

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Daniel Turudić**

**Izlučivanje oksalata, citrata i glikozaminoglikana mokraćom u djece s urolitijazom**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb 2016.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, u Zavodu za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska, pod vodstvom prof. dr. sc. Danice Batinić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015/2016.

## **Kratice**

HOGA 1 - 4-hidroksi-2-oxoglutarat aldolaza 1

ROC - Receiver Operating Characteristic Curve

PH - Primarna hiperoksalurija

IH - Idiopatska hiperoksalurija

DHDPSL - 4-hidroksi-2-oxoglutarat aldolaza 1

GAG - Glikozaminoglikani

ESWL - Ekstrakorporalna litotripsija

$\bar{x}$  - Aritmetička sredina

SD - Standardna devijacija

IQR - Intekvartilni raspon

## SADRŽAJ

Sažetak

Summary

UVOD .....	1
HIPOTEZA .....	2
OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	3
ISPITANICI I METODE .....	3
REZULTATI .....	6
RASPRAVA.....	10
ZAKLJUČCI .....	14
ZAHVALE .....	16
LITERATURA.....	17
ŽIVOTOPIS .....	21

**Sažetak:**

Daniel Turudić: Izlučivanje oksalata, citrata i glikozaminoglikana mokraćom u djece s urolitijazom

Analizirano je izlučivanje urinom oksalata, citrata i glikozaminoglikana u 83 djece s idiopatskom urolitijazom. Iz analize su isključene primarne hiperoksalurije i idiopatske hiperoksalurije (HOGA 1) koje su uzrokovane mutacijama gena i enteričkom hiperoksalurijom. Kao varijable su uzete koncentracije oksalata, citrata i glikozaminoglikana te omjeri oksalati/citrati, oksalati/glikozaminoglikani, oksalati/(citrati × glikozaminoglikani) i citrati/glikozaminoglikani. Od ispitanih varijabli jedino je omjer oksalati/(citrati × glikozaminoglikani) mmol/mol kreatinina razlikovao zdravu djecu od skupine djece s urolitijazom. ROC analizom je utvrđeno da je vrijednost omjera  $> 0.0782$  dijagnostički prihvatljiva za razlikovanje djece s urolitijazom od zdrave djece. Stoga se nalaz omjera oksalati/(citrati × glikozaminoglikani) iznad 0.0782 može se smatrati određujućim za djecu s urolitijazom.

Ključne riječi: Idiopatska urolitijaza, omjer oksalati/(citrati × glikozaminoglikani), djeca

## **Summary:**

Daniel Turudić: Urinary excretion of oxalate, citrate and glycosaminoglycans in children with urolithiasis

Urinary excretion of oxalate, citrate, glycosaminoglycans and the ratios oxalate/citrate, oxalate/glycosaminoglycans, oxalate/(citrate × glycosaminoglycans), and citrate/glycosaminoglycans were examined in 83 children with idiopathic urolithiasis. Gene mutations causing primary hyperoxaluria and idiopathic hyperoxaluria HOGA 1 were excluded. Only the variable oxalate/(citrate × glycosaminoglycans) mmol/mol creatinine was able to distinguish between children with urolithiasis and healthy children. ROC analysis showed that the value of the ratio  $> 0.0782$  is adequate for diagnostic purpose. Therefore, we consider that the ratio oxalate/(citrate × glycosaminoglycans) above 0.0782 indicates urolithiasis in children.

**Key words:** idiopathic urolithiasis, oxalate/(citrate × glycosaminoglycans) ratio, children

## Uvod:

Urolitijaza u djece je posljedica složenog međudjelovanja mnogobrojnih faktora od kojih su najvažniji hiperkalciurija, hiperoksalurija i hipocitraturija. Brojne studije ukazuju da je hiperkalciurija najvažniji rizični faktor za nastanak kalcij oksalatne urolitijaze uzrokovane velikim afinitetom između iona kalcija i oksalata koji rezultira stvaranjem kristala. Poznato je da citrati u urinu imaju protektivnu ulogu u nastanku kalcij oksalatne urolitijaze poradi stvaranja kalcij citrata koji je topljiv u mokraći. Veza kalcija na citrat smanjuje se količina kalcija raspoloživog za vezu s oksalatima. Stoga, hipocitraturija pogoduje nastanku kalcij oksalatne urolitijaze. Znatno manje je istražena i u literaturi opisana detaljnija uloga oksalurijske, hipocitraturijske i glikozaminoglikana kao i važnost njihovog međudodnosa u stvaranju kamenaca u urotaktu. (Baggio-1982, Baggio-1983, Batinić-2000, Cao-1997, Milošević-2014, VanDervoort-2007)

Primarna hiperoksalurija (PH) I i II je uzrokovana mutacijama u odgovarajućim genima koje uzrokuju manjak specifičnog jetrenog enzima alanin glioksilat aminotransferaze. Za PH je karakteristično izlučivanje oksalata  $> 1 \text{ mmol}/1.73 \text{ m}^2/24 \text{ sata}$ . Idiopatska hiperoksalurija (IH) je mnogo češća u djece i ima nepoznat uzrok. Karakterizirana je izlučivanjem oksalata  $< 1 \text{ mmol}/1.73 \text{ m}^2/24 \text{ sata}$ . Najnoviji radovi pokazuju da su neke IH u djece uzrokovane genetskim faktorima (mutacija HOGA 1 gena, bivši naziv DHDPSL) i stoga označene kao PH III (Belostotsky-2012). Enterički uzrokovana hiperoksalurija je rezultat pojačane resorpcije oksalata iz crijeva zbog dugotrajnog enteralnog oboljenja npr. celijakija ili cistične fibroza. U pojedinim zemljama hipocitraturija postaje sve važniji predispozicijski faktor za nastanak urolitijaze u djece (DeFoor-2010, Erbagci-2003, Tefekli-2000, Trinchieri-1992, VanDervoort-2007). Glikozaminoglikani (GAG) su konglomerati 55% hondroitin sulfata, 20% heparan sulfata, 11% nisko sulfatiranog hondroitin sulfata i 4-10% hijaluronske

