchnię kryształów, ich wielkość oraz charakter krawędzi powierzchni kamienia. Metoda ta umożliwia identyfikację składu pierwiastkowego badanego materiału oraz pozwala tworzyć mapy pierwiastków obrazujące ich rozkład w analizowanym obszarze próbki⁽¹⁸⁾. Analiza ta jest stosunkowo szybka i dostarcza wielu informacji, na podstawie których można sklasyfikować badany zółg, a tym samym zalecić pacjentowi odpowiednią dietę zmniejszającą ryzyko nawrotów kamicy nerkowej⁽¹³⁾. Technika SEM EDS w porównaniu z innymi technikami wykazuje niższą czułość, jednak z powodzeniem może być stosowana jako podstawowa technika badania kamieni. Wynika to ze stosunkowo szybkiego czasu trwania analizy, która dodatkowo nie niszczy materiału badawczego. Badanie to pozwala zakwalifikować materiał badawczy do określonego rodzaju oraz dostarcza wskazówek dotyczących dalszych badań, zapewniając wstępną klasyfikację badanych próbek na podstawie zawartości wybranych pierwiastków⁽¹⁸⁾. Jest to technika nieinwazyjna, która dostarcza informacji o charakterystyce kształtu cząstek, ich średnicy i lokalizacji w danych obszarach kamienia. Wyżej opisana metoda stanowi atrakcyjną alternatywę dla konwencjonalnych metod obrazowych stosowanych w diagnostyce kamicy układu moczowego⁽⁹⁾.

surface should be cleaned and sprayed with a thin layer of conductive substance (e.g. gold, platinum, carbon). In order to properly interpret the images of different surfaces obtained using an electron microscope, a reference test should be performed to estimate the possible degree of material damage during analysis. Cases of structural changes in the analysed materials induced by an electron beam have been reported^(26–28). Microphotographs obtained by SEM allow for the documentation of kidney stones at high magnification. The method enables rapid identification of the type of stones based on their chemical composition in microareas, without the need to dissolve them in acid/base solutions (which in turn allows to avoid damage to the investigated material and save time)⁽²⁹⁾. Observation of microphotographs allows to determine crystallised forms of mineral phases in the deposit, and thus its identification. They show the details of crystal surface, crystal size and the type of crystal edges. The method allows to identify the elemental composition of the analysed material as well as to create elemental maps that show the distribution of different elements in the analysed sample area⁽¹⁸⁾. The analysis is relatively quick and provides a lot of data, based on which the deposit may be classified and thus the patient may be offered an appropriate diet reducing the risk of recurrent urolithiasis⁽¹³⁾. Compared to other methods, the SEM EDS technique shows lower sensitivity, but it may be successfully used as a basic technique for kidney stone evaluation. This is due to the fact that the analysis is relatively fast and does not cause damage to the tested material. It allows to classify the analysed material into a specific type and provides guidance for further testing by ensuring preliminary classification of the tested samples based on their elemental content⁽¹⁸⁾. This is a non-invasive technique, which provides information on the shape and diameter of particles as well as their location within the given areas of the stone. This method is an attractive alternative for conventional imaging techniques used in the diagnosis of urolithiasis⁽⁹⁾.

INFRARED SPECTROSCOPY

Spectroscopic methods involve an analysis of the interaction of electromagnetic radiation with matter. Several variants may be distinguished⁽³⁰⁾:

- emission spectroscopy involving an assessment of radiation emitted by the sample;
- absorption spectroscopy, which analyses the amount of energy absorbed by the sample;
- Raman spectroscopy, which analyses radiation scattered by the sample.

Infrared spectroscopy measures the absorption of radiation associated with the excitation of the oscillation levels of molecules. Although infrared spectroscopy was first used in 1995, it was only in the last decade that it was considered a reliable method for the analysis of kidney stones obtained from patients⁽¹²⁾.

SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI

Metody spektroskopowe polegają na analizie interakcji energii promieniowania elektromagnetycznego z materią. Wśród nich wyróżnia się kilka wariantów⁽³⁰⁾:

- metody emisyjne, polegające na ocenie promieniowania emitowanego przez próbkę;
- metody absorpcyjne, w których analizie podlega ilość energii zaabsorbowanej przez próbkę;
- spektroskopię Ramana, która analizuje promieniowanie rozproszone przez próbkę.

Spektroskopia w podczerwieni bada absorpcję promieniowania związaną ze wzbudzeniem poziomów oscylacyjnych cząsteczek. Po raz pierwszy spektroskopia w podczerwieni została zastosowana w 1995 roku, jednak dopiero w ostatniej dekadzie uznano ją za wiarygodną i miarodajną metodę wykorzystywaną do analiz kamieni moczowych pobranych od pacjenta⁽¹²⁾.

Podczerwień to promieniowanie elektromagnetyczne o długości fal pomiędzy promieniowaniem widzialnym a mikrofalowym. Jest to zakres długości fali 0,7–50 μm . Technika spektroskopii w podczerwieni polega na rejestracji promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni (4000–400 cm^{-1}) emitowanego lub zaabsorbowanego przez cząsteczkę jako efekt przejść między stanami rotacyjnymi lub oscylacyjno-rotacyjnymi cząsteczki⁽³¹⁾. Poszczególne molekuly oraz wiązania atomów są opisane ściśle określonymi częstotliwościami charakterystycznych drgań. Wynik pomiaru otrzymuje się w postaci widm, które stanowią wykresy intensywności (absorpcji lub procentu transmisji) w funkcji położenia (liczby falowej). Liczba falowa (ν) równa się odwrotności długości fali i jest wyrażana w cm^{-1} ⁽³²⁾. Dzięki analizie widma promieniowania podczerwonego można określić skład chemiczny analizowanych próbek poprzez ocenę pasm charakterystycznych dla drgań występujących w cząsteczkach⁽³³⁾. Obecnie spektrometry zamiast widm rejestrują bezpośrednio tzw. interferogramy (obrazy interferencji dwóch wiązek – jednej o stałej długości i drugiej o stałej prędkości), co – w efekcie przejścia przez próbkę szerokopasmowego promieniowania – pozwala na rejestrację całkowitego widma w podczerwieni. Powoduje to znaczne skrócenie czasu analizy przy jednoczesnym zwiększeniu czułości tych metod⁽¹²⁾.

Metoda spektroskopowa polegająca na analizie oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią, w tym spektroskopia w podczerwieni, jest najodpowiedniejszą techniką analizy kamieni moczowych i stała się złotym standardem w ich badaniu^(1,34). Spektroskopia w podczerwieni to szybka i precyzyjna technika pomiarowa, która badając fizyczne własności materii, jednocześnie umożliwia interpretację otrzymanych wyników w powiązaniu z budową chemiczną badanej próbki. Dostarcza wielu cennych informacji dotyczących różnych grup funkcyjnych występujących w badanej próbce⁽¹⁾.

Infrared radiation is a type of electromagnetic radiation with a wavelength between visible and microwave radiation, i.e. 0.7–50 μm . The technique of infrared spectroscopy involves registration of infrared electromagnetic radiation (4,000–400 cm^{-1}) emitted from or absorbed by a molecule as a result of transitions between rotational or vibrational-rotational states of the molecule⁽³¹⁾. Molecules and atom bonds are described by strictly defined frequencies of characteristic vibrations. The result of the measurement is obtained in the form of spectra, which are presented in the form of intensity plots (of the absorption or the percentage of transmission) as a function of location (a wave number). The wave number (ν) is the reciprocal of the wavelength and is expressed in cm^{-1} ⁽³²⁾. The analysis of infrared radiation spectrum may be used to determine the chemical composition of the analysed samples by assessing the bands characteristic for vibrations in the molecules⁽³³⁾. Currently, spectrometers directly register interferograms (images of two-beam interference – one beam is of fixed length and the other is of constant velocity), which, as a consequence of broadband radiation passing through the sample, allows for the registration of the entire infrared spectrum. This significantly reduces the time of analysis, while increasing the sensitivity of these methods⁽¹²⁾.

