

## **CAPITOLO 3**

---

COMPOSIZIONE DEI CALCOLI RENALI DEI RESIDENTI IN BASILICATA

### 3.1 INTRODUZIONE

Lo scopo di una *stone analysis* non è solo quello di differenziare qualitativamente tutti i componenti dei calcoli renali, ma anche studiarne la struttura interna, al fine di fornire indicazioni utili sui meccanismi di nucleazione e successiva crescita dei calcoli [Daudon et al. 1993, 2004; Jaeger 1996].

Per raggiungere questo obiettivo è necessario scegliere la tecnica analitica giusta che risponda ai criteri di affidabilità, di efficacia, di precisione e che non sia eccessivamente costosa.

Da una analisi critica della letteratura scientifica in merito all'analisi dei calcoli, sono state raccolte informazioni sui metodi e tecniche più utilizzate per identificare i componenti presenti nei calcoli, cercando di evidenziarne i pregi ed i difetti.

**Tabella 3.1 Confronto tra le tecniche analitiche più utilizzate. + : poco adatta; +++++: molto adatta**  
*Comparison between the most utilized analytical techniques. +: Not so useful; very useful:+++++*

Tecnica	Costi	Tempi	Quantità a campione	Accuratezza	Identificazione tipo di calcolo
Analisi Chimiche	+	++	++++	+	+
Diffrazione di raggi X	++	++	++	+++	++
Spettroscopia ad infrarosso	+++	+++	++++	++++	++
Analisi termiche	+++	++	+++	+++	++
Microscopia ottica	++++	++++	++++	++	+++
Microscopia elettronica a scansione	++	++	++++	++++	++++

Nel 1860 J.F. Heller propose un primo schema di analisi chimica per studiare i calcoli renali. Questo si basava sull'individuazione del colore, della durezza e della reazione chimica a reagenti posti direttamente sul materiale asciutto.

Attualmente, le metodologie analitiche per lo studio dei calcoli sono aumentate e, soprattutto, specializzate per identificare molto più correttamente i loro componenti maggiori e minori e la loro struttura interna.

Bisogna sempre distinguere, però, le tecniche utilizzate per scopi scientifici da quelle necessarie per la pratica clinica.

Ci sono molte tecniche utili per risalire alla composizione dei calcoli, comprese le analisi chimiche [Hodgkinson 1971; Westbury & Omenogor 1970], la spettroscopia infrarossa [Bellanato et al. 1973; Takasaki 1971], la diffrazione di raggi X su polveri [Gibson 1974; Lonsdale et al. 1968], la microscopia elettronica a scansione [Spector et al. 1978] e la spettrofotometria in assorbimento atomico [Atakan et al. 2007].

L'analisi dei calcoli al microscopio, ha subito una sostanziale modifica con l'avvento della microscopia elettronica, ma la sola osservazione dei calcoli al microscopio ottico presentava già alcuni vantaggi. Primo fra tutti, i costi ridotti e la velocità di analisi.

Osservare un calcolo al microscopio ottico è la prima e la più facile operazione che anche un medico nel suo studio può eseguire, soprattutto non è richiesta nessuna preparazione del campione ed è un'analisi non invasiva. L'identificazione delle varie componenti è però limitata. Se sono facilmente distinguibili le due forme di ossalato di calcio, è più difficile distinguere una bruscite da una struvite.

Questi svantaggi sono superabili con la microscopia elettronica a scansione, ma con un conseguente aumento dei costi e tempi di analisi.

Il maggiore costituente i calcoli renali è l'ossalato di calcio, la cui formula generale è  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ , dove per  $n$  sta il numero di molecole d'acqua legate che può variare da 1 a 2. Dal momento che i cristalli di ossalato possono accrescersi su cristalli inorganici o organici è possibile trovare molecole d'acqua all'interno della struttura del cristallo o nella materia organica nel suo intorno.

Una delle maggiori difficoltà nell'analisi dei calcoli renali risiede nel fatto che non tutte le tecniche sono in grado di dare informazioni strutturali di queste molecole d'acqua, impedendo la corretta identificazione delle due forme idrate dell'ossalato di calcio. Per esempio le analisi chimiche, la spettroscopia infrarossa e le analisi termo-gravimetriche non possono essere di aiuto nel distinguere le molecole d'acqua strutturali o interstiziali. Al contrario la tecnica di diffrazione di raggi X associata al metodo del raffinamento Rietveld, è in grado di definire la posizione delle molecole d'acqua e di conseguenza stabilire di quale tipo di ossalato si tratta, consentendo anche di stimarne la quantità presente [Orlando et al. 2008].

Con la diffrazione dei raggi X è possibile analizzare i calcoli, avendo il vantaggio di identificare i suoi componenti cristallini, ed ottenere una determinazione quantitativa, il tutto in tempi relativamente brevi. Lo svantaggio più grande riguarda i costi dell'analisi e la necessità di avere una certa esperienza con la tecnica, nonché la necessità di polverizzare parte o tutto il campione.

La spettroscopia a raggi X è una tecnica moderatamente costosa, ma è

diffusissima per la sua vasta gamma di impieghi. Come per l'XRD, con l'IR si può individuare un composto cristallino ma in più anche quelli non cristallini, in un tempo più ridotto e con una quantità di campione molto più piccola.

Un altro motivo di discriminazione tra le varie tecniche di analisi è il quantitativo di materiale necessario. Con la tecnica XRD (per polveri o a cristallo singolo) è possibile investigare piccoli frammenti del calcolo, recuperati nelle urine dopo un trattamento di litotrissia sul calcolo in esame, senza la necessità di asportarlo chirurgicamente, assumendo che il frammento sia rappresentativo dell'intero.

Dall'esperienza maturata, anche durante un periodo di stage presso il *Laboratory of Renal Lithiasis Research* dell'Università degli studi delle Isole Baleari - Spagna, e sulla base dei dati di letteratura, risulta che nella maggior parte dei casi l'analisi di un calcolo richiede l'uso di più tecniche analitiche.

L'uso di tecniche analitiche integrate permette di ottenere maggiori informazioni sulle proprietà di cristalli biologici e sulle interazioni tra cristalli e fase organica.

## 3.2 MATERIALI E METODI

Le ridotte dimensioni dei campioni hanno richiesto la messa a punto di un protocollo di analisi specifico per questo tipo di materiale, vista anche la necessità di utilizzare, soprattutto, tecniche non distruttive.

### 3.2.1 La raccolta dei calcoli renali

Dal dicembre 2006 al gennaio 2009, sono stati raccolti tutti i calcoli prodotti da 80 pazienti/donatori ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera "San Carlo" di Potenza, grazie alla disponibilità dei medici operanti nel Dipartimento di Nefrologia e Litotrissia e del loro staff.

In particolare i calcoli raccolti derivano da 45 uomini e 35 donne. I calcoli sono stati tutti recuperati per espulsione spontanea o per via chirurgica.

Il 54% dei pazienti ha prodotto contemporaneamente più di un campione.

Ogni campione raccolto è stato prontamente conservato a secco in una provetta sterile ed etichettato con una sigla identificativa del paziente, corrispondente al questionario informativo che è stato fatto compilare (vedi capitolo 2).

I questionari sono stati trasferiti presso il Laboratorio di Geologia Medica e Ambientale dell'IMAA-CNR di Tito Scalo (Pz) ed i calcoli conservati in un essiccatore per almeno una settimana.

Ogni campione è stato fotografato e, ad esso, è stata assegnata una scheda identificativa.



**Figura 3.1 Esempio di stoccaggio e raccolta fotografica dei Campioni**  
*Example of storage and sample photo collection*

Per ogni campione sono state determinate le dimensioni ed il peso.

In presenza di residui di materia organica (sangue o urina) i campioni sono stati pretrattati con acqua ossigenata (o etanolo in caso di residui più abbondanti), lavati con acqua distillata ed asciugati a 100°C per 12 ore.

 Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto di Metodologie per l'Analisi Ambientale - Laboratorio di Geologia Medica e Ambientale -	
Data analisi: _____	
CODICE CAMPIONE: _____	N.PROG. _____
Laboratorio di analisi: LGMA	Analizzatore: dott.ssa M.L. GIANNOSI
Provenienza: _____	
N. questionario: _____	Sesso: _____
Nome: _____	Anno: _____
Cognome: _____	
Residenza: _____	
STUDIO DEL CALCOLO	
N. di esecoli: _____	Dimensione: _____
Forma: _____	Deposito Superficiale: _____
Colore: _____	Punto di contatto alla papilla: _____
Aspetto esterno:	
Aspetto interno:	
Tipo di analisi eseguite:	
MICROSCOPIA OTTICA: _____	MICROSCOPIA A SCANSIONE: _____
SPEI. INFRAROSSO: _____	DIFFRATTOMETRIA: _____
ANALISI CHIMICHE: _____	FOTO N.: _____
Note: _____	
COMPOSIZIONE CALCOLO: _____ - TIPO: _____	
<small>IRMAA - CNR, Contrada Santa Lolla, Tito Scalo (PS) - Tel: 0971.427.247 mail: cianrossi@irmaa.cnr.it</small>	

**Figura 3.2 Scheda d'analisi del campione**  
*Sample analytical report*

### 3.2.2 Le tecniche di caratterizzazione dei calcoli renali

#### LA MICROSCOPIA OTTICA

Tra i metodi di indagine mineralogica, la microscopia ottica rappresenta una metodologia di grandissima importanza per la versatilità, per l'ottimo rapporto costo benefici e per l'elevata qualità e quantità di informazioni ottenibili.

La microscopia ottica, senz'altro meno sofisticata e meno costosa degli altri metodi, offre una serie di informazioni mineralogiche molto interessanti quali (i) l'identificazione del minerale, (ii) l'analisi delle proprietà ottiche e (iii) l'organizzazione spaziale delle specie minerali nel campione.

Anche se con difficoltà sono state analizzate sezioni sottili di calcoli renali in microscopia ottica.

Per avere, invece, una visione del campione non trattato, intero o sezionato, è stato utilizzato lo "stereo-microscopio".

Il campione osservato allo stereo-microscopio è stato fotografato a diversi ingrandimenti (da 10x o 20x fino a 100x).

Durante questa fase di osservazione a grande scala è stata individuata una sezione preferenziale di taglio ed il calcolo è stato sezionato con un bisturi sterilizzato.

Durante le osservazioni, particolare attenzione è stata posta alle caratteristiche sia esterne (forma, colore, dimensione, cristalli visibili, presenza di punti di contatto papillari, concrezioni esterne, ecc) che interne.

L'osservazione della parte interna del calcolo ha fornito ulteriori indicazioni: identificazione dei cristalli, della loro struttura, della presenza di un nucleo e della sua posizione e composizione, eventuali trasformazioni dei cristalli in altri minerali.

#### LA DIFFRAZIONE DI RAGGI X

La tecnica analitica di diffrazione a raggi X (XRD) è la più utilizzata per l'analisi mineralogica poiché dai risultati diffrattometrici si possono ricavare anche informazioni aggiuntive quali, ad esempio, la struttura cristallina, il grado di "cristallinità" dei minerali e la carica di strato.

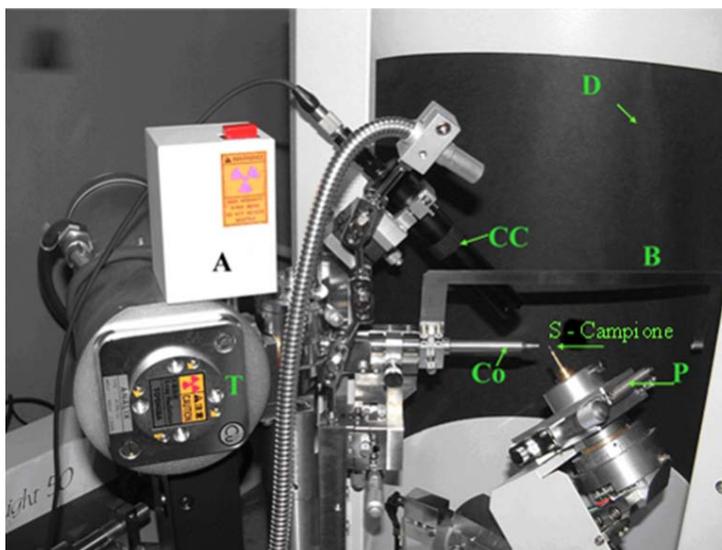
Storicamente è stata la prima tecnica ad essere utilizzata per l'identificazione dei minerali e per la corretta determinazione della loro struttura cristallografica, che in precedenza veniva dedotta dal modo in cui i cristalli si fessuravano, dalle loro proprietà ottiche e dall'aspetto esterno. La geometria interna del cristallo, invece, si basava puramente su ipotesi.

Gli spettri delle analisi diffrattometriche eseguite sui campioni di calcoli renali sono stati collezionati utilizzando il microdiffrattometro D/max RAPID

Rigaku. Questo si basa sul principio di Debye-Scherrer ed utilizza la tecnica della diffrazione a raggi X bidimensionale (XRD<sup>2</sup>) la quale permette di acquisire spettri di diffrazione in due dimensioni simultaneamente. Ciò vuol dire che permette di raccogliere, simultaneamente, una grande porzione, se non tutto l'anello di diffrazione. Da qui la possibilità di analizzare un materiale contenente un numero limitato di cristalliti [Colombi et al., 2003].

Il D/max è equipaggiato (figg. 3.3) con un tubo a raggi X con una potenza di 2 kW che produce una radiazione CuK<sub>α</sub> che attraversa un monocromatore costituito da un cristallo di grafite. L'apparecchiatura è corredata da una serie di sei collimatori di diverso diametro (10, 30, 50, 100, 300, 800 μm) che permettono di scegliere l'ampiezza del fascio e quindi la grandezza dell'area da investigare. Sul collimatore è agganciato un *beam stopper* atto a prevenire il danneggiamento del detector da parte del fascio diretto.

I riflessi prodotti dal campione vengono registrati da un detector IP (*Imaging Plate*) cilindrico che è posto a 12,74 cm dal campione e può misurare un'immagine XRD<sup>2</sup> in un range di  $2\theta$  che copre 204° orizzontalmente e  $\pm 45^\circ$  verticalmente dalla direzione del fascio diretto.



**Figura 3.3** Microdiffrattometro D/max Rapid. T= tubo rx; A= monocromatore;  
Co=collimatore; CC= CCD camera; S= campione; P= portacampione;  
B= beam stopper; D= IP detector

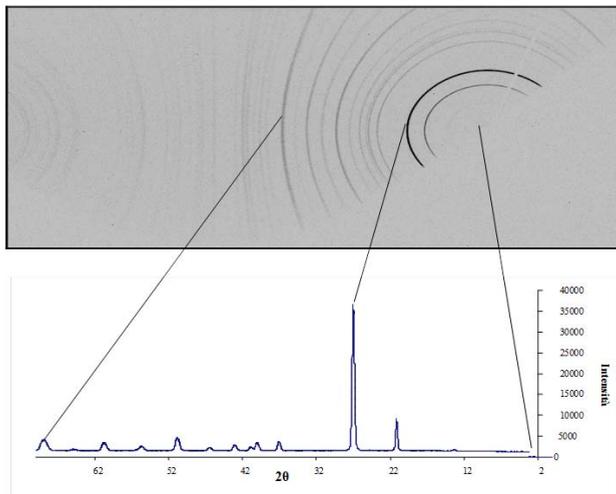
*Microdiffractometer D7max rapid. T= X ray tube; A=monochromator; Co=collimator; CC=photocamera;  
CCD=sample; P=sample holder; B= beam stopper; D= IP detector*

Il campione è situato su un supporto meccanico che può compiere due differenti rotazioni grazie ad un sistema a 2 assi: l'asse  $\omega$  che coincide con l'asse centrale dell'IP e compie una rotazione da  $-15$  a  $+150^\circ$ , l'asse  $\Phi$  inclinato di  $45^\circ$  rispetto all'asse  $\omega$  che può ruotare per  $360^\circ$ ; e corrisponde all'asse di rotazione del campione. L'inclinazione di  $45^\circ$  di quest'asse permette all'IP detector di rivelare tutti i raggi diffratti coprendo l'intero range di  $2\theta$ .

Lo strumento è provvisto anche di un sistema ottico costituito da una CCD camera (zoom fino a 200 x) e da una lampadina ad alta intensità, che unitamente alla CCD permette l'allineamento del campione e di verificare se l'area che verrà colpita dal fascio sia a fuoco. A tal proposito è importante ricordare che il portacampione è dotato di tre viti senza fine che permettono al campione piccoli spostamenti lungo la verticale dell'asse  $\Phi$  (asse Z,  $\pm 10\text{mm}$ ) e nel piano perpendicolare ad esso (assi X,Y,  $\pm 5\text{ mm}$ ) per focalizzare la posizione d'interesse.

Per la gestione di tutto lo strumento, dall'impostazione dei parametri e delle analisi alla semplice visualizzazione dell'immagine della CCD camera, si utilizza un software Rigaku® compatibile col sistema Windows.