kiseline i rijetko su razmatrani kao faktor rizika u nastanku urolitijaze. (Akçay-1999, Erturk-2002, Fellström-1984, Kohri-1989, Nishio-1985). Zna se da GAG imaju protektivnu ulogu u nastanku urolitijaze zbog izrazito negativnog naboja sulfatnih skupina u njihovom sastavu koje vezivanjem s kalcijem sprječavaju kalcij oksalatnu vezu (Nishio-1985). Najveći inhibitorni potencijal za urolitijazu se pripisuje hondroitin sulfatu (Nishio-1985, Poon-2012). Snižene se vrijednosti GAG u mokraći očekuju prvenstveno u recidivne urolitijaze u koje se pretpostavlja postojanje izraženijeg disbalansa promotora/inhibitora. Pojedini autori ulogu hondroitin sulfata, heparan sulfata i hijaluronske kiseline smatraju djelomično promotornom, budući da nakon zasićenja kalcijem mogu pojačavati nukleaciju (Michelacci-1992, Nishio-1985, Poon-2012). Stoga do sniženih vrijednosti GAG u urinu može doći zbog primarno manjeg izlučivanja GAG urinom i/ili trošenja u procesu kristalizacije. (Akçay-1999, Cao-1997, Nikkila-1989, Nishio-1985, Trinchieri-1992). Pored toga su konglomerat 3 komponente s različitim protektivnim afinitetom prema urolitijazi (Nishio-1985, Poon-2012).

### **Hipoteza:**

Važnost i uloga oksalata, citrata i glikozaminoglikana kao promotora i inhibitora urolitijaze u djece često nije vidljiva ako je u analizu uključena kalciurija. Hipoteza je da će se i uzimanjem u razmatranje samo vrijednosti oksalata, citrata i glikozaminoglikana kao i omjera oksalati/citrati, oksalati/GAG, oksalati/(citrati x GAG) i citrati/GAG uočiti njihov značaj u nastanku urolitijaze, te omogućiti lakše razlikovanje između zdrave djece i djece s urolitijazom.



### **Opći cilj i specifični ciljevi rada:**

Opći cilj rada je dobivanje novih spoznaja i bolje razumijevanje uloge i međudjelovanje oksalata, citrata i GAG-a na nastanak urolitijaze u djece. Specifični cilj rada je utvrđivanje razlike u sastavu urina zdrave djece i djece s urolitijazom za vrijednosti oksalata, citrata i GAG--a te omjera oksalati/citrati, oksalati/GAG, oksalati/(citrati x GAG) i citrati/GAG koji su uzeti kao varijable. Za varijable čije se vrijednosti za zdravu i bolesnu djecu statistički značajno razlikuju, ROC analizom odrediti će se vrijednosti koja najbolje razdvajaju zdravu od bolesne djece.

### **Ispitanici i metode:**

Djeca uključena u ovu studiju su liječena u Zavodu za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Kliničkog Bolničkog Centra Zagreb. Ukupno je bilo 103 djece od kojih su 83 imala kalcij oksalatnu urolitijazu dokazanu metodom infracrvene spektroskopije. Kamenci za analizu su pribavljeni kirurškom ekstrakcijom, ESWL, endoskopskim odstranjenjem ili spontanom evakuacijom. Urolitijaza je dijagnosticirana ultrazvučnim prikazom i/ili nativnom snimkom urotrakta, ponekad u dvojbjenim slučajevima urolitijaza je potvrđena i.v.urografijom. Mikciona cistouretrografija je rađena isključivo u djece s recidivnim uroinfekcijama kako bi se isključio vezikoureteralni refluks. U Republici Hrvatskoj kalcij oksalatna urolitijaza je izrazito dominantna ukoliko se isključe anomalije urotrakta sa recidivnim uroinfekcijama koje pokazuju sklonost stvaranju kalcij fosfatne urolitijaze (Milošević-2014). Isključena su djeca s drugim metaboličkim abnormalnostima koja bi mogla utjecati na sastav urinarnih metabolita (npr renalna tubulska acidoza, sistemske metaboličke bolesti). Djeca s dokazanom kalcij fosfatnom urolitijazom, pojačanim izlučivanjem cistina i/ili urične kiseline su također isključena iz studije. Određivanje ksantinurije i pojačanog izlučivanja aminokiselina urinom dopunjuju probir na kalcij oksalatnu urolitijazu.

U djece s IH isključeni su svi poznati genetički uzroci (PH I, II, III i HOGA 1). Genetičko ispitivanje je obavljeno u Shaare Zedek Medical Center u Jeruzalemu pod vodstvom Prof. dr. sc. Yaacova Frishberga. Klinički su isključena oboljenja koja mogu uzrokovati enteričku hiperoksaluriju (npr. celijakija, cistična fibroza).

Kontrolna skupina se sastojala od 20 zdrave djece odgovarajuće dobi i spola u koje se zbog primarne noćne enureze provodilo sakupljanje 24 satnog urina za potrebe isključenja glomerularnih i metaboličkih bolesti.