The spectroscopic method of analysing the interaction of electromagnetic radiation with matter, including infrared spectroscopy, is the most appropriate technique for the analysis of kidney stones and has become the gold standard for kidney stone analysis^(1,34). Infrared spectroscopy is a rapid and precise measuring technique that by measuring the physical properties of matter, allows for the interpretation of the results obtained in connection with the chemical structure of the analysed sample. The technique provides a lot of valuable information about various functional groups present in the sample⁽¹⁾.

COMPUTED TOMOGRAPHY

In the case of patients experiencing acute pain in the lumbar region, non-contrast-enhanced computed tomography is the diagnostic standard. The scan allows to determine the density, diameter and structure of the kidney stone as well as to identify its anatomical location (to determine the distance between the stones and the skin among other things), which helps select an appropriate method for stone resection⁽¹⁾. The Hounsfield scale, a quantitative scale for describing radiodensity of kidney stones, is a useful tool for the selection of the method for stone removal based on CT. CT visualisation of non-radiopaque kidney stones in an X-ray image, e.g. stones composed of xanthine and uric acid, is an additional advantage of this method.

Non-contrast-enhanced computed tomography may classify kidney stones in terms of their composition. Introduction of spectral scanners, which allow for the analysis of the atomic number of the analysed substance, has

TOMOGRAFIA KOMPUTEROWA

W przypadku występowania u pacjenta objawów ostrego bólu w okolicy lędźwiowej standardem w diagnostyce jest stosowanie tomografii komputerowej bez kontrastu. Badanie to umożliwia określenie gęstości, średnicy oraz struktury kamienia, a także ustalenie anatomii miejsca występowania złogów (m.in. określenie odległości kamieni od skóry), co pomaga w wyborze metody resekcji kamienia⁽¹⁾. W stosowaniu tomografii komputerowej w celu doboru metody usuwania kamieni użyteczna jest skala Hounsfielda – ilościowa skala opisująca gęstość radiologiczną kamieni. Dodatkową zaletą tej metody jest uwidacznianie w tomografii komputerowej kamieni niecieniujących w pogładowym zdjęciu rentgenowskim, np. zbudowanych z ksantyny i kwasu moczowego. Tomografia komputerowa bez kontrastu może klasyfikować kamienie według składu. Wprowadzenie do produkcji skanerów spektralnych, pozwalających na analizę liczby atomowej obrazowanej substancji, umożliwia dokładną charakterystykę złogów i określenie ich składu chemicznego. Należy pamiętać również o wadach tej metody: braku informacji o anatomii i funkcjonowaniu nerek i układu moczowego oraz ryzyku stosowania podwyższonych dawek promieniowania. Rozwiązaniem powyższych problemów jest zastosowanie tomografii komputerowej o niskiej dawce promieniowania, która u pacjentów z niskim wskaźnikiem masy ciała charakteryzuje się czułością na poziomie 96% i swoistością 95%⁽³⁵⁾. Badanie składu chemicznego kamieni nerkowych jest niezwykle istotne dla zrozumienia przyczyn ich powstania. Analiza składu kamieni pozwala na wybór odpowiednich schematów i metod leczenia, co skutecznie zapobiega nawrotom formowania się złogów.