In particolare le impostazioni richieste per eseguire una ripresa diffrattometrica sono: nome dell'operatore, tipo e nome del campione, potenza del fascio (es. 40kV-30mA), tipo di collimatore, tempo di esposizione, rotazione dei due assi  $\Phi$  ed  $\omega$ . L'immagine acquisita può essere elaborata con l'ausilio dello stesso software che permette di poter visionare lo spettro e di convertire l'immagine in termini di  $2\theta$  per ottenere un classico diffrattogramma (fig. 3.4).

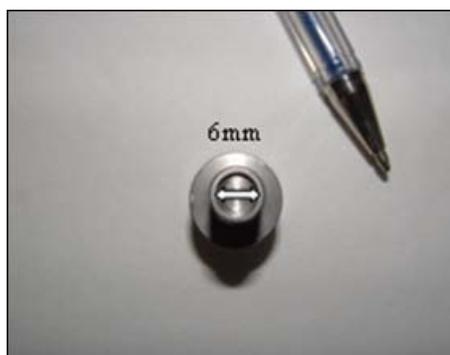


**Figura 3.4** Esempio di conversione di uno spettro e nel relativo diffrattogramma

*Example of spectrum conversion in diffractometer profile*

I parametri utilizzati per la conversione sono:

- *offset width*: rappresenta l'ampiezza del dato da integrare. In altre parole è l'area dello spettro da cui si ricava il diffrattogramma;
- passo di campionamento (*step width*):  $0.02^\circ$ ;
- *noise*: rappresenta il valore del rumore di fondo che viene sottratto dai valori di intensità. Il software sottrae un valore via via crescente con l'aumentare dell'angolo  $2\theta$ , che varia secondo una funzione Lorenziana.
- L'associazione mineralogica del campione è stata determinata sulle polveri orientate casualmente con le seguenti condizioni operative:
  - Radiazione: Cu  $K_\alpha$ ;
  - Monocromatore: cristallo di grafite;
  - Tensione: 40 kV;
  - Collimatore: 100 micron;
  - Corrente: 30 mA;
  - Rotazione ( $\Phi$ ) del portacampione intorno al suo asse: in media  $180^\circ$  ma ridotta anche a  $60^\circ$  per quantitativi molto bassi;
  - Velocità di rotazione del portacampione: 6 giri al minuto;
  - Rotazione ( $\omega$ ) del portacampione intorno al collimatore: fissa;
  - Portacampione: cilindrico avente sulla sommità una cavità del diametro di 6mm e profondità 1mm (fig. 3.5);
  - Durata della ripresa: 1 ora.



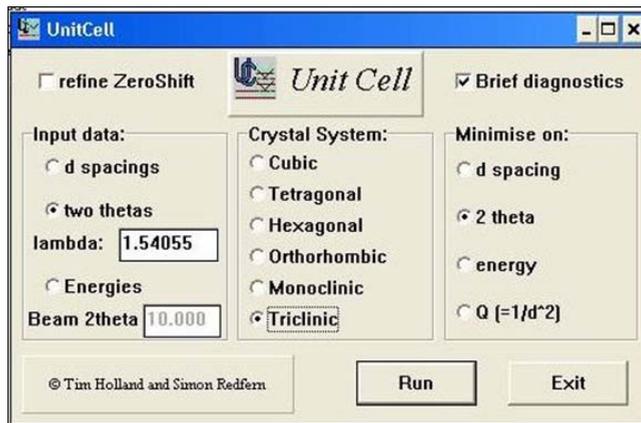
**Figura 3.5 Portacampione per analisi di polveri al microdiffrattometro**

*Sample holder for powder microdiffraction analysis*

L'interpretazione qualitativa dei profili diffrattometrici ricavati è avvenuta attraverso il confronto dei picchi di riflessione con quelli riportati nelle schede PDF (*Powder Diffraction File*) [ICDD 2005].

Per la determinazione dei parametri di cella è stato adoperato un programma *open-source* Unitcell [Holland & Redfern 1997], che consente di raffinare i parametri di cella di un minerale dai profili diffrattometrici e che si basa sul metodo non-lineare dei minimi quadrati.

Il programma, attraverso delle regressioni e altre iterazioni matematiche, consente di cancellare eventuali dati che sono deleteri per il raffinamento finale ma indica anche quali dati, non potendo essere cancellati perché importanti ai fini del risultato, devono solo essere opportunamente modificati. Queste correzioni vengono eseguite su ogni picco di riflessione presente nel diffrattogramma.



**Figura 3.6** Schermata del programma UnitCell per il calcolo dei parametri di cella  
*Unit Cell software page for unit cell dimension calculation*

Sono state scelte le riflessioni migliori per ogni fase presente in un diffrattogramma ed ad ognuna di queste è stato assegnato l'indice  $hkl$  con riferimento alle schede PDF [ICDD 2005] per generare il file di input del programma di calcolo.

Un numero elevato di riflessioni sono state scelte, lasciando al programma, nella fase di analisi di regressione lineare, l'identificazione di quali punti nel set di dati inseriti erano da eliminare e quali da raffinare perché altamente influenzanti il risultato finale.

Il grande vantaggio di questo semplice programma sta nel fatto di avere una serie di parametri diagnostici per valutare la bontà del raffinamento finale come l'Rstudent (che deve essere  $<2.0$  al 95% di confidenza affinché il risultato abbia significatività statistica) che in base al valore assunto indicano su quale dei punti osservati si deve intervenire per migliorare la corrispondenza tra il dato calcolato e quello osservato.

### L'ANALISI MICROSCOPICA DI SEZIONI SOTTILI

Lo studio delle sezioni sottili è tra le tecniche di indagine micro-morfologica più diffusa e di maggior successo in vari campi della ricerca. La loro osservazione attraverso l'applicazione di tecniche microscopiche e submicroscopiche consente l'identificazione di differenti costituenti del campione e ne determina le relazioni reciproche nello spazio (ed a volte nel tempo).

Alla luce di questa considerazione si evidenziano le potenzialità che derivano dall'applicazione di questa tecnica allo studio dei calcoli renali. Infatti, lo studio in sezione sottile dei costituenti minerali dei calcoli, pur con i limiti legati alle ridotte dimensioni dei campioni, evidenzia la distribuzione e/o l'orientazione delle diverse componenti fornendo utili informazioni riguardo ai processi di formazione.

La preparazione delle sezioni sottili è avvenuta presso il laboratorio privato Iannone (Bari).

Per la preparazione di sezioni sottili di biominerali occorre seguire una serie di fasi di lavorazione, ossia: rimozione dell'acqua, impregnazione con resine e lavorazione del blocco polimerizzato e lavorazione della sezione sottile.

Una serie numerosa di resine può essere utilizzata nella fase di inclusione come ad esempio l'acetato di cellulosa, il gesso, il silicato di sodio o la resina epossidica. La scelta del tipo di resina deve tenere conto della natura del materiale da includere, della tossicità e viscosità della resina, nonché della facilità di utilizzo con particolare riferimento alle condizioni di polimerizzazione alla luce delle disponibilità di tempo dell'operatore e di attrezzature adeguate del laboratorio. Per i campioni di calcoli è stata scelta l'araldite.

Il campione è stato inglobato in ambiente ad alto vuoto per saturare i vuoti presenti e per consolidare le parti instabili. La fase di polimerizzazione è stata condotta a temperatura ambiente.

Dopo l'indurimento il campione incluso in resina è stato sezionato mediante l'utilizzo di una troncatrice a disco diamantato.

La superficie del campione è stata levigata e, successivamente, incollata su un vetrino portaoggetti ed assottigliata, fino ad ottenere uno spessore di circa 40  $\mu\text{m}$ .

La lucidatura delle superfici di taglio è stata realizzata con apposite macchine lappatrici fornite di piatti e paste abrasive diamantate di grana diversa (da 6  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$ ).

Per poter ricavare delle sezioni sottili di calcoli renali, sono stati scelti quelli di più grandi dimensioni che risultassero appartenenti a diversi gruppi, sulla base delle prime analisi.

### LA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE E MICROANALISI

Lo studio morfologico dei campioni è stato eseguito mediante tecniche di microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM).

Il microscopio elettronico a scansione utilizzato per l'analisi morfologica-tessiturale di dettaglio, è un Leica Stereoscan 440 Instrument della Cambridge Instruments disponibile presso il laboratorio di Geologia Medica e Ambientale dell'Istituto di Metodologie per l'Analisi Ambientale del CNR di Tito Scalo (Pz).



**Figura 3.7** Microscopio elettronico a scansione  
*Scanning electron microscopy*

Su frammenti o sezioni di calcoli renali sono state condotte diverse osservazioni.

I campioni sono stati selezionati per le dimensioni superficiali in modo da non superare la larghezza del supporto di osservazione (*stub*) con uno spessore massimo di 1cm. L'allontanamento di eventuale acqua presente nel campione è avvenuto mediante essiccamento all'aria.

Per incrementare la conducibilità elettrica dei campioni, per ridurre il riscaldamento e per aumentare l'emissione di elettroni secondari è stato necessario procedere alla ricopertura dei stessi con un conduttore come oro o grafite. Tale trattamento consente di mantenere la superficie del campione a potenziale elettrico costante, di evitarne l'eccessivo riscaldamento e di incrementare l'emissione di elettroni secondari.

Si è cercato di ottenere un film di ricopertura quanto più continuo possibile e di spessore tale (10-20 nm) da incrementare la conducibilità elettrica del campione, ma da non alterarne la morfologia superficiale.

Sebbene il microscopio elettronico sia stato utilizzato in questo studio

soprattutto per ottenere informazioni riguardanti la morfologia del campione esaminato, esso, com'è noto, è uno strumento ben più versatile: l'interazione tra il fascio di elettroni e il campione genera, infatti, tutta una gamma di segnali che possono essere utilizzati per ottenere dal campione informazioni sulla composizione.

Il sistema SEM-EDS (*Scanning electron microscopy & Energy-dispersive spectral analysis*) combina le informazioni morfologiche offerte dal microscopio elettronico a scansione con le informazioni qualitative e quantitative offerte dei raggi-X direttamente sulla sezione.

Lo spettrometro EDS richiede basse correnti di fascio, acquisisce velocemente gli spettri, ha pochi vincoli di installazione, ma non è molto sensibile; ha minor risoluzione, analizza peggio raggi-X a bassa energia (elementi leggeri).

Ciascun elemento presenta uno spettro caratteristico, tuttavia data la scarsa risoluzione energetica (~150 eV contro i pochi nm di ampiezza reale), spesso picchi di elementi diversi possono sovrapporsi e risultare indistinti. L'intensità integrale dei picchi è legata alla concentrazione dell'elemento presente nel volume di interazione, ma bisogna tener conto di fattori di correzione (legati al numero atomico, al riassorbimento, alla fluorescenza secondaria).

Selezionando i fotoni corrispondenti alla radiazione caratteristica di un particolare elemento, e utilizzando tale segnale per modulare in luminosità il monitor di osservazione, è stato possibile ottenere delle mappe che mostrano la distribuzione spaziale dell'elemento nel campione.

Inoltre, è stato possibile ottenere informazioni composizionali anche dall'analisi delle immagini da elettroni retrodiffusi (*backscattered electron - BSE*).

Gli elettroni retrodiffusi contengono informazioni legate sia alla densità del campione (e quindi composizione chimica) che alla sua morfologia e provengono da profondità massime di alcuni  $\mu\text{m}$ . Il rendimento di produzione degli elettroni retrodiffusi presenta inoltre una notevole dipendenza dal numero atomico medio del campione; infatti, nei campioni a basso numero atomico è superiore la profondità di penetrazione dell'elettrone, così che la diffusione multipla ha luogo all'interno del campione ed il numero di elettroni retrodiffusi è piccolo, mentre in campioni ad alto numero atomico il libero cammino medio tra due urti successivi è piccolo ed aumenta quindi la possibilità di diffusione, singola e multipla, vicino alla superficie.

Nel caso di osservazioni con rivelatore per elettroni retrodiffusi è stata necessaria la produzione di film di copertura estremamente sottili (1-2 nm di spessore) è stato, pertanto, utilizzato oro al posto della grafite.

Sono state eseguite anche osservazioni su sezioni sottili lucide opportunamente

ricoperte con grafite con l'utilizzo del microscopio elettronico presente presso il Laboratorio Grandi Strumentazioni dell'Università degli Studi della Basilicata. E' stato però subito scoperto che un'analisi prolungata su sezioni sottili di calcoli contenenti ossalati portava ad una alterazione dell'area di studio. Pertanto la maggior parte delle osservazioni riguardo la struttura interna dei calcoli renali è avvenuta osservando le sezioni sottili al microscopio ottico a luce polarizzata.

### 3.3 RISULTATI

Tutti i campioni raccolti sono stati analizzati, ma per quei pazienti che hanno prodotto contemporaneamente più campioni di una stessa tipologia di calcolo, questi esemplari sono stati considerati come un unico campione e i risultati composizionali si riferiscono ad uno solo di questi preso come il più rappresentativo (di solito quello ben conservato e di maggiori dimensioni). Non sono stati riscontrati casi di contemporanea espulsione di calcoli di tipologia differente.

Considerato ciò, un numero maggiore di calcoli sono stati analizzati (circa 100) ma ad ogni paziente è assegnato un solo calcolo rappresentativo per un totale di 80 calcoli renali.

#### 3.3.1 *Composizione dei calcoli renali*

##### L'ANALISI MINERALOGICA

Con appropriate combinazioni di osservazioni macroscopiche e microscopiche con specifiche tecniche analitiche, ogni calcolo renale raccolto è stato analizzato al fine di individuare i suoi componenti mineralogici e chimici.

I risultati dell'analisi dei campioni mostrano che i componenti mineralogici dei calcoli renali raccolti possono essere divisi in 4 grandi categorie:

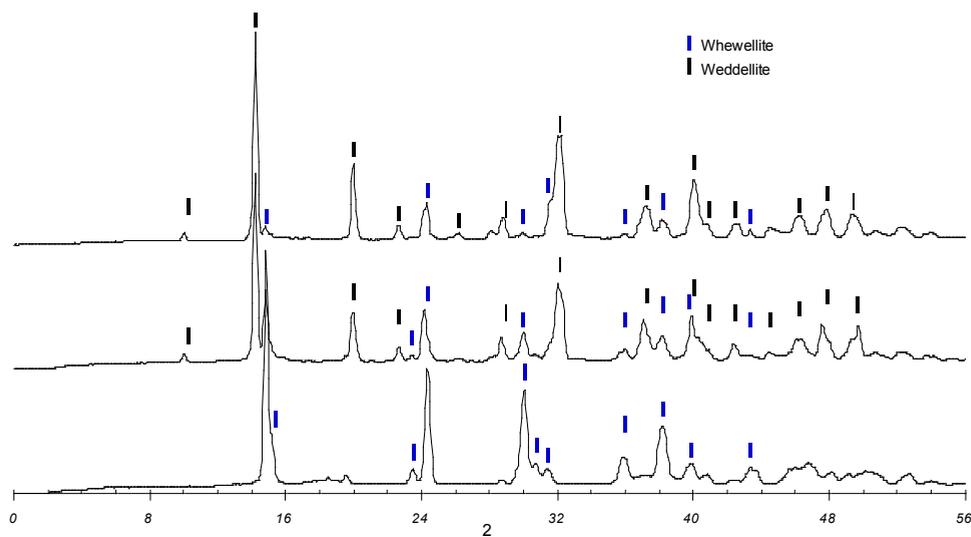
- ossalati di calcio;
- fosfati di calcio;
- acido urico;
- cistina.

L'identificazione delle diverse fasi mineralogiche è avvenuta innanzitutto sulla base delle riprese diffrattometriche abbinate, poi, alle caratteristiche macroscopiche e microscopiche. In qualche caso la conferma è avvenuta con la microanalisi al SEM.

Dopo una prima osservazione allo stereo-microscopio, ogni campione è stato polverizzato per l'esecuzione dell'analisi diffrattometrica, per intero (quanto lo si riteneva necessario) o solo in parte, facendo in modo che il frammento estratto potesse rappresentare sia un eventuale nucleo che la parte periferica del calcolo.

Le fasi investigate corrispondono a minerali quali whewellite ( $5.93\text{\AA}$ ), weddellite ( $6.18\text{\AA}$ ), acido urico ( $3.09\text{\AA}$ ), struvite ( $4.26\text{\AA}$ ), idrossapatite ( $2.81\text{\AA}$ ) e cistina ( $4.71\text{\AA}$ ).