Zbog preciznijeg određivanja izlučivanja oksalata, citrata, glikozaminglikana i kreatinina mokraćom koristili smo isključivo 24 satni uzorak mokraće. Uzorci su sakupljeni od 08 sati prvog dana (prvi jutarnji urin ne ulazi u analizu) do 08 sati drugog dana (prvi jutarnji urin uključen). Djeca su bila na uobičajenoj prehrani. Oksalati i citrati određivani su u mokraći koja je prikupljena plastičnim sakupljačem širokog otvora s 10 mL 6 N hidroklorične kiseline kao prethodno dodani konzervans. Nitritna test traka (Combour 9 test, Boehringer, Mannheim) korištena je za detekciju uroinfekcije a pozitivni uzorci su isključeni iz studije. Oksalati i citrati su određivani aparatom Dionex 4000i (Dionex Co.Sunnyvale, CA) (Classen-1987). Kreatinin je određivan Jaffeovom metodom na Olympus AU 800 analizatoru (Bonses-1951). GAG su određivani karbazol metodom u 24 satnom urinu drugog dana sakupljenim na prethodno opisan način ali bez dodanog konzervansa (Bitter-1962). Vrijednosti oksalata, citrata i GAG te njihovi omjeri su izražene na mol kreatinina.

Međunarodno definirana normalna vrijednost izlučivanja oksalata mokraćom za djecu iznosi  $< 0.5 \text{ mmol}/1.73 \text{ m}^2/24 \text{ sata}$ . Razina izlučivanja oksalata mokraćom za PH je  $> 1 \text{ mmol}/1.73 \text{ m}^2/24 \text{ sata}$ . IH po definiciji varira u rasponu izlučivanja između  $0.5 - 1 \text{ mmol}/1.73 \text{ m}^2/24 \text{ sata}$ . Prihvaćena donja razina izlučivanja citrata u zdrave djece je  $1.6 \text{ mmol}/1.73 \text{ m}^2/24$

sata. (Milošević-2014). Normalna razina izlučivanja GAG-a u djece zavisi od dobi djeteta i varira od 0-4 mjeseca:  $\leq 53.0$  mg/mmol kreatinina; 5 - 18 mjeseci:  $\leq 31.0$  mg/mmol kreatinina; 19 mjeseci - 2 godine  $\leq 24.0$  mg/mmol kreatinina; 3 - 5 godina:  $\leq 16.0$  mg/mmol kreatinina; 6 - 10 godina:  $\leq 12.0$  mg/mmol kreatinina; 11-14 godina:  $\leq 10.0$  mg/mmol kreatinina;  $>14$  godina:  $\leq 6.5$  mg/mmol kreatinina (Neufeld-2001). U radu su korištene i vrijednosti izlučivanja oksalata, citrata i GAG za zdravu djecu objavljene u literaturi (Batinić-2000, Batinić-2003, Milošević-2003).

### **Analiza podataka**

Podaci dobijeni prebrojavanjem su prikazani kao brojevi i postotci, a podaci dobijeni mjerenjem su prikazani kao aritmetička sredina ( $\bar{x}$ ) standardna devijacija (SD), te kao medijan i interkvartilni raspon (IQR). Podaci dobiveni prebrojavanjem su analizirani uporabom  $\chi^2$ -testa, a mjereni podaci uporabom Mann-Whitney U-testa. Svi primjenjeni testovi su bili dvosmjerni, a p vrijednosti  $\leq 0,05$  su smatrane statistički signifikantnima. Statistički signifikantni rezultati su grafički prikazani kao *box-and-whisker* grafikoni, a optimalni kriterij za razlikovanje normalne djece i djece s urolitijazom određen je ROC analizom. Statističke analize i grafički prikaz podataka napravljeni su statističkim programom Statistica for Windows verzija 10, te MedCalc verzija 12.5.0.0. (MedCalc-2013, Motulsky-1995, Statsoft-2011).

## Rezultati:

Ispitano je 103 djece, od kojih je 83 imalo dokazanu urolitijazu. Kontrolna skupina se sastojala od 20 zdrave djece. Rezultati deskriptivne statistike za dob i spol djece s urolitijazom i zdrave djece navedeni su u Tablici 1. Prosječna dob ispitivane djece iznosila je za djecu s urolitijazom 121,0 mjesec (medijan) vs.113,0 mjeseci (medijan) za zdravu djecu. Nije bilo statistički značajnih odstupanja između dviju skupina.

Deskriptivna statistika za oksalate, citrate i GAG te za omjere oksalati/citrati, oksalati/GAG, oksalati/(citrati x GAG) i citrati/GAG navedena je u Tablici 1. Sve navedene varijable, osim za omjer oksalati/(citrati x GAG), analizirane Mann-Whitney U-testom imaju p vrijednost > 0,05. Jedina varijabla koja omogućava razlikovanje dviju skupina ispitanika je oksalati/(citrati × GAG) mmol/mol kreatinina. Ova varijabla pokazuje signifikantnu razliku između skupine djece s urolitijazom i kontrolne skupine (p=0,0468) i označena je sivom bojom u Tablici 1.