PODSUMOWANIE

Analizę składu chemicznego kamienia moczowego po raz pierwszy opisano pod koniec XVIII wieku. Istnieje wiele różnych metod analizy kamieni moczowych, jednak z klinicznego punktu widzenia żadna z nich nie jest wystarczająca dla uzyskania kompletnej informacji o strukturze i składzie złogów formujących się w układzie moczowym. Wobec tego w diagnostyce kamicy na poziomie analizy kamieni moczowych zaleca się stosowanie równocześnie kilku metod analizy⁽³⁶⁾. Obecnie wciąż testowane są kolejne techniki badawcze mające na celu zwiększenie dokładności analizy składu kamieni moczowych, takie jak np. nanoskalowa cytometria przepływowa⁽¹⁹⁾. Należy mieć nadzieję, że wyniki tych badań umożliwią wytypowanie jednej unikalnej metody, kompleksowo oceniającej kamień pobrany od pacjenta. Pozwoliłoby to na wystandaryzowanie schematów leczenia, a co za tym idzie – poprawę jakości życia pacjentów borykających się z kamicą nerkową.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.

enabled a detailed characteristics of deposits, including their chemical composition. It should be also noted that the method has some limitations, such as the lack of information on renal/urinary anatomy and function and the risk of using increased radiation doses. These limitations may be eliminated by using CT with low radiation doses, which shows sensitivity of 96% and specificity of 95% in patients with low BMI⁽³⁵⁾.

The analysis of the chemical composition of kidney stones is essential to understand the cause of their formation. It allows for the choice of appropriate treatment regimens and methods, and thus to effectively prevent recurrences.

CONCLUSIONS

The first analysis of the chemical composition of a kidney stone was described at the end of the 18th century. Although there are many different methods for analysing kidney stones, from the clinical point of view none of these are sufficient to obtain complete information on the structure and composition of urinary tract deposits. Therefore, a simultaneous use of more than one analytical method is recommended in the diagnosis of kidney stones in urolithiasis⁽³⁶⁾. New techniques are currently being tested to improve the accuracy of the analysis of the composition of kidney stones, such as nanoscale flow cytometry⁽¹⁹⁾. Hopefully, these studies will enable the selection of one unique method for the comprehensive assessment of kidney stones obtained from a patient. This would allow the standardisation of therapeutic regimens, and thus improved quality of life if patients with urolithiasis.

Conflict of interest

The authors do not report any financial or personal connections with other persons or organisations, which might negatively affect the content of this publication and/or claim authorship rights to this publication.