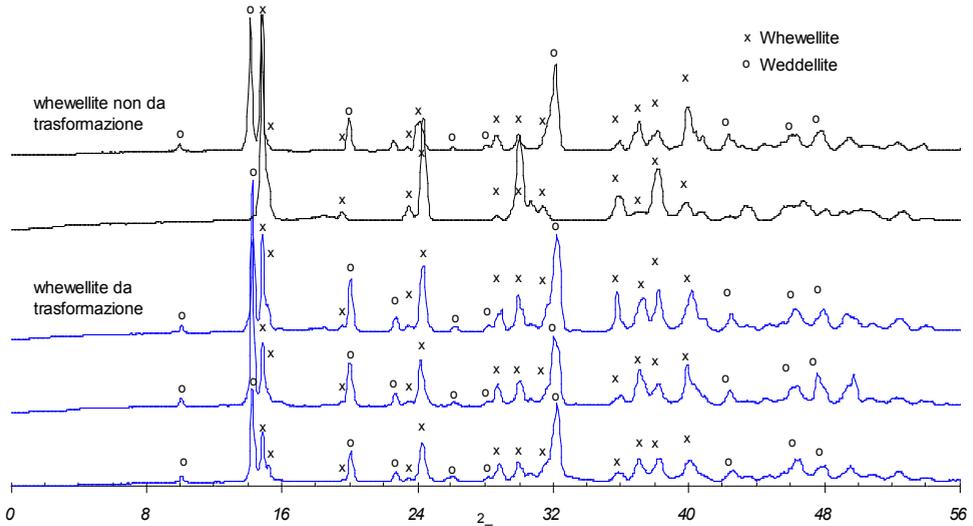
L'identificazione delle due forme di ossalato di calcio (whewellite e weddellite) è agevolata dallo spettro dei picchi diffrattometrici delle due fasi che mostrano picchi ben sviluppati. La contemporanea presenza di entrambe le forme non crea problemi nell'interpretazione qualitativa del diffrattogramma in quanto i picchi di riflessione caratteristici principali delle due forme di ossalato sono ben distinguibili su un diffrattogramma ottenuto da una buona ripresa (fig. 3.8).



**Figura 3.8** Diffrattogrammi a confronto contenenti, dal basso verso l'alto, solo whewellite, weddellite e whewellite, weddellite ed una più piccola percentuale di whewellite

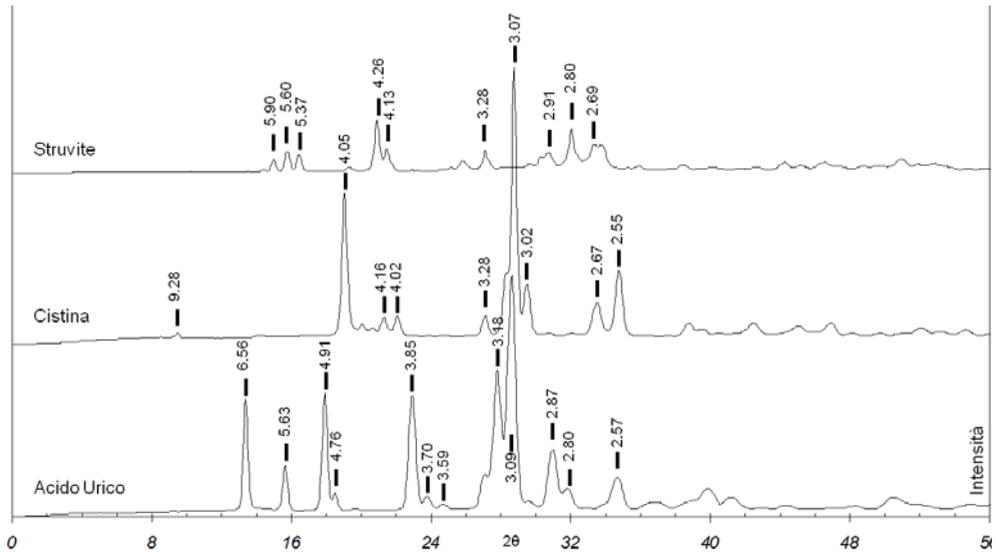
*Comparison between diffraction profiles of whewellite, weddellite plus whewellite, weddellite plus a little amount of whewellite, from the bottom the top*

Confrontando i profili diffrattometrici contenenti whewellite, non si osservano differenze pur considerando che in alcuni campioni la whewellite si presenta come piccoli cristalli isolati, negli altri deriva dalla trasformazione della weddellite (fig. 3.9).

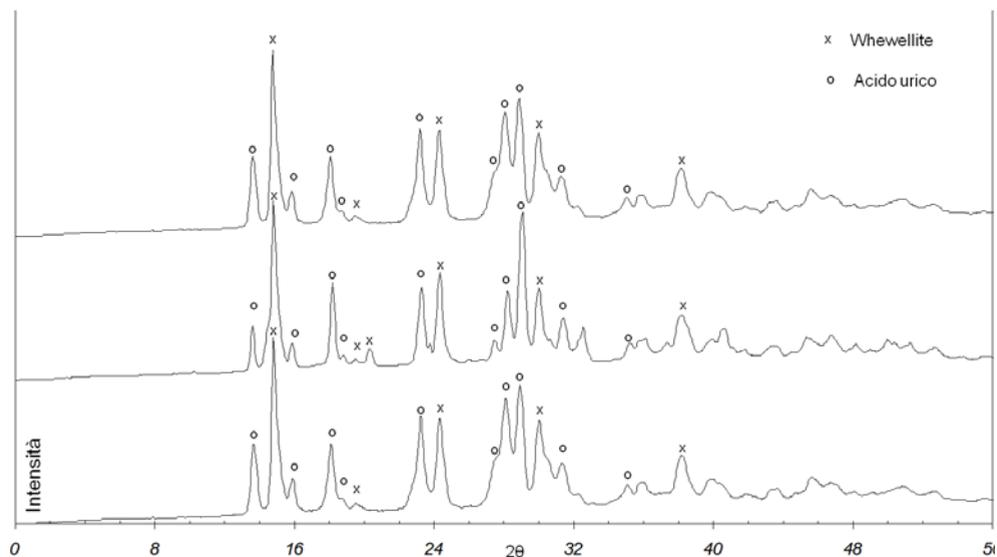


**Figura 3.9** Confronto tra whewellite da trasformazione e non sui profili diffrattometrici  
*Comparison between diffraction profiles of whewellite with and without transformation*

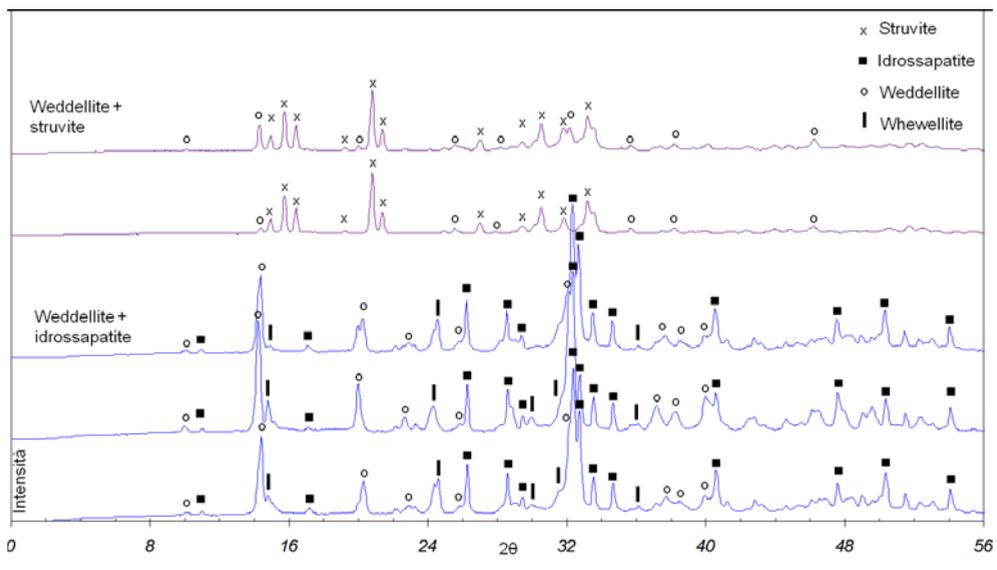
Le restanti fasi mineralogiche sono state individuate in altri profili diffrattometrici come fasi singole (fig. 3.10) o in associazione (figg. 3.11, 3.12).



**Figura 3.10** Diffattogrammi dell'acido urico, della cistina e della struvite  
*Diffraction profiles of uric acid, cystina and struvite*



**Figura 3.11** Diffrattogrammi di calcoli misti composti da acido urico e whewellite  
*Diffraction profiles of mixed kidney stones made of uric acid plus whewellite*



**Figura 3.12** Diffrattogrammi di calcoli misti composti da weddellite e idrossapatite o struvite  
*Diffraction profiles of mixed kidney stones made of weddellite plus hydroxyapatite*

A seguito della corretta identificazione delle diverse fasi mineralogiche osserviamo che il 65% dei campioni sono costituiti maggiormente da ossalato di calcio (38% dalla fase mono-idrata - whewellite; 27% dalla fase bi-idrata - weddellite). Ad eccezione di qualche campione contenente la fase pura, la maggior parte dell'ossalato di calcio si accompagna a quantità inferiori di altre fasi organiche ed inorganiche.

Il restante 35% dei calcoli renali analizzati è costituito da altre fasi quali l'acido urico (15%), idrossapatite (15%), struvite (6%) e cistina (1%) che si presentano come fasi singole. Il 32% dei campioni sono calcoli misti, costituiti cioè da una quantità comparabile di due fasi mineralogiche (es. weddellite e idrossapatite oppure whewellite ed acido urico).

La distribuzione delle fasi mineralogiche presenti nei calcoli analizzati è riportata in tabella 3.2 con l'indicazione dell'abbondanza relativa dei componenti.

La percentuale dei componenti mineralogici maggiori e minori di ogni campione analizzato è stata ricavata in modo relativo dal rapporto tra le aree del picco di riflessione a 10 osservato con quello corrispondente della fase pura (schede illustrative in appendice).

L'area del picco basale a 10 delle diverse fasi mineralogiche è stato misurato decomponendo il profilo diffrattometrico con l'ausilio del programma WINFIT [Krumm 1997] e utilizzando la funzione asimmetrica Pearson VII.

Le fasi presenti mostrano dei picchi molto ben definiti, ciò ha permesso una buona deconvoluzione dei profili diffrattometrici.

Pur considerando la possibilità di registrare degli errori percentuali nell'analisi quantitativa assoluta, una valutazione quantitativa relativa di riferimento è comunque utile al medico per calibrare una giusta terapia farmacologica e/o dietetica.

Dai risultati della diffrazione di raggi X, è stato possibile calcolare i parametri della cella elementare delle fasi mineralogiche principali a partire dalle riflessioni osservate ed indicizzate sui diffrattogrammi e con l'ausilio del programma di calcolo Unit Cell di Tom Holland & Simon Redfern [1997].

Sono state messi a confronto i parametri di cella calcolati con quelli teorici delle fasi mineralogiche riscontrate (tab. 3.3).

**Tabella 3.2 Valori medi dei parametri di cella delle fasi mineralogiche riscontrate**  
*Average values of unit cell dimension of observed mineralogical phases*

FASE	SISTEMA	GRUPPO	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)	Volume cella (Å <sup>3</sup> )	
Cistina (n.1)	esagonale	P6 1 2 2	<b>9.4</b>	<b>9.4</b>	<b>9.4</b>	<b>90.0</b>	<b>90.0</b>	<b>120.0</b>	<b>720.8</b>	
			valore medio	9.3	9.3	9.4	90.0	90.0	120.0	707.1
Whewellite (n.42)	monocino	P2 1/c	<b>6.3</b>	<b>14.6</b>	<b>10.1</b>	<b>90.0</b>	<b>109.5</b>	<b>90.0</b>	<b>874.9</b>	
			valore medio	6.3	14.6	10.0	90.0	109.8	90.0	870.7
			deviazione standard	0.1	0.1	0.2	0.0	1.1	0.0	17.0
Weddellite (n.33)	tetragonale	14/m	<b>12.4</b>	<b>12.4</b>	<b>7.4</b>	<b>90.0</b>	<b>90.0</b>	<b>90.0</b>	<b>1110.5</b>	
			valore medio	12.4	12.4	7.4	90.0	90.0	90.0	1138.9
			deviazione standard	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	22.4
Idrossapatite (n.7)	esagonale	P6 3/m	<b>9.4</b>	<b>9.4</b>	<b>6.9</b>	<b>90.0</b>	<b>90.0</b>	<b>120.0</b>	<b>528.8</b>	
			valore medio	9.4	9.4	6.9	90.0	90.0	120.0	522.1
			deviazione standard	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	4.8
Struvite (n.3)	ortorombico	P mn 2 1	<b>7.0</b>	<b>11.2</b>	<b>6.1</b>	<b>90.0</b>	<b>90.0</b>	<b>90.0</b>	<b>479.9</b>	
			valore medio	6.9	11.2	6.1	90.0	90.0	90.0	475.6
			deviazione standard	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	8.2
Acido Urico (n.19)	monocino	P2 1/n	<b>13.1</b>	<b>7.4</b>	<b>6.2</b>	<b>90.0</b>	<b>90.5</b>	<b>90.0</b>	<b>602.9</b>	
			valore medio	13.2	7.3	6.2	90.0	89.2	90.0	591.8
			deviazione standard	0.1	0.1	0.1	0.0	1.6	0.0	16.7

Dal confronto tra il valore medio calcolato e quello di riferimento, mediante l'applicazione dello Student t-test, è emerso che le differenze tra i valori, dove presenti, sono significative ad un livello pari al 95%.

Sono stati analizzati i parametri di cella di una singola fase distinguendo se questa è presente come componente unico o associato ad altri minerali.

La whewellite è un esempio; si presenta come componente puro o associato alla weddellite o all'acido urico (tab. 3.4).

I parametri di cella della stessa fase presente isolata o in associazione con altri minerali, presentano differenze minime non significative.

**Tabella 3.3 Valori medi dei parametri di cella della whewellite**  
*Average values of whewellite unit cell dimension*

FASE	SISTEMA	GRUPPO	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)	Volume cella (Å <sup>3</sup> )	
Whewellite pura (n.24)	monocino	P2 1/c	<b>6.3</b>	<b>14.6</b>	<b>10.1</b>	<b>90.0</b>	<b>109.5</b>	<b>90.0</b>	<b>874.9</b>	
			valore medio	6.3	14.6	10.0	90.0	110.0	90.0	870.6
			deviazione standard	0.2	0.1	0.2	0.0	1.3	0.0	20.2
con weddellite (n.13)			valore medio	6.3	14.6	10.1	90.0	109.5	90.0	872.5
			deviazione standard	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	8.8
con acido urico (n.5)			valore medio	6.3	14.6	10.0	90.0	109.9	90.0	866.1
			deviazione standard	0.1	0.1	0.2	0.0	1.3	0.0	18.4



Lo stesso si osserva per la weddellite.

Se confrontiamo i parametri di cella della fase pura o in associazione con la whewellite o l'idrossapatite (tab. 3.5) o dell'acido urico puro o con whewellite (tab. 3.6), non osserviamo differenze significative.

**Tabella 3.5 Valori medi dei parametri di cella della weddellite**

*Average values of weddellite unit cell dimension*

FASE	SISTEMA	GRUPPO	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)	Volume cella (Å <sup>3</sup> )	
Weddellite	tetragonale	14/m	12.4	12.4	7.4	90.0	90.0	90.0	1110.5	
			valore medio	12.4	12.4	7.4	90.0	90.0	90.0	1127.7
			deviazione standard	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	21.8
pura (n.13)			valore medio	12.4	12.4	7.5	90.0	90.0	90.0	1156.7
			deviazione standard	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	16.8
con whewellite (n.13)			valore medio	12.4	12.4	7.4	90.0	90.0	90.0	1126.9
			deviazione standard	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4

**Tabella 3.6 Valori medi dei parametri di cella dell'acido urico**

*Average values of uric acid unit cell dimension*

FASE	SISTEMA	GRUPPO	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)	Volume cella (Å <sup>3</sup> )	
Acido Urico	monodino	P2 1/n	13.1	7.4	6.2	90.0	90.5	90.0	602.9	
			valore medio	13.2	7.3	6.2	90.0	89.5	90.0	592.8
			deviazione standard	0.1	0.1	0.2	0.0	1.3	0.0	17.4
puro (n.14)			valore medio	13.2	7.3	6.1	90.0	88.5	90.0	589.0
			deviazione standard	0.2	0.1	0.1	0.0	2.1	0.0	16.3

## L'ANALISI PETRO-MORFO TESSITURALE

La sola composizione mineralogica ottenuta mediante l'analisi diffrattometrica, non risulta sufficiente per classificare adeguatamente un calcolo. A tal fine una serie di osservazioni macroscopiche e microscopiche sono state eseguite per ricavare informazioni petro-morfo tessiturali.

La possibilità di osservare alcuni calcoli renali in sezione sottile con un microscopio ottico ha consentito, inoltre, di evidenziare le proprietà ottiche delle diverse fasi mineralogiche presenti, nonché la loro posizione reciproca che determina la struttura interna del campione.

L'analisi tessiturale è il procedimento di studio che permette di ricostruire la sequenza di cristallizzazione delle varie specie minerali presenti in un campione, nella fattispecie il calcolo.

Tranne qualche raro caso di cristalli isolati (monocristalli di weddellite) anche di notevoli dimensioni, normalmente i cristalli che compongono i calcoli renali sono riuniti tra loro a costituire aggregati e associazioni.