**Tablica 1.** Deskriptivna statistika za dob zdrave djece, djece s urolitijazom te za varijable oksalati, citrati, GAG, oksalati/citrati, oksalati/GAG, oksalati/(citrati x GAG), citrati/GAG izražene na mol kreatinina

Varijable	Zdrava djeca		Djeca s urolitijazom		P vrijednost
	$\bar{x}$ ( $\pm$ SD) <sup>2</sup>	Medijan (IQR) <sup>3</sup>	$\bar{x}$ ( $\pm$ SD) <sup>2</sup>	Medijan (IQR) <sup>3</sup>	
Dob (mjeseci)	100,9 (55,90)	113,0 (4,0-191,0)	117,4 (49,09)	121,0 (7,0-211,0)	0,2332
Oksalati (mmol/mol kr) <sup>1</sup>	87,07 (76,33)	64,09 (19,45-318,64)	76,32 (50,74)	70,13 (0,02-270,00)	0,9933
Citrati (mmol/mol kr) <sup>1</sup>	407,12 (253,54)	345,75 (166,25-1288,14)	321,10 (213,47)	285,05 (8,74-938,86)	0,1085
GAG (mg/mmol kr) <sup>1</sup>	4,65 (3,53)	3,92 (1,14-14,30)	3,60 (2,94)	2,48 (0,34-17,80)	0,1836
Ox/Cit (mmol/mol kr) <sup>1</sup>	0,22 (0,14)	0,21 (0,05-0,10)	0,42 (0,59)	0,23 (0,00-3,71)	0,2381
Ox/GAG (mmol/mol kr) <sup>1</sup>	27,045 (25,26)	18,31 (3,81-89,05)	32,87 (32,36)	26,42 (0,01-178,92)	0,3071

<b>Ox/Cit × GAG (mmol/mol kr)<sup>1</sup></b>	0,08 (0,08)	0,05 (0,01-0,27)	0,21 (0,38)	0,08 (0,00-2,86)	0,0468
<b>Citrat/GAG (mmol/mol kr)<sup>1</sup></b>	130,48 (103,48)	88,89 (31,06-400,00)	132,93 (114,40)	101,44 (1,09-552,27)	0,9236

<sup>1</sup> kr = kreatinin; <sup>2</sup>  $\bar{x}$  ( $\pm$ SD) = aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija; <sup>3</sup> IQR = interkvartilni raspon

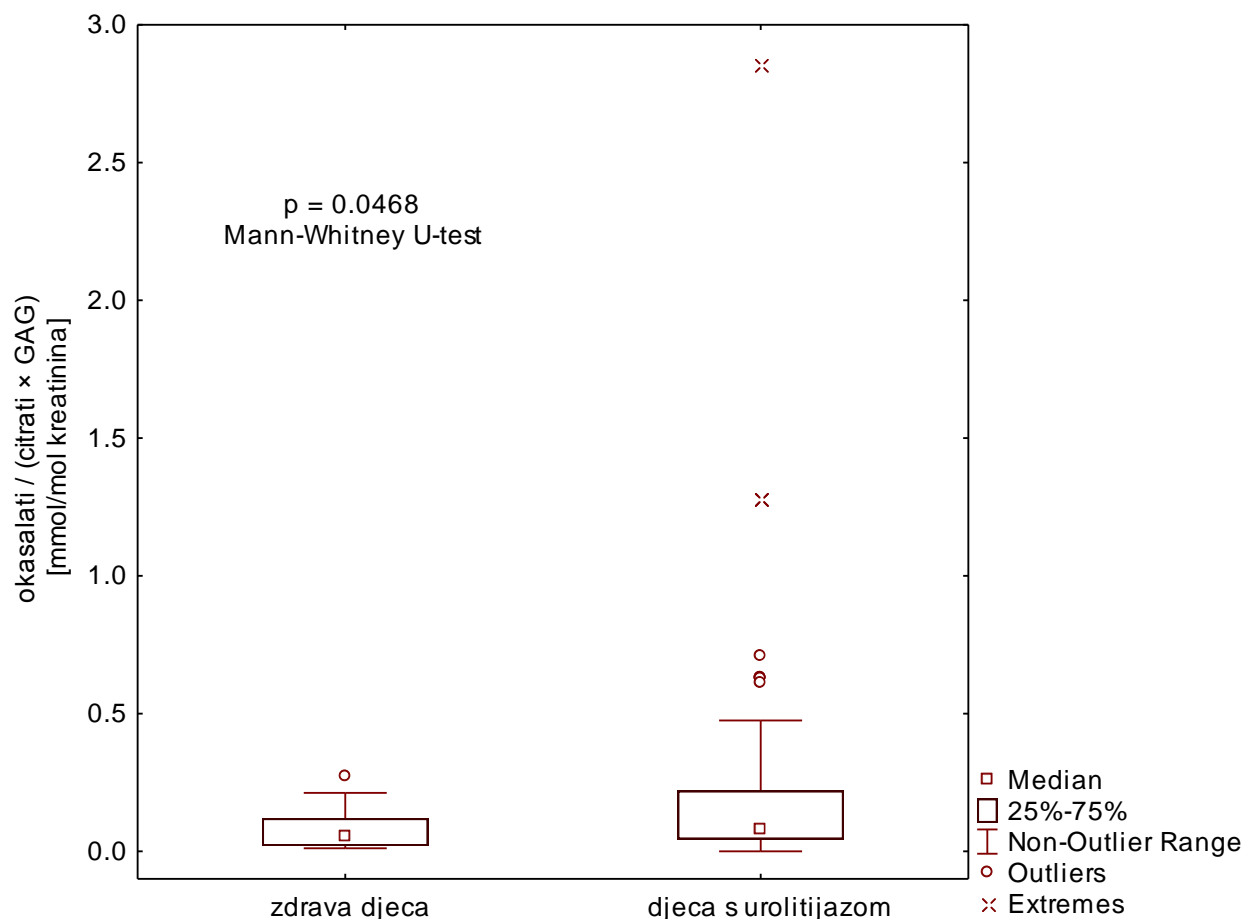
Premda je u skupni zdrave djece bilo više djevojčica u odnosu na dječake, razlika između skupina nije statistički značajna (Tablica 2). U skupni djece s urolitijazom nalazi se više dječaka u odnosu na djevojčice. (61.45% vs. 38.55%, omjer m:ž = 1.59:1).