Piśmiennictwo / References

1. Türk CT, Knoll T, Petrik A et al.: Guidelines on Urolithiasis. European Association of Urology, Arnhem 2013.
2. Penido M, MG, Tavares Mde S: Pediatric primary urolithiasis: symptoms, medical management and prevention strategies. *World J Nephrol* 2015; 4: 444–454.
3. Shah J, Whitfield HN: Urolithiasis through the ages. *BJU Int* 2002; 89: 801–810.
4. Pawlikowski M: Krysztaly w organizmie człowieka. Wyd. Sece-sja, Kraków 1993: 82–89.
5. Romero V, Akpinar H, Assimos DG: Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol* 2010; 12: e86–e96.
6. Shabsoug B: Qualitative analysis of kidney stones by one wet chemical method for patients in Al-Qaseem area in Kingdom of Saudi Arabia. *J Chem Soc Pakistan* 2003; 25: 334–336.
7. Kasidas GP, Samuell CT, Weir TB: Renal stone analysis: why and how? *Ann Clin Biochem* 2004; 41: 91–97.
8. Tiselius HG: The role of calcium phosphate in the development of Randall's plaques. *Urolithiasis* 2013; 41: 369–377.
9. Kustov AV, Moryganov MA, Strel'nikov AI et al.: [Quantitative mineralogical analyzes of kidney stones and diagnosing metabolic disorders in female patients with calcium oxalate urolithiasis]. *Urologiia* 2016; (1): 11–15.
10. Hashim IA, Zawawi TH: Wet vs. dry chemical analysis of renal stones. *Ir J Med Sci* 1999; 168: 114–118.
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: 176165.
12. Singh I: Renal geology (quantitative renal stone analysis) by 'Fourier transform infrared spectroscopy'. *Int Urol Nephrol* 2008; 40: 595–602.
13. Nouvenne A, Meschi T, Guerra A et al.: Dietary treatment of nephrolithiasis. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008; 5: 135–141.
14. Tiselius HG: Epidemiology and medical management of stone disease. *BJU Int* 2003; 91: 758–767.
15. Prien EL, Frondel C: Studies in urolithiasis. I: The composition of urinary calculi. *J Urol* 1947; 57: 949–991.
16. Huber M, Blicharska E, Muraczyńska B et al.: Zastosowanie mikroskopii elektronowej i optycznej w badaniach biomedycznych. In: Forum – Innowacyjne Materiały, Lublin, 18–19 czerwca 2013 r.: 165–166.
17. Huber MA: Mathematics planimetry map model of diversity and petrology in the Kandalaksha part of Lapland Granulite Belt (Kola Peninsula, NW Russia). *J Biol Earth Sci* 2014; 4: E61–E83.
18. Blicharska E, Muraczyńska B, Huber M: Możliwości zastosowania skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) z przystawką EDS w badaniach materiału biologicznego. In: „Innowacje w Praktyce”: konferencja – warsztaty – wystawa – spotkania panelowe, Centrum Innowacji Naukowo-Edukacyjnych, Lublin 2014: 49.
19. Basiri A, Taheri M, Taheri F: What is the state of the stone analysis techniques in urolithiasis? *Urol J* 2012; 9: 445–454.
20. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR et al.: Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. 4th ed., Springer Science & Business Media, 2018.
21. Keshavarzi B, Ashayeri NY, Moore F et al.: Mineralogical composition of urinary stones and their frequency in patients: relationship to gender and age. *Minerals* 2016; 6: 131.
22. Krysztuf M: Detekcja sygnału i technika obrazowania w skaningowym mikroskopie elektronowym w zakresie niskiej próżni. Rozprawa doktorska, Politechnika Wrocławska, Wydział Elek-troniki Mikrosystemów i Fotoniki, Wrocław 2010.
23. Nadal A, Sul JY, Valdeolmillos M et al.: Albumin elicits calcium signals from astrocytes in brain slices from neonatal rat cortex. *J Physiol* 1998; 509: 711–716.
24. Jones EG: Microcolumns in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5019–5021.
25. Buldyrev SV, Cruz L, Gomez-Isla T et al.: Description of micro-columnar ensembles in association cortex and their disruption in Alzheimer and Lewy body dementias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5039–5043.
26. Dajani AM, Abu Khadra AL, Baghdadi FM: Urolithiasis in Jordanian children. A report of 52 cases. *Br J Urol* 1988; 61: 482–486.
27. Ekeruo WO, Tan YH, Young MD et al.: Metabolic risk factors and the impact of medical therapy on the management of nephrolithiasis in obese patients. *J Urol* 2004; 172: 159–163.
28. Traxer O, Huet B, Poindexter J et al.: Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factors. *J Urol* 2003; 170: 397–401.
29. Qiao T, Ma RH, Luo XB et al.: A microstructural study of gall-bladder stones using scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech* 2013; 76: 443–452.
30. Kęcki Z: Podstawy spektroskopii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
31. Tarsa M: Spektroskopia w podczerwieni. Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Katedra Chemii Organicznej.
32. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ: Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
33. Sadlej J: Spektroskopia molekularna. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002.
34. Benramdane L, Bouatia M, Idrissi MOB et al.: Infrared analysis of urinary stones, using a single reflection accessory and a KBr pellet transmission. *Spectrosc Lett* 2008; 41: 72–80.
35. Chen TT, Wang C, Ferrandino MN et al.: Radiation exposure during the evaluation and management of nephrolithiasis. *J Urol* 2015; 194: 878–885.
36. Gavin CT, Ali SN, Tailly T et al.: Novel methods of determining urinary calculi composition: petrographic thin sectioning of calculi and nanoscale flow cytometry urinalysis. *Sci Rep* 2016; 6: 19328.