Attraverso l'analisi in microscopia ottica ed elettronica a scansione dei campioni tal quale e delle sezioni sottili dei campioni di calcoli renali raccolti

è stato possibile individuare una serie di associazioni sia regolari che irregolari.

Nella maggior parte dei calcoli le associazioni che si ritrovano più frequentemente sono quelle irregolari o sub regolari che prendono il nome di aggregati. Questi sono costituiti da cristalli della stessa specie mineralogica, disposti secondo modalità che rispecchiano il fatto di essere cresciuti a partire da numerosi nuclei più o meno diversamente orientati.

In questi aggregati non sono presenti delle relazioni tra cristalli esprimibili con delle leggi geometriche, tanto che si preferisce illustrarli con termini descrittivi.

Molto comuni sono gli aggregati per forme tonde e raggiate apprezzabili già dall'aspetto esteriore. Questo tipo di aggregati sono stati riscontrati per calcoli composti da whewellite e qualche caso di calcolo di acido urico o un misto tra i due tipi (fig.3.13).



**Figura 3.13** Morfologia esterna di calcoli di whewellite. Struttura globulare a grappolo (#56, 25)  
*External morphology of whewellite kidney stones. Grape globular texture*

La whewellite (ossalato di calcio mono-idrato,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), rientra nella classe IX-A dei composti organici della classificazione di Strunz e classe 50.1.1

della classificazione Dana. I cristalli di whewellite si presentano di colore variabile dall'arancio scuro al marrone scuro, riconoscibili allo stereo-microscopio (fig. 3.14).

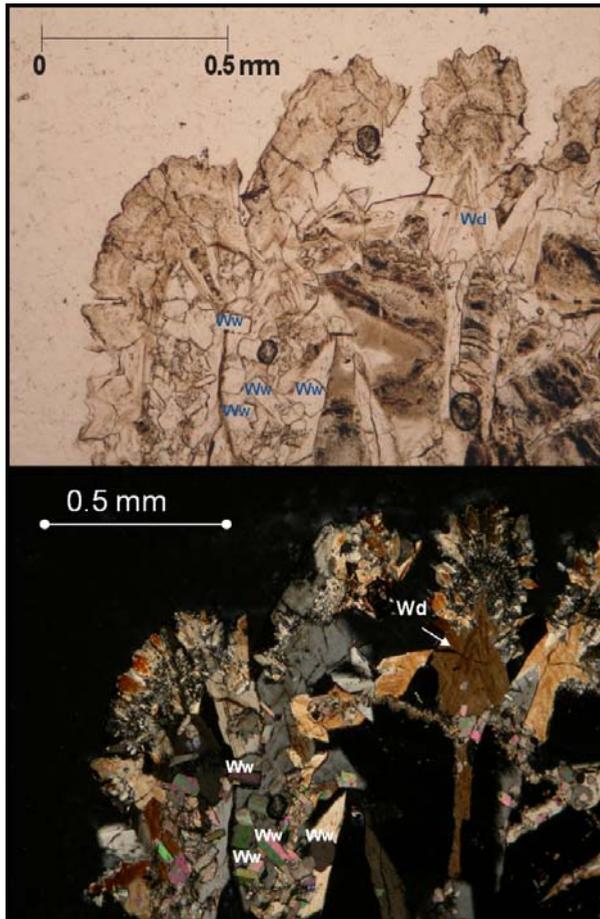
In sezione sottile si presentano trasparenti, in osservazione in luce polarizzata parallela, e debolmente colorati dal giallo al marroncino (figg. 3.15, 3.16a); non si osserva pleocroismo e presentano un rilievo basso.

La determinazione della forma di questi minerali in sezione sottile, come per tutti gli altri, è complessa perché trattasi di una osservazione bidimensionale strettamente legata al taglio ed all'orientazione del minerale nella sezione. In alcuni campioni la whewellite appare con una forma prismatica come cristalli isolati di varie dimensioni e variamente orientati (fig. 3.15). In altri campioni i cristalli si accrescono in forma colonnare compatta (figg. 3.16a, b).



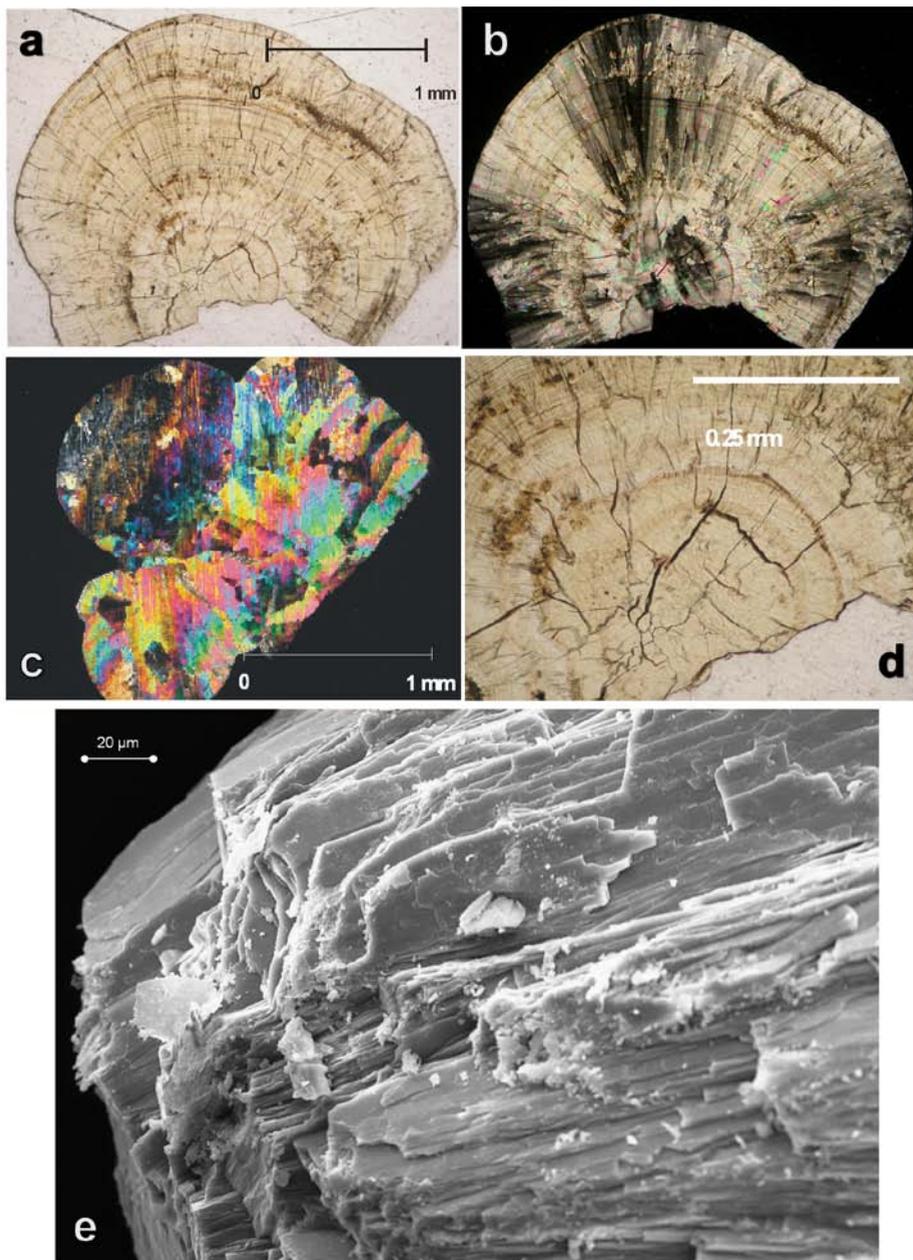
**Figura 3.14** Calcolo di whewellite allo stereo-microscopio (#54)

*Whewellite kidney stone at the stereo-microscopy*



**Figura 3.15** Cristalli prismatici di whewellite (Ww) e weddellite (Wd) in sezione sottile  
*Whewellite prismatic crystals and weddellite crystals in petrographic thin section*

In luce polarizzata incrociata, la whewellite si presenta con alti colori d'interferenza (figg. 3.16b, c).

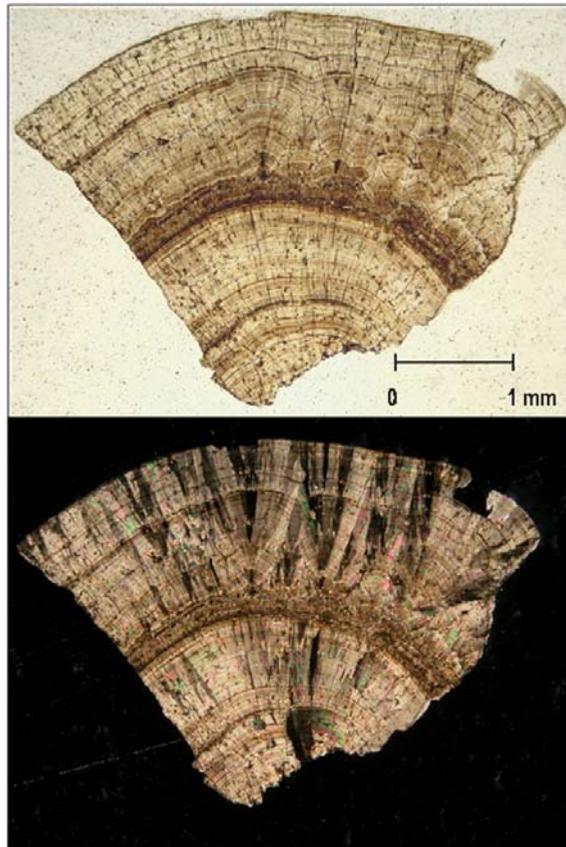


**Figura 3.16** Cristalli colonnari di whewellite: a) in luce polarizzata parallela; b-c) in luce polarizzata incrociata; d) dettaglio di frattura osservata a luce polarizzata incrociata; e) whewellite colonnare al SEM

*Columnar whewellite crystals: a) polarized light; b-c) polarized light, nicols X; d) polarized light observation of a fracture; e) columnar whewellite crystals at SEM*

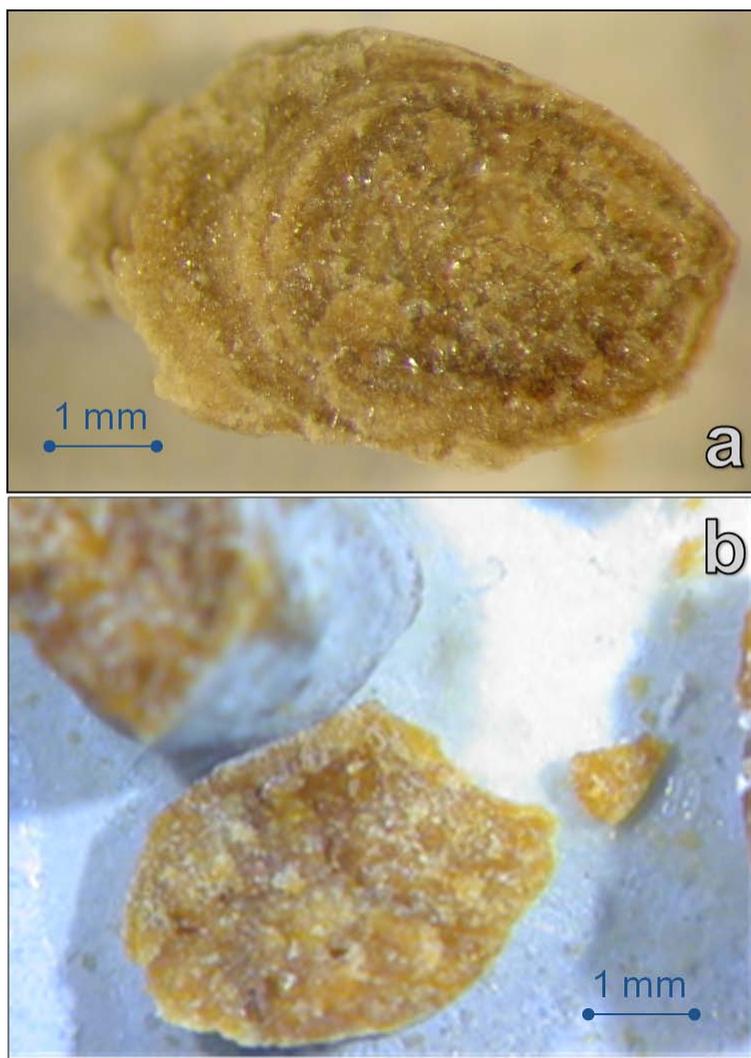
Nei calcoli composti da whewellite, i cristalli colonnari si sviluppano perfettamente orientati a formare una struttura ritmica. I micro ritmi di crescita sono distinguibili visivamente grazie alle variazioni cromatiche e corrispondono a successive aggiunte di strati di accrescimento a partire da un sottile film di nuova soluzione urinaria, su quella che risulta essere in quel momento la superficie esterna.

In sezione sottile, con una osservazione a luce polarizzata a nicols incrociati, si possono apprezzare le singole colonne di cristalli che non si estinguono contemporaneamente (fig. 3.17).



**Figura 3.17** Struttura di crescita di cristalli colonnari di whewellite (#69)  
*Texture of columnar whewellite crystals growth*

L'identificazione della whewellite è risultata alcune volte difficile dal momento che può essere confusa con i cristalli di acido urico che possono presentarsi con un aspetto ed un colore molto simile (fig. 3.18).

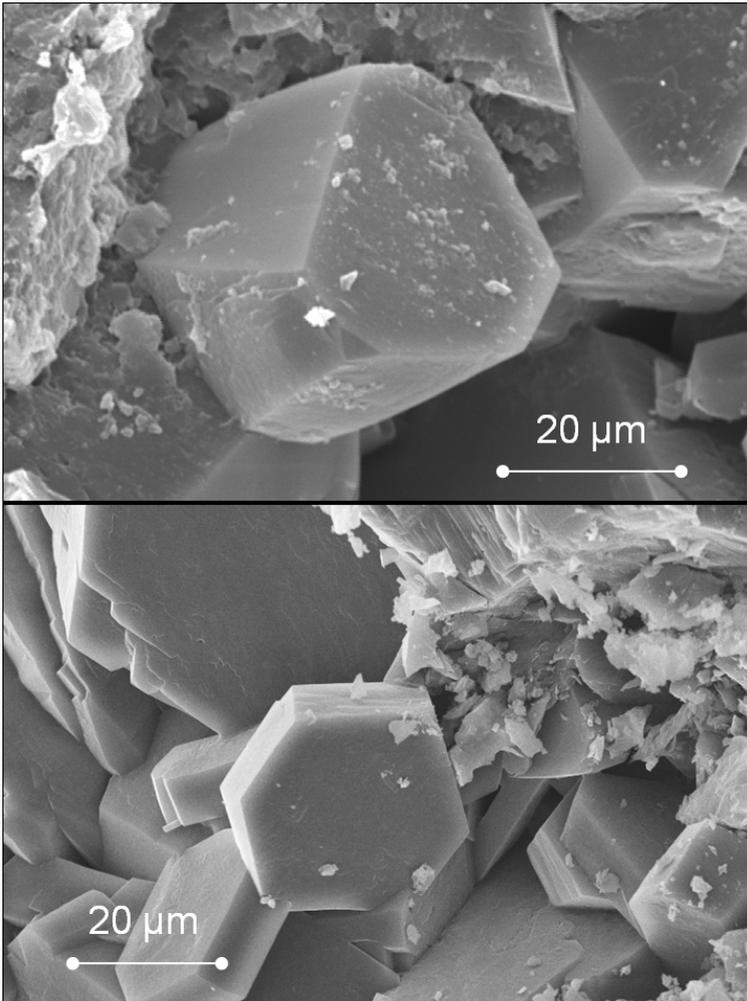


**Figura 3.18** Confronto allo stereo-microscopio di cristalli di whewellite (a) e di acido urico (b)  
*Comparison between whewellite crystals (a) and uric acid crystal (b) at stereo-microscopy observation*

L'acido urico ( $C_5H_4N_4O_3$ ) è un composto organico di carbonio, azoto, ossigeno ed idrogeno. I cristalli di acido urico rientrano nella classe IX-A dei composti organici della classificazione di Strunz e classe 50.4.4.1 della classificazione Dana.

L'acido urico cristallizza nel sistema monoclinico prismatico.

I classici cristalli di acido urico si presentano come sottili lamelle di forma rombica con i vertici più o meno erosi. Oppure possono presentarsi come lamelle esagonali aggregate (fig. 3.19).



**Figura 3.19 Cristalli di acido urico al SEM**  
*Uric acid crystals at SEM*

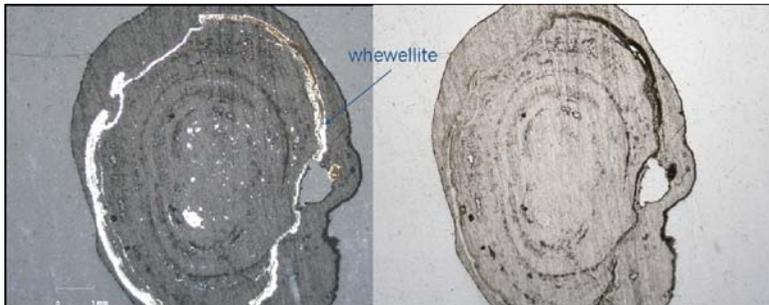
I calcoli di acido urico non presentano caratteri molto importanti osservati in sezione sottile al microscopio ottico (fig. 3.20).