**Tablica 2.** Raspodjela po spolu za zdravu djecu i djecu s urolitijazom.

<b>Skupina</b>	<b>Muško N (%)</b>	<b>Žensko N (%)</b>	<b>Ukupno</b>
Zdrava djeca	8 (40,0%)	12 (60,0)	20
Urolitijaza	51 (61,5%)	32 (38,5%)	83
Ukupno	59	44	103

Razlika među skupinama nije statistički signifikantna. ( $\chi^2$ -test = 3,029176, df = 1, p = 0,0818).

Za grafički prikaz varijable oksalati/(citrati x GAG) korišten je box-and-whisker prikaz (Slika. 1).

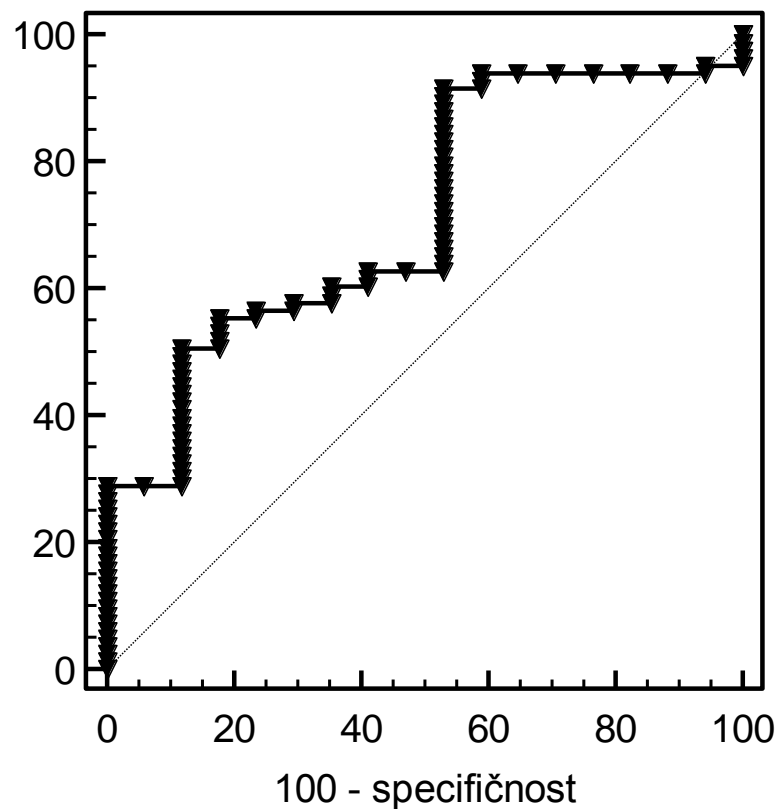


**Slika.1.** Box-and-Whisker prikaz varijable oksalati/(citrati x GAG) za zdravu djeca i djecu s urolitijazom.

Optimalni kriterij za razlikovanje zdrave djece i djece s urolitijazom pomoću varijable oksalati/(citrati x GAG) je određen uporabom ROC analize. Utvrđeno je da je to vrijednost od  $> 0,0782$ . Omjer oksalati/(citrati x GAG) iznad ove vrijednosti s visokom specifičnošću može se smatrati određujućim za djecu s urolitijazom (Tablica 3 i Slika 2.).

**Tablica 3.** Područje ispod ROC krivulje, standardna pogreška, P-vrijednost te senzitivnost i specifičnost sa 95% granicom pouzdanosti za vrijednost omjera oksalati/(citrati x GAG) od > 0.0782

Parametar ROC krivulje	Vrijednost
AUC	0.714387
Standardna pogreška	0.0643
95% granice pouzdanosti	0.588 - 0.840
P-vrijednost	0.0009
Pridruženi kriterij	>0.0782
Senzitivnost	50.60
Specifičnost	88.24



**Slika. 2.** Grafički prikaz ROC krivulje za varijablu oksalati/(citrati × GAG)

**Rasprava:**

Urolitijaza je u djece predmet intenzivnog istraživanja već desetljećima. Poznati su najčešći promotori urolitijaze kao i obrambeni faktori organizma koji sprječavaju njen nastanak. Radovi koji analiziraju izlučivanje oksalata, citrata i glikozamonoglikana u urinu u djece i odraslih su razmjerno malobrojni. Budući je za nastanak urolitijaze u djece potrebna kompleksna interakcija mnogih faktora jedinstven zaključak je teško donijeti. Pretpostavlja se da je za nastanak urolitijaze u djece potreban veći disbalans promotora/inhibitora kristalizacije nego u odraslih zbog toga što urolitijaza u djece nastaje u kraćem životnom vremenskom razdoblju. Da bi nastala urolitijaza u djece, treba svladati njihov primarno jači inhibitory



potencijal urina koji nastaje povećanim izlučivanjem citrata i GAG u odnosu na odrasle. Taj povišeni inhibitorni potencijal mokraće nastaje vjerojatno zbog rasta dugih kostiju u djece (Miyake-1999, Miyake-2001, Momohara-2009). Kako bi se izbjegao utjecaj kalcija kao glavnog promotora kristalizacije, razmotreni su isključivo oksalati, citrati i GAG i njihovi omjeri a kalcij je izostavljen iz analize. Tako ulogu glavnog promotora kristalizacije umjesto kalcija preuzimaju oksalati i njihova se uloga u nastanku urolitijaze može lakše odrediti. Citrati i GAG također lakše dolaze do izražaja kao varijable u omjerima s oksalatom.