Tra le diverse fasi mineralogiche presenti, ritroviamo raramente la cistina.

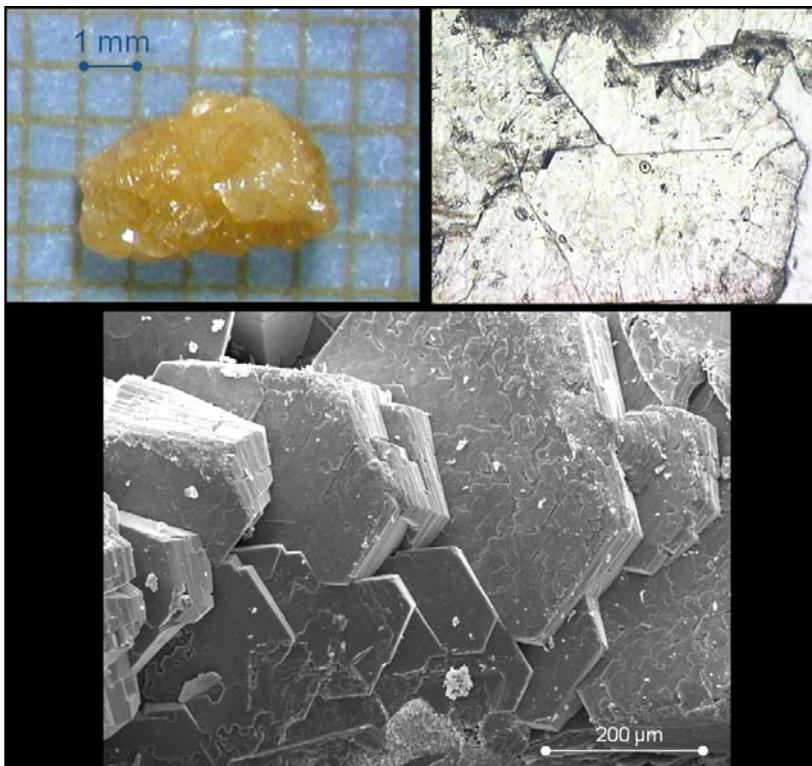
I calcoli di cistina ( $C_6H_{12}N_2O_4S_2$ ) sono facilmente riconoscibili anche ad occhio nudo per il loro aspetto tondeggiante ed il colore giallo cerato. I cristalli sono riconoscibili al SEM ed in sezione sottile per la loro forma esagonale (fig. 3.21).

Per questa tipologia di campioni si può osservare una struttura interna compatta e priva di porosità.

La forma bi-idrata dell'ossalato di calcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), il cui nome mineralogico è weddellite, cristallizza, invece, del sistema tetragonale di-piramidale ed è descritta con il gruppo spaziale I4/m.



**Figura 3.20** Calcolo di acido urico in sezione sottile con uno strato di whewellite  
*Acid uric kidney stone plus a whewellite layer in petrographic thin section*



**Figura 3.21** Calcolo di cistina allo stere-microscopio, in sezione sottile ed al SEM (#15)  
*Cystine kidney stone at stereo microscopy, at SEM and in thin section*



**Figura 3.22** Calcolo di weddellite allo stereo-microscopio (#28)

*Weddellite kidney stone at stereo-microscopy*

I cristalli di weddellite, si presentano in forma bi-piramidale, da poco a molto ben sviluppati che, non potendo accrescersi parallelamente, si accavallano. Il colore di questi cristalli varia nelle tonalità del giallo al bianco (fig. 3.22).

Alcune volte un intero calcolo è formato da un solo cristallo di weddellite. Dalla sua morfologia si comprende perché talvolta viene chiamato a “punta di lancia” (fig. 3.23).

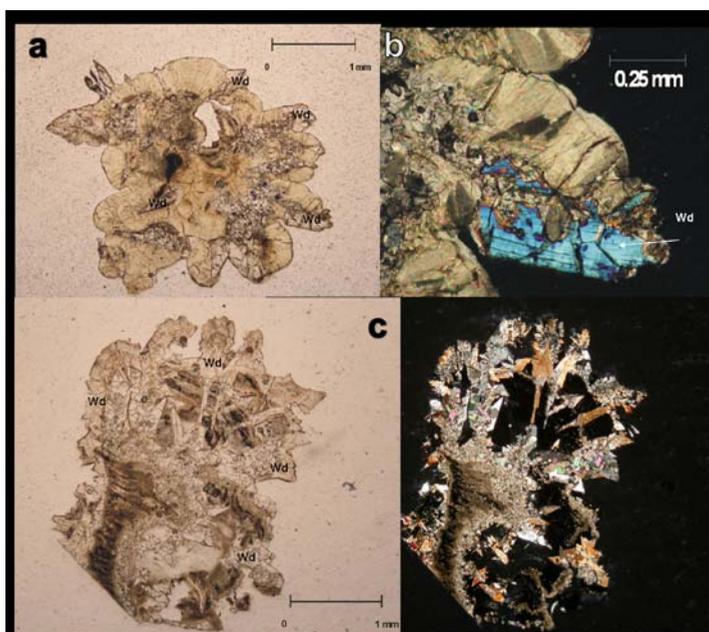


**Figura 3.23** Monocristallo di weddellite detto “a punta di lancia” (#31) allo stereo-microscopio

*Weddellite single crystal labelled “spearhead” at stereo-microscopy*

Anche in sezione sottile la weddellite è ben riconoscibile per la sua forma bipiramidale che in sezione appare rombica. I cristalli di weddellite si presentano trasparenti, in osservazione in luce polarizzata parallela, e debolmente colorati dal giallo al marroncino (figg. 3.24a, c). Non si osserva pleocroismo e presenta un rilievo basso.

I cristalli di weddellite hanno bassi colori d'interferenza (figg. 3.24b, d) e sembrano avere una zonatura (fig. 3.15).



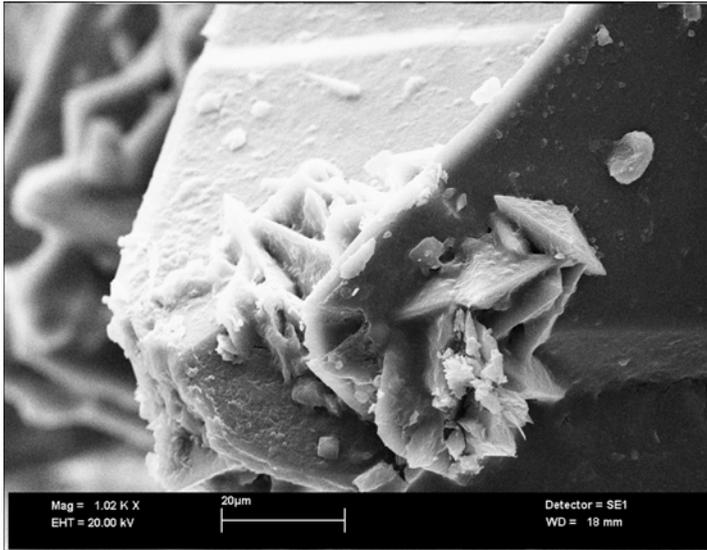
**Figura 3.24** Cristalli di weddellite (Wd) in sezione sottile: a-c) in luce polarizzata parallela; b-d) in luce polarizzata incrociata

*Weddellite crystals in thin section: a-c) polarized light; b-d) polarized light, nicols X*

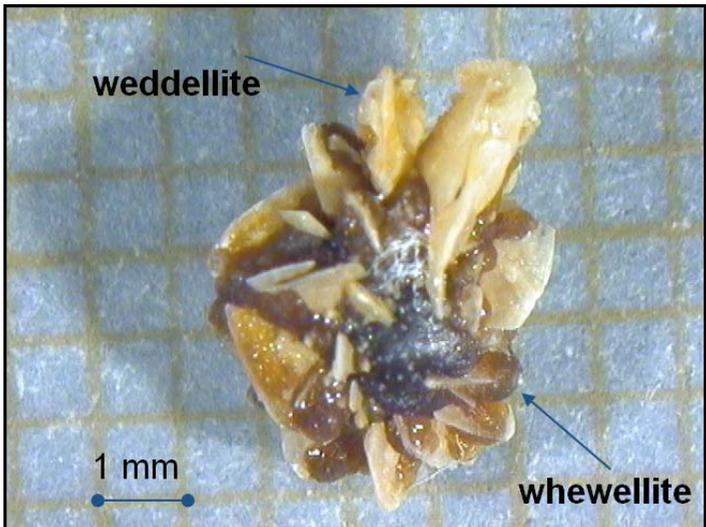
Su alcuni cristalli di weddellite di dimensioni maggiori, sono preservati e ben visibili piccoli cristalli che testimoniano diversi cicli di crescita (fig. 3.25).

La whewellite e la weddellite hanno una struttura simile, che spiega il perché della loro frequente associazione. Come detto in precedenza, la weddellite è la fase termodinamicamente instabile e cineticamente favorevole dell'ossalato di calcio; la whewellite è la fase termodinamicamente stabile [Nakai et al. 1996; Skrtic et al. 1987]. Quindi molto spesso si osserva la sostituzione per trasformazione della weddellite in whewellite.

Allo stereo-microscopio questa sostituzione è già visibile (fig. 3.26) in forma più o meno spinta.

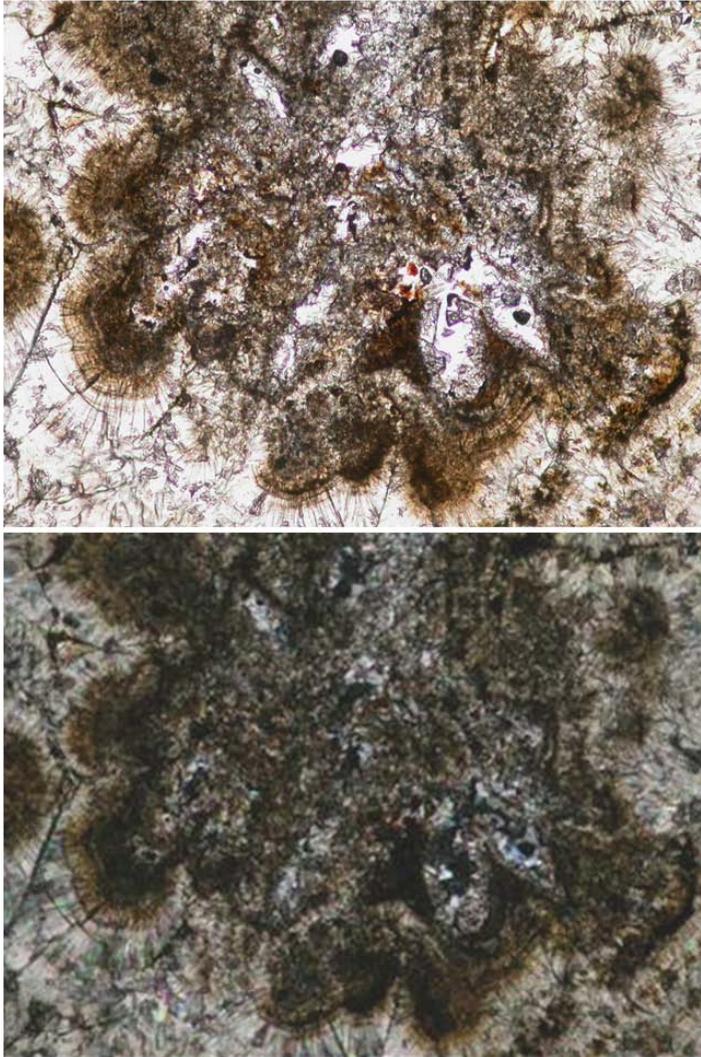


**Figura 3.25** Accrescimento di microcristalli di weddellite  
*Weddellite microcrystals growth on a bigger weddellite crystal*



**Figura 3.26** Trasformazione di weddellite in whewellite, foto allo stereo-microscopio (#72)  
*Weddellite transformation in whewellite, photo at stereo-microscopy*

Molto interessante è l'osservazione in sezione sottile di questa trasformazione. Si riconoscono bene le forme relitte dei cristalli di weddellite con taglio a rombo riempite da microcristalli di whewellite (fig. 3.27).

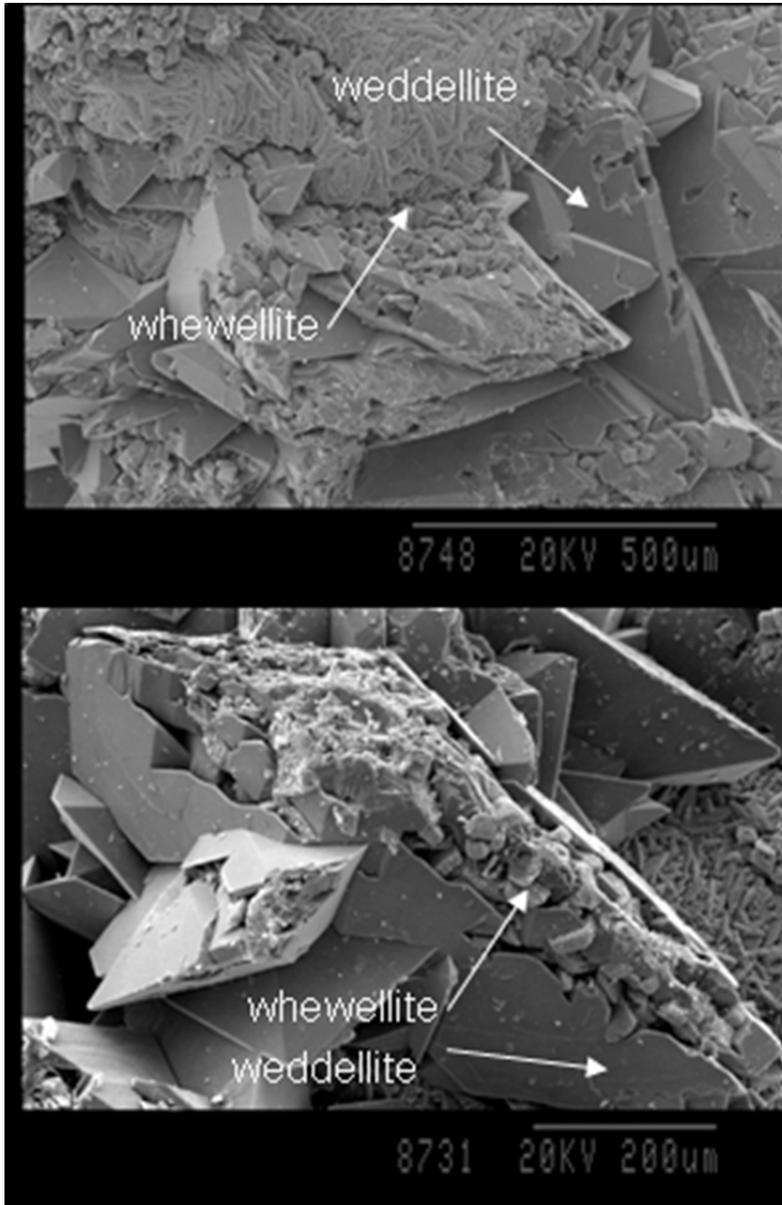


**Figura 3.27 Trasformazione di weddellite in whewellite, foto al microscopio ottico**  
*Weddellite transformation in whewellite, photo at optical microscopy*

Con l'osservazione dei campioni al SEM si apprezza come la trasformazione parte dal centro del cristallo di weddellite procedendo verso l'esterno (fig. 3.28). La superficie del cristallo di weddellite è raramente sostituita e viene conservata, probabilmente grazie al continuo contatto con la soluzione urinaria che la mantiene stabile [Gibson 1974].

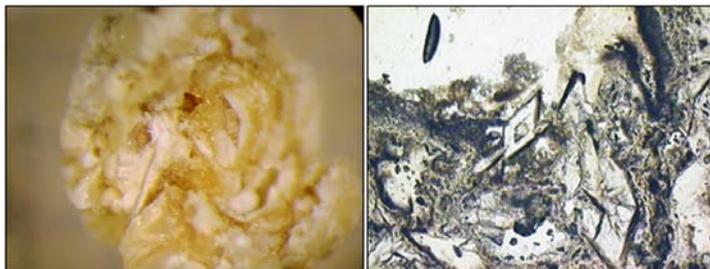
Proprio perché non molto stabile, la weddellite tende anche a disciogliersi.

Nella figura 3.28 si osserva una chiara impronta di un cristallo di weddellite oramai scomparso, ma essendo circondato da idrossapatite ne ha “registrato” la forma (fig. 3.29).



**Figura 3.28** Trasformazione di weddellite in whewellite al SEM

*Weddellite transformation in whewellite, photo at SEM*

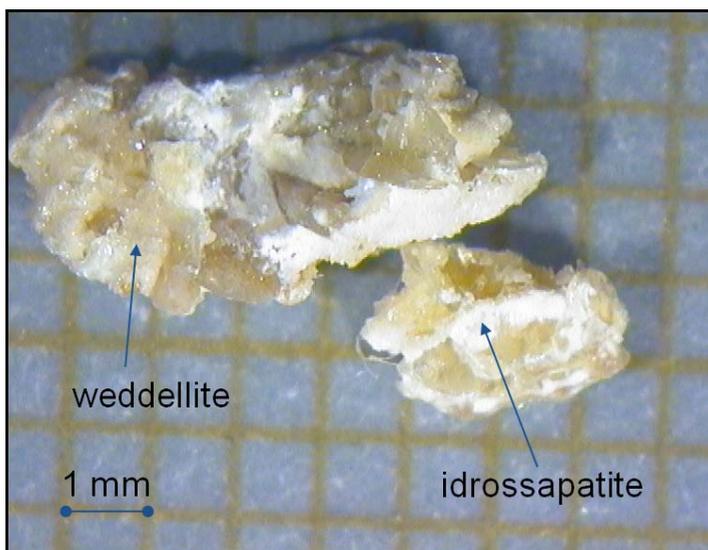


**Figura 3.29** Impronta di weddellite in cristalli di idrossapatite: allo stereo-microscopio (sx), in sezione sottile al microscopio ottico (dx) (#53)

*Phantom of weddellite in hydroxyapatite crystals: at stereo-microscopy (sx) and in thin section (dx)*

L'idrossapatite è un minerale che si distingue bene dagli altri ma non dagli stessi minerali apatitici, perché si presentano tutti di colore bianco con un aspetto simile. Una diversa morfologia è riconoscibile solo ad alti ingrandimenti.

L'idrossapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4\text{CO}_3)_6(\text{OH},\text{CO}_3)$ , per esempio, si presenta come componente sia maggiore che minore (fig. 3.30). I cristalli di idrossapatite cristallizzano nel sistema esagonale di-piramidale.

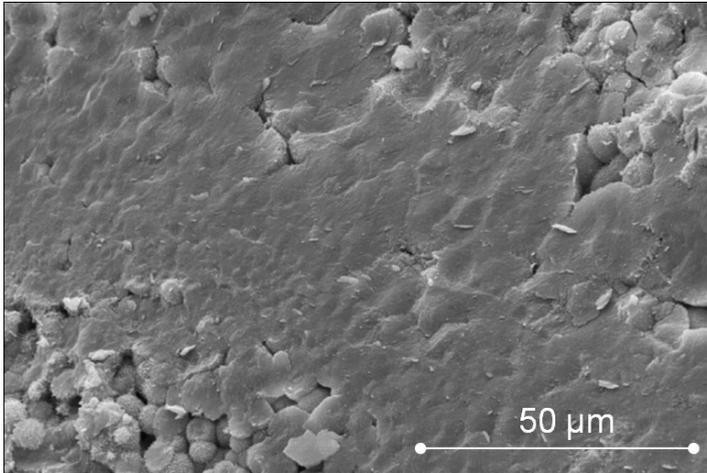


**Figura 3.30** Calcolo misto di weddellite ed idrossapatite come componente minore (#10)

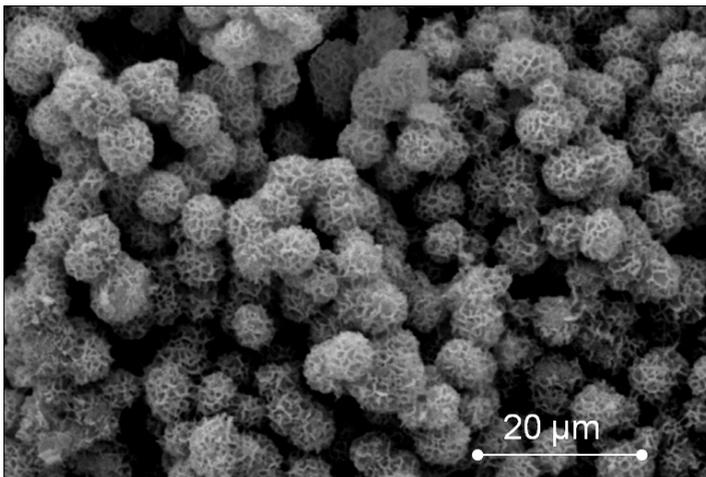
*Mixed kidney stone made of weddellite and little amount of hydroxyapatite*

I cristalli di idrossapatite possono presentarsi con un duplice abito: come una serie di strati di materiale amorfo che sono conosciuti come strati aspidinici

di idrossapatite, oppure come piccole sfere di  $0.1\ \mu\text{m}$  di diametro. Entrambe le morfologie sono riconoscibili al microscopio elettronico a scansione (fig. 3.31a, b).

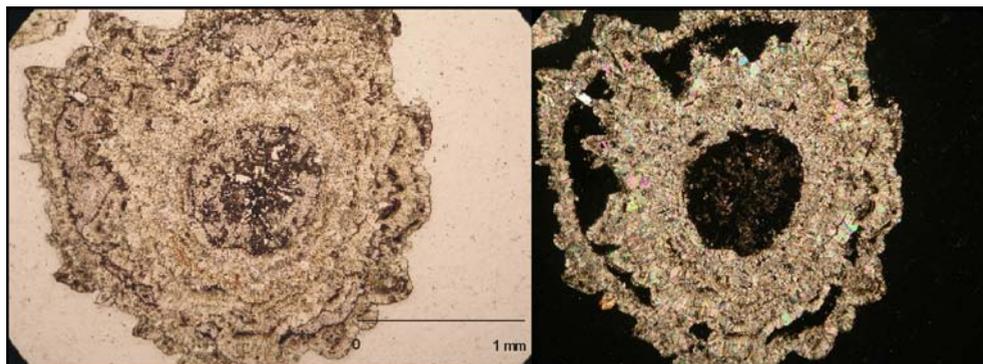


**Figura 3.31a** Cristalli di idrossapatite al SEM nella forma aspidinica  
*Hydroxyapatite crystals in aspidinic form, SEM observation*



**Figura 3.31b** Cristalli di idrossapatite al SEM come piccole sfere  
*Hydroxyapatite crystals as small spheres, SEM observation*

L'idrossapatite in sezione sottile è ben distinguibile dagli ossalati, a cui è spesso associata, per i più bassi colori d'interferenza (fig. 3.32).



**Figura 3.32** Sezione di calcolo misto al microscopio ottico a luce polarizzata parallela (sx) ed incrociata (dx) (#53)

*Thin section of mixed kidney stone, optical microscopy observation: polarized light (sx) and nicols X (dx)*

Dall'analisi strutturale si è potuto apprezzare anche la porosità dei vari tipi di calcoli.

Esiste la convinzione errata che a strutture porose corrispondano calcoli meno duri e viceversa, confondendo la durezza del singolo minerale con la durezza dei suoi aggregati.

Osserviamo il caso dei fosfati; nonostante abbiano una durezza pari a 5 sulla scala di Mohs, i calcoli sono tra i meno duri da distruggere con tecniche di litotrissia.

Non si osservano di solito macroporosità nei calcoli, ma piccoli spazi vuoti specie nei calcoli misti al contatto tra fasi mineralogiche diverse.

La forma del minerale influenza la porosità. I calcoli che contengono weddellite sono calcoli porosi, come pure quelli di struvite.

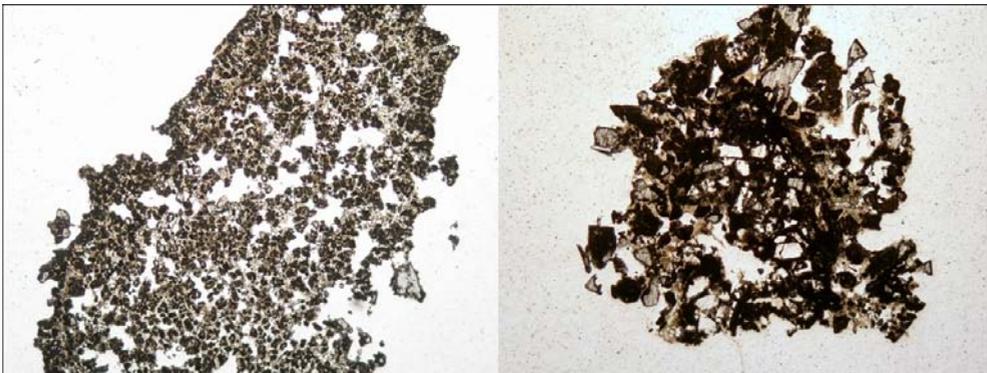
La struvite  $(\text{NH}_4)\text{Mg}(\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , un altro minerale che compone per intero alcuni calcoli analizzati, appartiene al gruppo dei fosfati e come tale risulta difficile il riconoscimento del singolo cristallo allo stereo-microscopio ottico, perché si presenta di colore bianco con un aspetto simile agli altri fosfati.



**Figura 3.33 Esempi di calcoli di struvite (#12) allo stereo-microscopio**  
*Examples of struvite kidney stones, stereo-microscopy observation*

I calcoli formati interamente da struvite, sono però riconoscibili per le grandi dimensioni che possono raggiungere e per il loro aspetto coralliforme (fig. 3.33).

L'analisi della struttura è risultata superflua per questa tipologia di calcoli i cui cristalli non sembrano seguire una qualche organizzazione strutturale ma si può apprezzare l'elevata porosità (fig. 3.34).



**Figura 3.34 Sezioni sottili di calcoli di struvite (#9, 12) al microscopio ottico**  
*Thin sections of struvite kidney stones, optical microscopy observation*

Nonostante la porosità, questi calcoli risultano tra i più pesanti raccolti (peso medio 155mg).

Uno di questi mostra la presenza dell'impronta di un corpo esterno sul quale il calcolo si è sviluppato (fig. 3.35).

Dalle informazioni reperite dal questionario epidemiologico del paziente è emerso che trattasi di una persona cateterizzata. Presumibilmente, il catetere ha svolto la funzione di nucleo per lo sviluppo del calcolo di struvite.

La presenza del catetere può testimoniare ulteriormente che un ambiente maggiormente propenso ad infezioni crea le condizioni ideali per lo sviluppo di calcoli di struvite, e che il substrato su cui può attecchire un cristallo non deve essere necessariamente minerale e/o biologico.



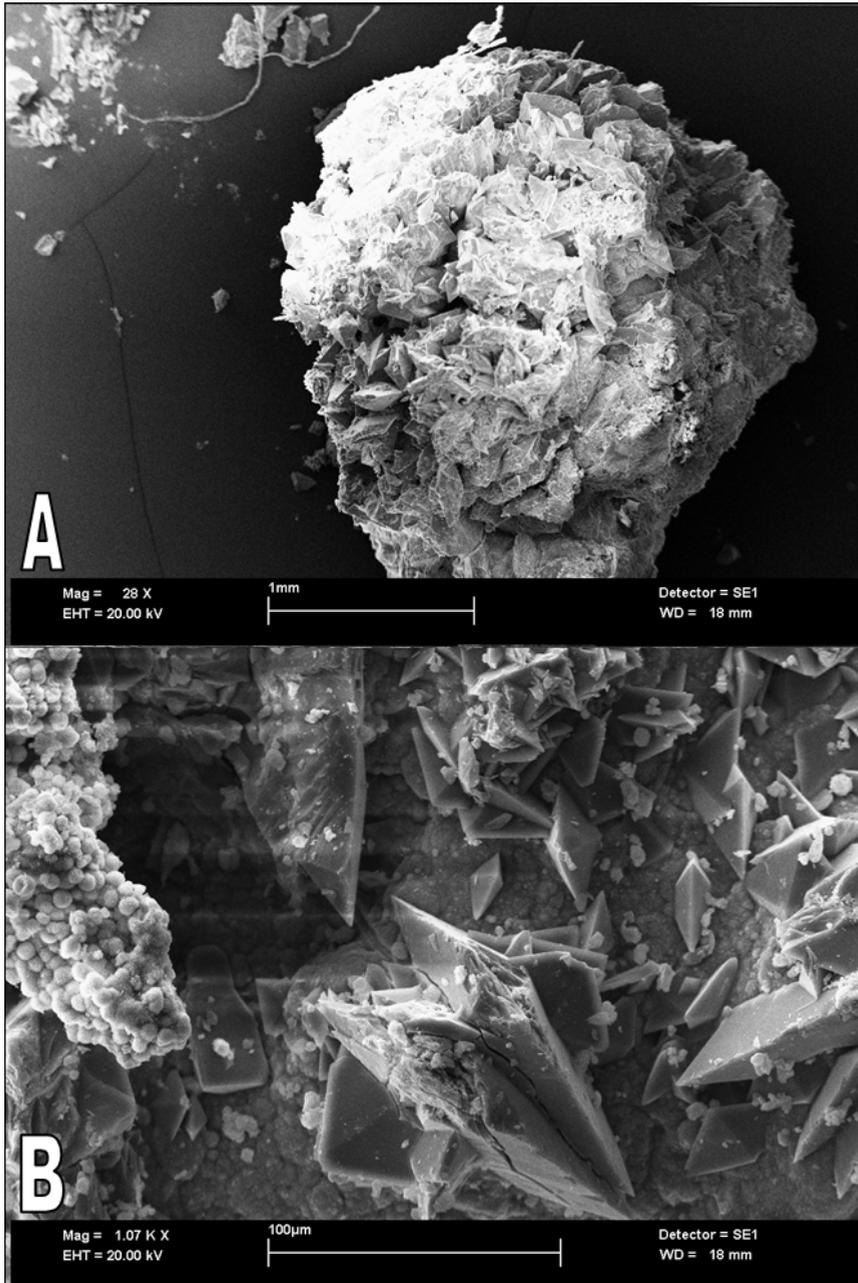
**Figura 3.35** Calcolo di struvite cresciuto intorno ad un supporto esterno (#20)

*Struvite kidney stone growth on external object*

La struttura che accomuna i calcoli composti prevalentemente da weddellite prende le sembianze di una rosa (fig. 3.36) con i grandi cristalli di weddellite e piccoli cristalli, da subedrali a euedrali, di whewellite all'interno del calcolo.

La superficie di questi calcoli è rugosa e composta da cristalli di weddellite. Si riconosce una moderata porosità spesso riempita da cristalli di idrossapatite.

Questo tipo di calcoli hanno dimensioni e peso variabili. Entrambe le misure risentono della presenza dell'idrossapatite che li rende più solidi, tanto da poter raggiungere maggiori dimensioni.



**Figura 3.36** Calcolo di weddellite al SEM: A) panoramica della superficie esterna; B) cristalli di weddellite con sfere di idrossapatite che riempiono i pori  
*Weddellite kidney stone, SEM observation: A) external surface; b) weddellite crystals and void filled by hydroxyapatite spheres*

### I NUCLEI DI ACCRESCIMENTO

Il nucleo è il primo elemento che si forma dalla soluzione urinaria, sul quale si accrescerà l'intero calcolo. In alcuni campioni il nucleo di accrescimento è ben evidente tanto da riuscire a determinare la composizione. In altri calcoli, invece, non si riesce ad identificare perché formato dalla stessa fase mineralogica dell'intero calcolo e/o perché la struttura interna, e quindi il tipo di accrescimento del calcolo, non lo consente.

Un nucleo è comunque sempre presente se lo definiamo come il primo cristallo o aggregati di cristalli che, precipitando dalla soluzione, si depositano e fungono da substrato per le successive cristallizzazioni.

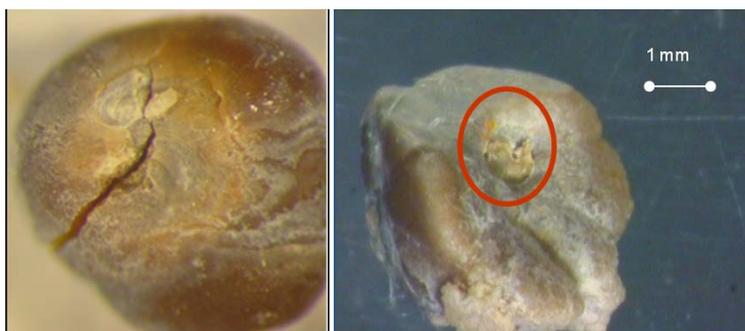
In quasi tutti i calcoli è possibile delimitare il nucleo che a volte rappresenta una porzione significativa dell'intero calcolo, mentre altre è solo un piccolo punto circondato da laminazioni concentriche.

E' possibile osservare nuclei disposti perfettamente al centro del calcolo o localizzati in una zona periferica. La corretta identificazione del nucleo consente di stabilire un ordine di deposizione dei restanti componenti omogenei o caratterizzati da strati, concentrici o radiali.

Il nucleo può avere la stessa composizione dell'intero calcolo, quindi derivare dalla sovrassaturazione dell'urina, ma può avere anche una composizione differente. Talvolta possono fungere da nucleo anche detriti microscopici presenti nell'urina, artefatti o corpi estranei. Fungono da nucleo anche le pacche di calcio che si depositano sulla papilla renale (placche di Randall).