Istraživanja uzroka urolitijaze u djece u Republici Hrvatskoj su malobrojna (Batinić-2000, Batinić-2003, Milošević-1998, Milošević-2003, Milošević-2014). Životna dob djece u ovoj studiji ne odstupa od prosječne životne dobi u dosadašnjim istraživanjima djece s urolitijazom (Tablica 1) (Milošević-2003, Milošević-2014). Distribucija po spolu odražava predominaciju muške djece što odstupa od prethodnog rada u kojem se u zadnjih 10 godina nalazi podjednak omjer muške i ženske djece (Milošević-2014). Ovaj nesrazmjer je djelomično uzrokovan činjenicom da su u ovom radu korišteni i podaci stariji od 10 godina kada je predominacija muškog spola bila izrazitija. Također je poznato da u genetski definiranih i obiteljskih urolitijaza ovaj omjer ponovno prelazi na stranu muškog spola (Milošević-2014). Kako djeca s genetski uzrokovanom hiperoksalurijom, pozitivna na PH I, II, III mutacije nisu uključena u studiju, predominacija muške djece upućuje i na mogućnost postojanja do sada nepoznatih genetskih uzroka (Belostotski-2012). Na moguće nepoznate genetske uzroke upućuju i djeca s iznadprosječnim i ekstremnim vrijednostima omjera oksalati/(citrati × GAG) u Slici 1. Stoga četvero djece s kod kojih su nađena takva odstupanja treba ponovno detaljnije i detaljnije ispitati.

Oksalurije su u djece u Republici Hrvatskoj obično ispitivane zajedno s genskim oboljenjima (PH I II, IH u djece s HOGA 1 nedefiniranim statusom) (Batinić-2000, Batinić-

2003, Milošević-1998, Milošević-2003). Vjerojatno su stoga promotori/inhibitori kristalizacije kao i njihovi omjeri koji u genskih oboljenja pokazuju veća odstupanja većinom ostali nesignifikantnih p vrijednosti. Do sada omjeri promotora/inhibitora urolitijaze nisu izražavani na mol kreatinina. Smatrali smo vrijednim ispitati njihovu vrijednost standardizacijom na mol kreatinina kao standardnog korektora u analizi izlučivanja svih urinarnih komponenti.

Citrati su do sada u radovima uglavnom ispitivani ili samostalno ili u omjeru s kalcijem a vrlo rijetko u kombinaciji s oksalatima (Batinić-2000, Batinić-2003, Milošević-1998, Milošević-2003). Značaj citrata je prepoznat u omjerima s kalcijem (Akçay-1996, Akinci-1991, Batinić-2000, Batinić-2003, Erbagci-2003, Kovacevic-2012, Milošević-2003, Trinchieri-1992). Protektivna uloga kalcijevog citrata zasniva se na topljivosti ovog spoja u mokraći. Stoga je očekivan viši omjer oksalati/citrati u djece s urolitijazom zbog potencijalno sniženih citrata u urinu. Međutim, naši rezultati ne pokazuju statistički značajno odstupanje vrijednosti ovog omjera u zdrave djece od djece s urolitijazom. Jedan od mogućih razloga je slabiji litogeni potencijal oksalata u odnosu na kalcij (DeFoor-2010). Hipocitaturija se znatno češće nalazi u djece s rekurentnom urolitijazom (30% vs 13%) (DeFoor-2010) . Kako smo najčešće ispitivali mokraću djece s jednom epizodom urolitijaze, smanjena je i vjerojatnost nalaza hipocitaturije i viših vrijednosti omjera oksalati/citrati.

Posebno su rijetki radovi koji se bave izlučivanjem GAG u mokraći djece s urolitijazom i njihova je uloga slabo definirana (Akinci-1991, Harangi-1996, Michelacci-1989, Michelacci-1992, Trinchieri-1992). Usprkos svom negativnom naboju i time vrlo potentnom mogućnošću vezivanja s kalcijem, sami se u djece praktički nikada ne mogu izraziti kao samostalna varijabla. Snižene se vrijednosti GAG u djece s urolitijazom nalaze samo iznimno (Akçay-1999). Kako se u radovima koji se bave urolitijazom obično nalazi

mali broj djece, utjecaj GAG-a u nastanku i/ili razvoju urolitijaze teško se može statistički izraziti. Stoga se najčešće koriste omjeri promotora/inhibitora u kojima su oni jedna od više komponenti (Baggio-1982, Baggio-1983, Batinić-2000). Razlaganje GAG na njegove sastavne komponente nije praktično za analizu u uobičajenim ambulantnim uvjetima rada, a normalne vrijednosti ovih komponenti u djece nisu definirane. Ni terapija u slučaju sniženih vrijednosti nije standardizirana. Stoga se određivanje ovih komponenti u mokraći smatra skupim i nepraktičnim.

Inhibitorni potencijal GAG se najbolje izražava u složenom omjeru oksalati/(citrat  $\times$  GAG) (Baggio-1982, Baggio-1983, Batinić-2000). U osnovi omjer pretežito odražava značaj izlučivanja oksalata kao promotora u mokraći djece s urolitijazom unutar normalnih vrijednosti. Oksalat čini samo jednu od komponenti omjera a i svaka se varijabla ovog omjera nalazi zasebno unutar granica normale. Stoga mali odkloni na gornjim granicama normala pojedinih varijabli, najčešće u trećoj kvartili (Q3) ili blizu maksimalnih vrijednosti imaju kumulativni učinak i bivaju pojačani drugim komponentama omjera. Rezultat je da sve komponente omjera dodaju svoju vrijednost omjeru koji onda uspijeva razdvojiti djecu s urolitijazom od zdrave djece. I drugi su autori zamijetili ovaj kumulativni učinak (Baggio-1982, Baggio-1983, MacDougall-2010). U osnovi se kumulativni se učinak pojačava dodavanjem svake nove komponente (Baggio-1982).