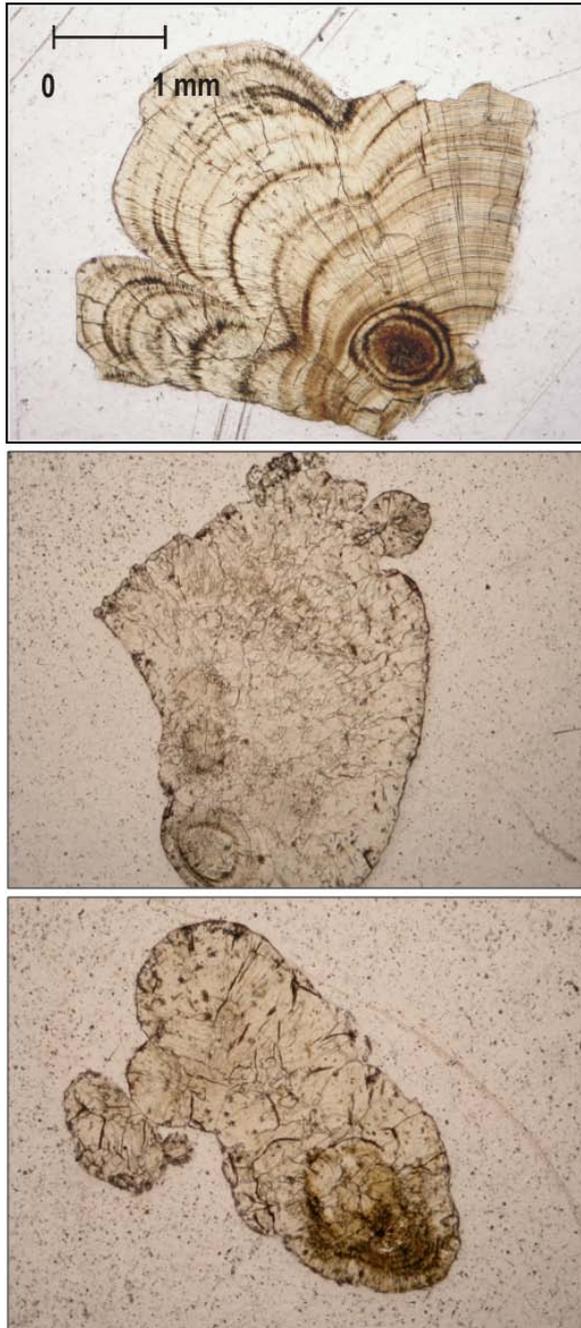
Particolare attenzione è stata rivolta, quindi, all'individuazione di un eventuale punto di contatto con la papilla renale (fig. 3.37).

Il 12% dei calcoli analizzati presenta un evidente punto di contatto papillare, confermato anche dall'analisi della struttura interna che evidenzia la presenza di un nucleo decentrato (fig. 3.38) [Giannossi et al. 2009].



**Figura 3.37** Calcoli di whewellite con evidente punto di contatto papillare (#39, 17)

*Whewellite kidney stones with a clear point of attachment of kidney papilla*



**Figura 3.38** Calcoli di whewellite in sezione sottile al microscopio ottico con evidente nucleo decentrato (#47, 56, 39)

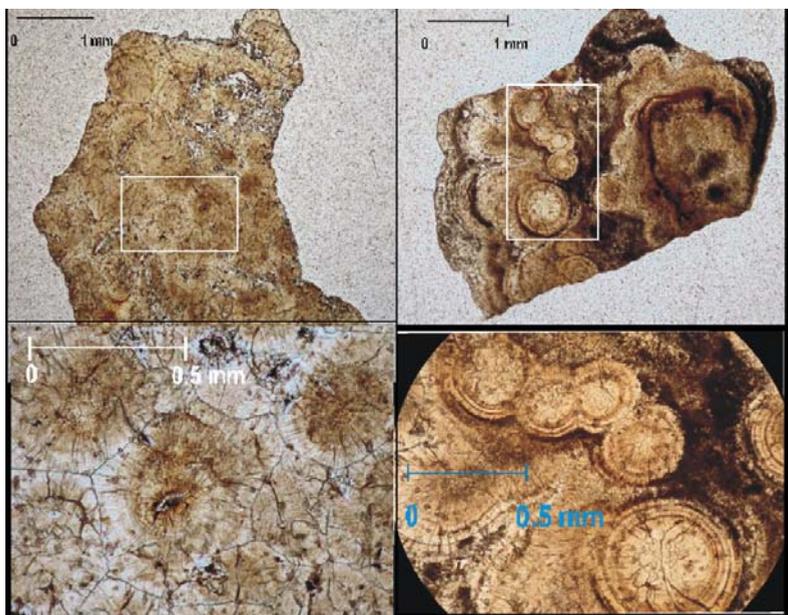
*Whewellite kidney stones in thin section with a decenterate core, optical microscopy observation*

Grazie alle osservazioni effettuate su sezioni sottili di calcoli renali è stato possibile rilevare la presenza di più nuclei.

Come si osserva, infatti, i calcoli di whewellite presentano al loro interno più nuclei di accrescimento.

Questa forma di aggregazione sferica è quella più adatta in condizioni di crescita non stazionaria (non in equilibrio), come quella di una soluzione urinaria con condizioni che prevedono un mezzo viscoso di cristallizzazione, bassa temperatura di cristallizzazione ed alto grado di sovrassaturazione che promuove un alto tasso di crescita dei cristalli, favorisce meccanismi di cattura di inclusioni e sviluppo di impurità strutturali [Sokol et al. 2005].

Queste fasi di crescita sono poi accompagnate da periodi di dissoluzione consentendo così la fusione di questi aggregati (fig. 3.39).

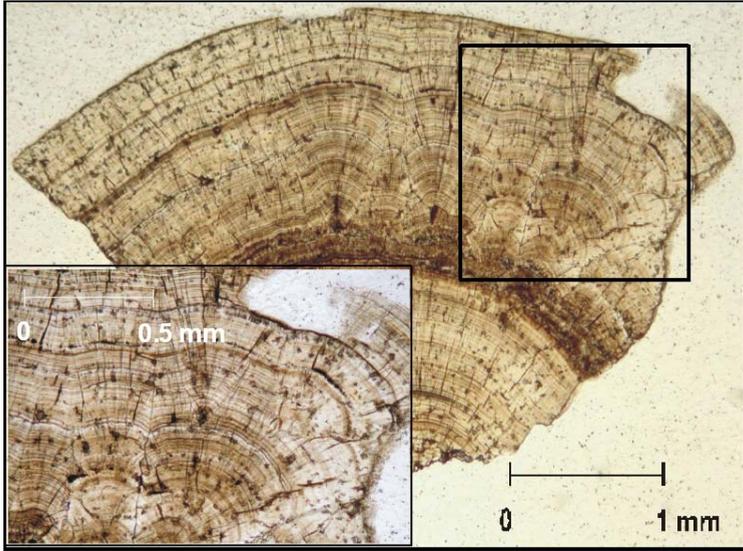


**Figura 3.39** Dettaglio di calcoli di whewellite con multi nuclei sferici (#4, 50)

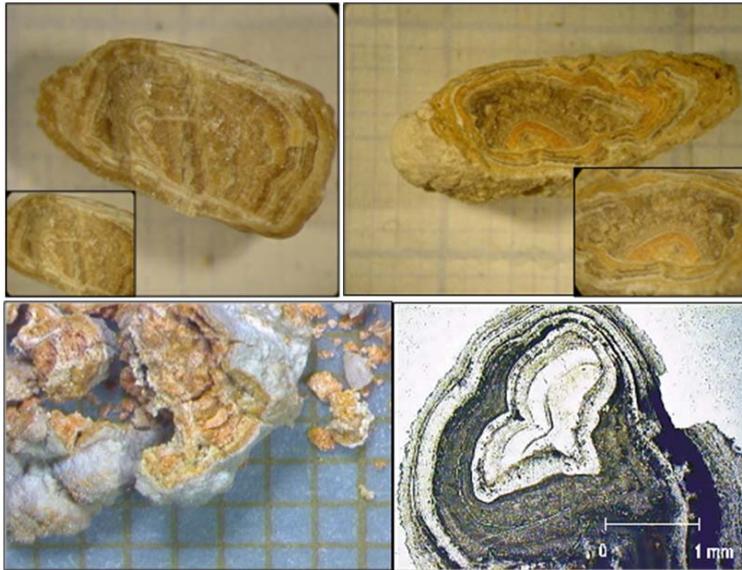
*Detail of whewellite kidney stones with multi-spherical cores*

I cristalli di whewellite colonnari sviluppati da diversi nuclei procedono autonomamente nella crescita e finiscono per ostacolarsi a vicenda (fig. 3.40).

Talvolta il nucleo di un calcolo è rappresentato da frammenti di calcoli precedenti che hanno subito un trattamento di litotrissia che però non lo ha ridotto a dimensioni tali da poterlo facilmente espellere o eliminare con un trattamento farmacologico appropriato [Costa-Bauzà et al. 2005] (fig. 3.41).



**Figura 3.40** Dettaglio di cristalli di whewellite colonnare sviluppati su nuclei differenti (#69)  
*Detail of columnar whewellite crystals growth on different cores*



**Figura 3.41** Esempi di sviluppo di calcoli su precedenti frammenti (#49, 34, 7)  
*Examples of kidney stones growth on previous fragments*

### 3.3.2 Classificazione dei calcoli renali

La struttura interna, l'aspetto esterno e le relazioni che intercorrono fra i componenti mineralogici principali e non, consentono di classificare gli 80 calcoli renali analizzati in 8 gruppi e 16 tipi differenti sulla base dello schema proposto da Grases et al. [1998].

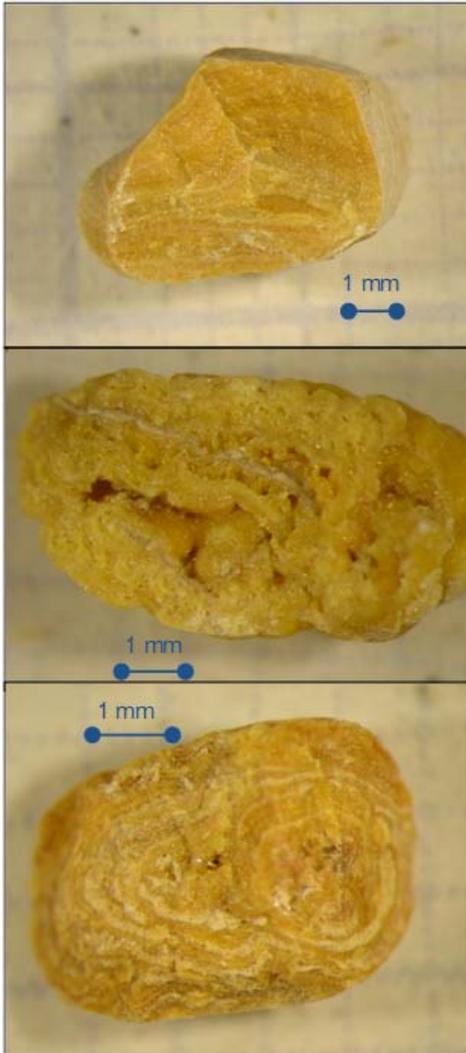
Tale schema rappresenta un tentativo di classificare i calcoli renali sulla base di questi dati correlandoli a specifiche condizioni pato-fisiologiche quali le alterazioni della composizione urinaria (es. ipercalciuria, iperossaluria).

Il lavoro di Grases et al. [1998] è servito per implementare e rendere fruibile la classificazione già proposta da Daudon et al. [1993] che risultava alquanto complessa e non molto funzionale.

**Tabella 3.7 Schema classificativo di calcoli renali sulla base di Grases et al. 1998**  
*Kidney stone classification scheme based on Grases et al. 1998*

GRUPPO	Descrizione	TIPO	Descrizione	SOTTOTIPO	Descrizione
1	Ossalato di calcio mono-idrato (whewellite) - papillare	1a	nucleo di whewellite e/o materia organica	1aI	nucleo di materia organica
				1aII	nucleo di materia organica e whewellite
		1b	nucleo di idrossapatite e/o materia organica	1bI	nucleo di idrossapatite
				1bII	nucleo di idrossapatite e materia organica
2	Ossalato di calcio mono-idrato (whewellite) - di cavità	2a	nucleo di whewellite e materia organica		
		2b	nucleo di idrossapatite e materia organica		
		2c	nucleo urico		
3	Ossalato di calcio bi-idrato (weddellite)	3a	solo weddellite	3aI	senza trasformazione
				3aII	con trasformazione
		3b	idrossapatite in piccole quantità	3bI	nucleo di idrossapatite
				3bII	idrossapatite tra i cristalli
				3bIII	idrossapatite e materia organica
3c	papillare				
4	Weddellite + idrossapatite			4I	stratificato
				4II	disordinato
5	Idrossapatite	5a	solo idrossapatite		
		5b	weddellite in minore quantità		
6	Struvite				
7	Bruscite				
8	Acido Urico	8a	solo acido urico	8aI	compatto
				8aII	stratificato
				8aIII	disordinato
		8b	acido urico + acido urico deidratato	8bI	stratificato
8bII	disordinato				
8c	urati				
9	Whewellite + acido urico			9I	papillare
				9II	non papillare
10	Cistina				
11	Vari - poco frequenti	11a	materia organica e/o necrosi papillare		
		11b	farmacologico		
		11c	artefatto (semi...)		

I campioni attribuibili ad un preciso gruppo, senza margine di errore, sono quelli composti interamente da cistina (#15) e da struvite (#9, 12, 20), attribuibili al gruppo 10 e 6, rispettivamente. La sola determinazione della composizione



**Figura 3.42 Calcoli di acido urico con diversa struttura interna (#55, 29, 60)**  
*Uric acid kidney stone with different structure*

mineralogica ha consentito questa attribuzione. Non si riscontrano delle strutture particolari al loro interno tali da rendere necessaria la creazione di tipologie diverse.

Per quel che riguarda i calcoli composti interamente da acido urico sono stati attribuiti al gruppo 8, tipologia 8a in quanto non sono stati riscontrati calcoli contenenti acido urico de-idratato (tipo 8b) ed urati (tipo 8c).

Per l'assegnazione alle diverse tipologie possibili è necessario far riferimento alla struttura interna osservata (fig. 3.42).

Pertanto 9 calcoli di acido urico sono attribuiti al sottotipo 8aI corrispondente a calcoli composti interamente da acido urico ma con struttura interna compatta, altri 4 calcoli sono attribuibili al sottotipo 8aII per una struttura interna a strati e solo uno corrisponde alla descrizione di un calcolo di acido urico di tipo 8aIII a causa della sua struttura interna disordinata.

La classificazione dei campioni contenenti le diverse forme dell'ossalato di calcio è più complessa perché necessita della fusione di più informazioni derivanti dalla composizione mineralogica e dalle osservazioni macroscopiche e microscopiche della struttura interna ed esterna dei calcoli.

I 33 campioni che contengono, in diversa quantità, la weddellite possono essere variamente classificati.



**Figura 3.43 Calcoli di weddellite pura  
afferenti al sottotipo 3aI (#5, 28)**

*Pure weddellite kidney  
stones included in subtype 3aI*

Escludendo la presenza di altre fasi mineralogiche 5 di loro possono essere classificati come calcoli di weddellite pura (tipo 3a), senza trasformazione (sottotipo 3aI) (fig. 3.43), dove per trasformazione si intende il polimorfismo tra weddellite e whewellite.

Ci sono, infatti, campioni che sono composti oltre che da weddellite anche da whewellite in quantità variabile (2-95%), come emerge dai profili diffrattometrici.

Dall'analisi dei campioni al SEM è emerso che la whewellite in questione deriva dalla trasformazione della weddellite, quindi ci troviamo di fronte a calcoli del sottotipo 3aII: weddellite pura con trasformazione. Rientrano in questo sottotipo ben 13 calcoli renali analizzati, con grado di trasformazione variabile da leggera a molto spinta tanto che la quantità di whewellite riscontrata è di molto

superiore a quella della weddellite (#43).

A causa della morfologia dei cristalli di weddellite è molto raro ritrovare calcoli di weddellite che si accrescono attaccati alla papilla renale. Nei campioni analizzati non sono stati riscontrati casi del genere (tipo 3c).

In ben 15 campioni è stata rilevata la presenza di un fosfato di calcio che, dalla diffrazione, emerge essere in alcuni casi idrossapatite ed in altri struvite. La quantità rilevata è molto variabile, da tracce a percentuali superiori al 50%. Nel primo caso è possibile ritrovare l'idrossapatite o la struvite tra i cristalli di weddellite (fig. 3.44).

Tra 8 campioni che presentano questa situazione, 5 sono classificati come calcoli del tipo 3b, sottotipo 3bII, cioè calcoli di weddellite ma con la presenza tra i cristalli di piccole quantità di idrossapatite, ma i restanti 3 non trovano riscontro in alcun sottotipo della classificazione proposta da Grases et al. [1998].