Rezultat našeg istraživanja potvrđuje mišljenje da su GAG važna sastavnica kompleksnog omjera oksalati/(citrat  $\times$  GAG) čija vrijednost njegovim dodavanjem postaje statistički značajna (Baggio-1982, Baggio-1983, Batinić-2000). ROC analizom se vrijednost omjera oksalati/ (citrat  $\times$  GAG)  $>$  0.0782 mmol/mol kreatinina pokazala optimalnim kriterijem za razlikovanje djece s urolitijazom od zdrave djece. Područje ispod ROC krivulje,

standardna pogreška, P-vrijednost te senzitivnost i specifičnost sa 95% granicom pouzdanosti čine ga dijagnostički prihvatljivim (Tablica 3., Slika 2.).

Značaj oksalata u nastanku urolitijaze je najuočljiviji u djece s PH. Izlučivanje oksalata mokraćom je toliko veliko da recidive urolitijaze nije moguće izbjeći nego samo ublažiti. Recidivi urolitijaze u kojoj je IH primarni uzrok nastanka kamenca su razmjerno rijetki (Milošević-2014). Djelomični razlog je u slabijem litogenom potencijalu oksalata u odnosu na kalcij (DeFoor-2010). Drugi mogući razlog je još uvijek djelomično očuvana protektivna koncentracija citrata i GAG u urinu djece s IH u odnosu na djecu s PH (Miyake-1999, Miyake-2001, Momohara-2009, Trinchieri-1992).

### **Zaključci:**

Istraživanja promotora/inhibitora urolitijaze koja sadrže oksalate, citrate i glikozaminoglikane u obliku samostalnih varijabli ili njihovih međusobnih omjera su malobrojna. Ispitan je urin djece s idiopatskom urolitijazom s isključenim genskim uzrocima (PH I, II, III). Rezultat ove studije upućuje da se tek složenom interakcijom između više promotora/inhibitora koji čine omjer oksalati/(citrati × GAG) može doći do zajedničke vrijednosti koja odražava utjecaj svih varijabli u omjeru. Oksalati kao glavni promotori urolitijaze ne mogu se samostalno izraziti u djece s IH, niti kao dio jednostavnog omjera s citratima ili glikozaminoglikanima. Oni postaju značajni kao uzrok tek u složenom omjeru u kojem se u nazivniku nalazi produkt obaju inhibitora (citrati×GAG). Vrijednost se citrata i glikozaminoglikana kao inhibitora u djece u Republici Hrvatskoj izražava isključivo kroz omjer oksalati/(citrati×GAG) mmol/mol kreatinina. Vrlo su rijetke studije u kojima se manjak GAG u mokraći uopće iskazuje kao uzrok u nastanku urolitijaze. Vrijednost omjera > 0.0782 dobijena ROC analizom nađena je dijagnostički prihvatljivom za razlikovanje djece s urolitiazom od zdrave djece. Sve vrijednosti iznad navedene mogu se smatrati dijagnostički pozitivnim na IH ukoliko se

isključuje hiperkalciurija i genske mutacije (PH I,II,III). Tada glavni čimbenik za nastanak urolitijaze predstavlja hiperoksalurija u kombinaciji s manjkom i/ili nedostatkom citrata i GAG u mokraći djece.

## **Zahvale**

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Danici Batinić na pruženoj prilici za pisanje prvog znanstvenog rada. Zahvaljujem se i svojim roditeljima koji su mi omogućili da studiram na ovom fakultetu i bili velika podrška tijekom cijelog studija.

## Popis literature:

1. Akçay T, Konukoğlu D, DİNÇER Y. Urinary glycosaminoglycan excretion in urolithiasis. Arch Dis Child 1999;80(3):271-2.
2. Akçay T, Konukoğlu D, Celik C, Hypocitraturia in patients with urolithiasis. Arch Dis Child 1996;74:350-1.
3. Akinci M, Esen T, Kocak T, et al. Role of inhibitor deficiency in urolithiasis. I.Rationale of urinary magnesium, citrate, pyrophosphate and glycosaminoglycan determinations. Eur Urol 1991;19(3):240-3.
4. Baggio B, Gambaro G, Oliva O, et al. Calcium oxalate nephrolithiasis: an easy way to detect an imbalance between promoting and inhibiting factors. Clin Chim Acta 1982;124(2):149-55.
5. Baggio B, Gambaro G, Favaro S, et al. Juvenile renal stone disease: a study of urinary promoting and inhibiting factors. J Urol 1983;130(6):1133-5.
6. Batinić D, Milošević D, Blau N, et al. Value of the stone promoters/inhibitors ratios in the estimation of the risk of urolithiasis. J Chem Comput Sci 2000;40(3):607–10.
7. Batinić D, Milošević D, Konjevoda P, et al. The value of urine citrate/calcium ratio in the estimation of risk of urolithiasis. Clin Nephrol 2003;61:387-91.
8. Belostotsky R, Pitt JJ, Frishberg Y. Primary hyperoxaluria type III--a model for studying perturbations in glyoxylate metabolism. J Mol Med (Berl) 2012;90(12):1497-504.
9. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal Biochem 1962;4:330-4.
10. Bonses RV, Taussky HH. On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. J Biol Chem 1951;158:581-91.

11. Cao LC, Deng G, Boeve ER, et al. Does urinary oxalate interfere with the inhibitory role of glycosaminoglycans and semisynthetic sulfated polysaccharides in calcium oxalate crystallization? *Eur Urol* 1997;31(4):485-92.
12. Classen A, Hesse A. Measurement of urinary oxalate: an enzymatic and ion chromatographic method compared. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:95-9.
13. DeFoor WR, Jackson E, Minevich E, et al. The risk of recurrent urolithiasis in children is dependent on urinary calcium and citrate. *Urology* 2010;76:242–5.
14. Erbagci A, Erbagci AB, Yilmaz M, et al. Pediatric urolithiasis-evaluation of risk factors in 95 children. *Scand J Urol Nephrol* 2003;37:129–33.
15. Erturk E, Kiernan M, Schoen SR. Clinical association with urinary glycosaminoglycans and urolithiasis. *Urology* 2002;59(4):495-9.
16. Fellström B, Danielson BG, Karlsson FA, et al. Crystal inhibition: binding of heparin and chondroitin sulphates, heparin, pentosan polysulphate and Tamm-Horsfall glycoprotein. *Urol Res* 1984;12:81-3.
17. Harangi F, Gyorke Z, Melegh B. Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy and stone-forming children. *Pediatr Nephrol* 1996;10(5):555-8.
18. Kovacevic L, Wolfe-Christiansen C, Edwards L, et al. From hypercalciuria to hypocitraturia - a shifting trend in pediatric urolithiasis? *J Urol* 2012;188(4 suppl):1623–7.
19. Kohri K, Garisde Y, Blacklock NJ. The effect of glycosaminoglycans on the crystallisation of calcium oxalate. *Br J Urol* 1989;63:584-90.
20. MacDougall L, Taheri S, Crofton P. Biochemical risk factors for stone formation in a Scottish paediatric hospital population. *Ann Clin Biochem.* 2010;47(Pt 2):125-30.
21. MedCalc Software 2013. MedCalc, version 12.5.0.0, [www.medcalc.com](http://www.medcalc.com).



22. Michelacci YM, Boim MA, Bergamaschi CT, et al. Possible role of chondroitin sulphate in urolithiasis: in vivo studies in an experimental model. *Clin Chim Acta* 1992;208(1-2):1-8.
23. Michelacci YM, Glashan RQ, Schor N. Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. *Kidney Int* 1989;36(6):1022-8.
24. Milošević D, Batinić D, Blau N, et al. Determination of urine saturation with computer program Equil 2 as a method for estimation of the risk of urolithiasis. *J Chem Inf Comput Sci* 1998;38:646-650.
25. Milošević D, Batinić D, Konjevoda P, et al. Analysis of calcium, oxalate and citrate interaction in idiopathic calcium urolithiasis in children. *J Chem Inf Comput Sci* 2003;43:1844-7.
26. Milošević D, Batinić D, Batinić D, et al. Demographic characteristics and metabolic risk factors in Croatian children with urolithiasis. *Eur J Pediatr* 2014;173(3):353-9.
27. Miyake O, Yoshimura K, Tsujihata M, et al. Possible causes for the low prevalence of pediatric urolithiasis. *Urology* 1999;53(6):1229-34.
28. Miyake O, Kakimoto K, Tsujihata M, et al. Strong inhibition of crystal-cell attachment by pediatric urinary macromolecules: a close relationship with high urinary citrate secretion. *Urology* 2001;58(3):493-7.
29. Momohara C, Tsujihata M, Yoshioka I, et al. Mechanism underlying the low prevalence of pediatric calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 2009;182(3):1201-9.
30. Motulsky H. *Intuitive biostatistics*. Oxford: Oxford University Press; 1995.

31. Neufeld EF, Muenzer J: The mucopolysaccharidoses. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Eighth edition. Edited by CR Scriver, AL Beaudet, D Valle, et al. New York, McGraw-Hill Book Company, 2001; 3421-52.
32. Nikkila M. Urinary glycosaminoglycans excretion in normal and stone-forming subjects. Significant disturbance in recurrent stone formers. Urol Int 1989;44:157-9.
33. Nishio S, Abe Y, Wakatsuki A. Matrix glycosaminoglycan in urinary stones. J Urol 1985;134:503-5.
34. Poon NW, Gohel MD. Urinary glycosaminoglycans and glycoproteins in a calcium oxalate crystallization system. Carbohydr Res. 2012;347(1):64-8.
35. StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA (data analysis software system), version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
36. Tefekli A, Esen T, Ziylan O, et al. Metabolic risk factors in pediatric and adult calcium oxalate urinary stone formers: is there any difference? Urol Int 2000;459:1–10.
37. Trinchieri A, Mandressi A, Luongo P, et al. Urinary excretion of citrate, glycosaminoglycans, magnesium and zinc in relation to age and sex in normal subjects and in patients who form calcium stones. Scand J Urol nephrol 1992;26(4):379-86.
38. VanDervoort K, Wiesen J, Frank R, et al. Urolithiasis in pediatric patients: a single center study of incidence, clinical presentation and outcome. J Urol 2007;177:2300–5.

## **Životopis**

Rođen sam u Zagrebu 18. rujna 1989. Pohađao sam Osnovnu školu "Gračani", a srednjoškolsko obrazovanje nastavio sam u 2. gimnaziji. Nakon položene mature, 2009. godine upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od 2011. godine surađujem na raznim projektima pod vodstvom prof. dr. sc. Danice Batinić.