Non sono stati rilevati casi di calcoli di weddellite che presentassero una



**Figura 3.44** Calcolo di weddellite con piccole quantità di struvite (#71)

*Weddellite kidney stone with little amount of struvite*



**Figura 3.45** Calcolo misto di weddellite e struvite (#59)

*Mixed kidney stone made of weddellite and struvite*

quantità di idrossapatite tale da formare il nucleo del calcolo (sottotipo 3bI), né tanto meno idrossapatite in associazione con materia organica (sottotipo 3bIII).

Se si riscontra, invece, la presenza di fosfati in quantità comparabile a quella della weddellite, si è in presenza di un calcolo misto, classificato come gruppo a se stante, tipo 4 se trattasi di idrossapatite. Nella classificazione non è contemplata la presenza di un calcolo misto weddellite/struvite (fig. 3.45).

L'assegnazione dei 5 calcoli alle due tipologie del gruppo 4, necessita lo studio della struttura interna del campione.

Di questi, ben 2 rientrano nel sottotipo 4I: calcoli misti di weddellite ed idrossapatite con struttura a strati, dal momento che è ben visibile un'alternanza di strati di weddellite ed idrossapatite. Dai dati diffrattometrici risulta anche una piccola percentuale di whewellite.

Gli altri calcoli del gruppo 4, presentano una quantità comparabile di weddellite ed idrossapatite, ma il calcolo al suo interno risulta totalmente disorganizzato. Pertanto questi campioni rientrano nel sottotipo 4II (fig. 3.46). Anche in questo caso sono state riscontrate delle piccole percentuali di whewellite derivante dalla trasformazione della weddellite.



**Figura 3.46** Calcoli misti weddellite ed idrossapatite del sottotipo 4II (#10, 35, 45)

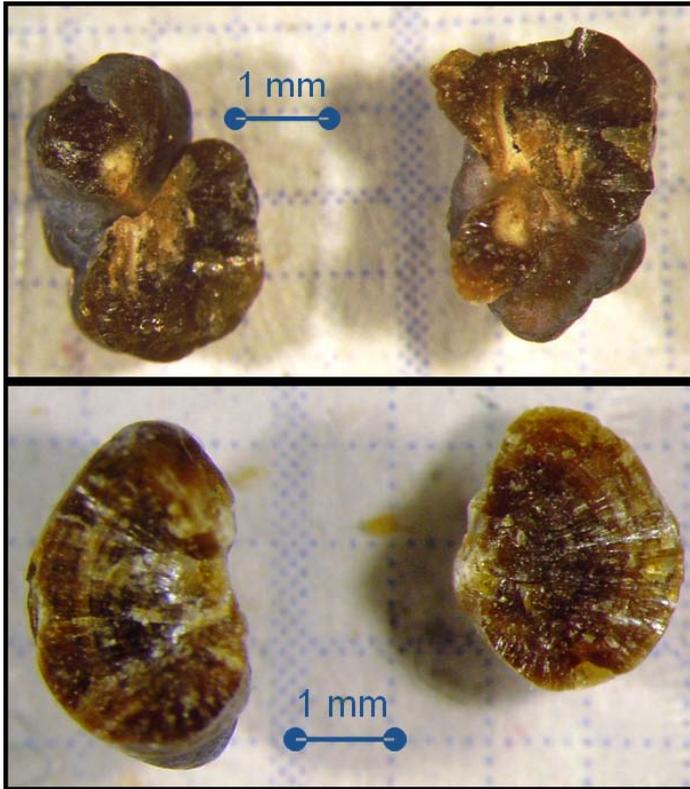
*Mixed kidney stones made of weddellite and hydroxyapatite of subtype 4II*

Altri 24 campioni contengono una considerevole quantità di whewellite che ne costituisce, quindi, il componente principale. Ciò che differenzia i diversi campioni non è quindi la composizione mineralogica quanto la struttura. Infatti, già la sola forma esterna mi consente di differenziare i calcoli del gruppo 1 da quelli del gruppo 2.

Avendo riscontrato in 9 calcoli composti da whewellite un evidente punto di contatto papillare, un nucleo decentrato (ben visibile in sezione sottile) e localizzato proprio in corrispondenza di una concavità esterna del calcolo, è possibile considerare questi campioni appartenenti al gruppo 1: calcoli di whewellite di tipo papillare (fig. 3.47).

Tra questi è possibile fare un'ulteriore differenziazione. Dal momento che è stato possibile identificare la composizione del nucleo, in tutti e 9 i campioni non sono stati riscontrate tracce di idrossapatite ma il nucleo, anche se di piccole dimensioni, risulta prevalentemente formato da materia organica, quindi tutti i calcoli rientrano nel tipo 1a, escludendo la presenza di calcoli del tipo 1b: calcoli di whewellite con nucleo di idrossapatite e materia organica.

Tra questi 9 campioni, dal momento che nel nucleo sono stati identificati anche cristalli di whewellite è possibile assegnare sette di questi al sottotipo 1aII.



**Figura 3.47** Calcoli appartenenti al tipo 1a (#25 – sottotipo 1aII; #54 – sottotipo 1aI)  
*Kidney stones included in type 1a*

I restanti 15 campioni, contenenti prevalentemente whewellite, non presentando nessun evidente punto di contatto papillare e mostrando un nucleo centrale ed una morfologia sub-sferica, possono essere classificati nel gruppo 2 come calcoli di whewellite che si formano in cavità renali. Tra questi 15 campioni, dopo la corretta identificazione della composizione del nucleo vengono assegnati a due tipologie differenti: 8 di loro al tipo 2a aventi il nucleo composto da whewellite e materia organica; gli altri 7 al tipo 2b con nucleo di whewellite ed idrossapatite.

Negli ultimi 5 campioni da classificare, la percentuale di whewellite è comparabile a quella di acido urico (circa 50%). Questi calcoli sono classificati nel gruppo 9 come calcoli misti di cui uno di tipo papillare dal momento che si riconosce un punto di contatto ed un nucleo decentrato (tipo 9I), gli altri 4 afferiscono al tipo 9II non papillari.

Non sono stati riscontrati calcoli afferenti al gruppo 11: calcoli poco frequenti.

### 3.3.3 Relazione tra la classificazione morfo-composizionale ed i fattori etiologici dei calcoli renali

Nell'attività di ricerca non è stato previsto il dosaggio delle urine dei pazienti/donatori dei calcoli renali acquisiti, soprattutto perché la raccolta delle urine su 24 ore (comunemente usata per l'analisi chimica) anche se è utile per determinare quale trattamento dietetico e/o farmacologico assegnare al paziente [Chai et al. 2004; Stitchantrakul et al. 2004; Williams et al. 2001] presenta il limite di essere una fotografia della composizione chimica dell'urina in quel momento.

Considerato l'elevata variabilità della composizione dell'urina, questa non è assimilabile a quella passata, cioè nel momento della formazione del calcolo. E' perciò inutile questa procedura se l'obiettivo è determinare l'etiologia chimica e la struttura dei calcoli renali prodotti.

La *stone analysis* rimane, quindi, l'unica procedura per studiare a pieno la nefrolitiasi.

Nell'analisi dei calcoli sono state riscontrate una serie di depositi superficiali che testimoniano il cambiamento della composizione urinaria, specie se i depositi superficiali risultano essere composti da minerali differenti rispetto all'intero calcolo.

I calcoli composti interamente da struvite sono legati ad infezioni urinarie. Se non trattata opportunamente con antibiotici [Rieu 2005] l'infezione permane e si espone il paziente a recidive, come è successo nel caso in esame.

I calcoli di struvite sono stati espulsi esclusivamente da donne (con età >55 anni), che sono storicamente più soggette a questa tipologia di calcolo. Lo sviluppo di questo tipo di calcolo è legato ad un pH urinario >7.0 che può essere causato tra l'altro da una dieta vegetariana, come riscontrato dai casi analizzati ed ad un consumo di acque oligominerali con pH >7.0. Non si riscontrano casi di familiarità tra i soggetti coinvolti.

L'unico calcolo di cistina ritrovato appartiene ad una donna di 47 anni. La maggiore causa di sviluppo di questi calcoli è legato all'iperclistinuria che può avere caratteri genetici, come per il caso in questione che evidenzia un'ereditarietà della patologia. Anche la dieta seguita dal soggetto con un eccesso di carne e uova (alimenti ricchi in cistina) ha avuto il suo ruolo nella formazione di questo tipo di calcolo.

L'abbondanza di calcoli di acido urico è ristretta ai pazienti di sesso maschile (86% dei casi). Il più importante fattore di rischio per la cristallizzazione di acido urico è la presenza di un ambiente fortemente acido (pH < 5.5), nel quale i cristalli di acido urico non si disciolgono [Ferrari & Bonny 2004].

Questa situazione associata a una iperuricosuria è legata alle abitudini alimentari ed alla tipologia di acque ingerite. Un eccesso di assunzione di proteine

animali [Anderson 1972; Drach 1978; Robertson & Peacock 1982; Park et al. 1994] è stata riscontrata nei pazienti, con evidente eccesso di peso corporeo come pure un consumo costante di alcool [Schlesinger 2005].

La scarsità di assunzione di bevande gassate ma soprattutto l'utilizzo di acque debolmente bicarbonatiche (imbottigliate o meno) non ha favorito nei soggetti l'alcalinizzazione delle urine per consentire lo scioglimento dei cristalli di acido urico che sono la tipologia di calcoli più facili da prevenire e da curare perché, come si è visto, sono facilmente solubilizzabili in vivo.

Per i calcoli di ossalato di calcio, l'attenzione è stata posta sulle potenziali fonti di ossalati. Una parte di questi vengono prodotti direttamente dall'organismo e la quantità prodotta è direttamente proporzionale al peso corporeo [Massey 2003]. Tra le persone affette da calcoli di ossalato di calcio, si registra in media un eccesso di massa corporea specie nei casi di calcoli di whewellite formati in cavità renali.

Nessuna relazione è stata, invece, riscontrata circa la maggiore assunzione di cibi contenenti ossalati (es. spinaci e bietole), che non vengono consumati con frequenza, ma è pur vero che il numero di vegetali contenenti ossalato è molto ampio quindi questo risultato potrebbe dipendere da una carenza informativa del questionario. Una diretta relazione tra dieta ricca in ossalati e iperossaluria urinaria è ben nota [De Mendonca et al. 2003; Brinkley et al. 1990; Holmes et al. 2000, 2001].

Le minori quantità di ossalato ingerito potrebbero però essere compensate da una ridotta assunzione di calcio tra i soggetti coinvolti, confermando l'ipotesi di alcuni autori circa l'antagonismo tra calcio ed ossalati. La secrezione urinaria di questi ultimi aumenterebbe solo quando il calcio è in minore quantità [Marshall et al. 1972; Hess 1996; Breslau et al. 1988].

Un maggior consumo di acque oligominerali sembra essere associato a calcoli di ossalato con percentuali di fosfati favoriti da un aumento del pH.

Per tutti i casi riscontrati si registra un basso consumo di liquidi, non raggiungendo i 2L consigliati, per assicurarsi un elevato volume urinario [Goldfarb 1988, 1990].

### 3.3.4 Prevalenza e distribuzione geografica dei calcoli renali

A seguito della classificazione degli 80 campioni analizzati, è stata determinata la percentuale di prevalenza dei vari gruppi, tipi e sottotipi di calcoli di pazienti lucani.

**Tabella 3.8 Distribuzione percentuale dei calcoli analizzati in Basilicata**  
*Kidney stones percentage distribution analyzed in Basilicata*

GRUPPO	Percentuale	TIPO	Percentuale	SOTTOTIPO	Percentuale	% TOTALE
1	11%	1a	11%	1aI	3%	Ossalato di calcio 59%
				1aII	9%	
		1b	0%	1bI	0%	
				1bII	0%	
2	19%	2a	10%			
		2b	9%			
		2c	0%			
3	29%	3a	23%	3aI	7%	
				3aII	16%	
		3b	6%	3bI	0%	
				3bII	6%	
		3c	0%	3bIII	0%	
4	6%			4I	3%	Misto weddellite + idrossapatite 6%
				4II	3%	
5	0%	5a	0%			Fosfati di calcio 4%
		5b	0%			
6	4%					
7	0%					
8	18%	8a	18%	8aI	11%	Acido urico 18%
				8aII	6%	
				8aIII	1%	
		8b	0%	8bI	0%	
				8bII	0%	
8c	0%					
9	6%			9I	1%	Misto whewellite + acido urico 6%
				9II	5%	
10	1%					Cistina 1%
11	0%	11a	0%			Poco frequenti 0%
		11b	0%			
		11c	0%			

In base a questi risultati osserviamo che i calcoli più diffusi tra la popolazione della Basilicata sono quelli che hanno una componente prevalente di ossalato di calcio (59%). Tra questi i più diffusi sono quelli composti da weddellite (29%) formata in cavità renali. Importante anche la presenza di una percentuale elevata (11%) di calcoli di whewellite accresciuti attaccati alle pareti renali.

Le associazioni mineralogiche composte da weddellite ed idrossapatite e whewellite ed acido urico hanno una uguale percentuale di prevalenza (6%). Non sono stati inclusi in questa classificazione i 5 calcoli con associazione weddellite e struvite, non essendo presente una categoria idonea a contenerli. Rappresentano il 6% dei calcoli totali analizzati.

Questo nuovo gruppo di calcoli saranno denominati d'ora in avanti: gruppo 4\*.

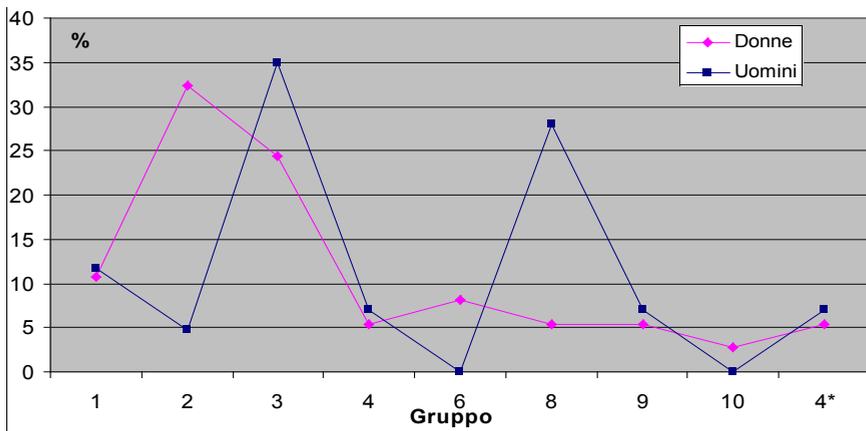
I nuclei dei calcoli composti in prevalenza di ossalato mostrano una abbondanza di materia organica. La weddellite si presenta più frequentemente trasformata in whewellite.

Sono molto diffusi anche i calcoli composti da solo acido urico (18%), con una maggiore prevalenza di quelli con struttura interna compatta.

Tra i fosfati l'unica rappresentanza spetta alla struvite con il 4% di prevalenza tra gli 80 calcoli analizzati. La bassa percentuale di prevalenza della cistina corrisponde all'unico calcolo riscontrato.

La distribuzione degli otto gruppi di calcoli è differente se confrontiamo i calcoli espulsi dagli uomini e dalle donne (fig. 3.48). Quest'ultime sono più soggette a calcoli del gruppo 6 della struvite e del gruppo 2 whewellite formatasi in cavità. Gli uomini sono più soggetti a calcoli di acido urico e di weddellite.

I calcoli di whewellite di tipo papillare hanno una frequenza simile nei due gruppi. La nuova tipologia riscontrata tra i pazienti lucani (gruppo 4\*) è più frequente negli uomini.



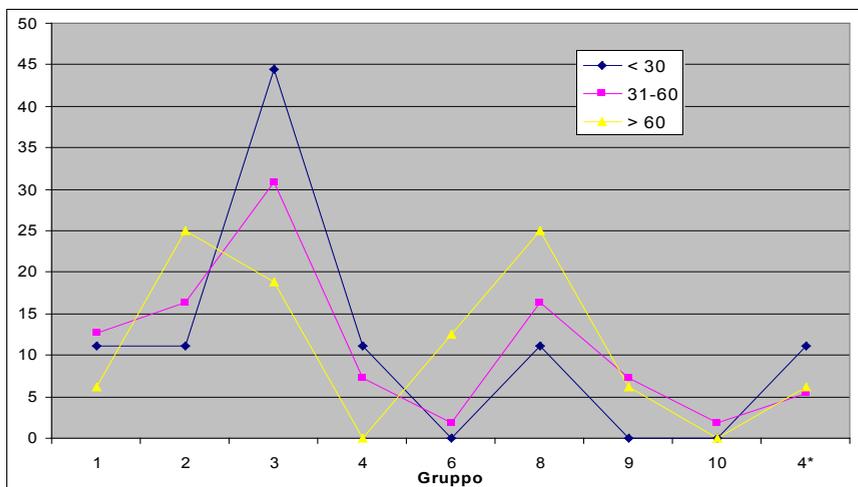
**Figura 3.48 Distribuzione dei calcoli tra uomini e donne**

*Gender distribution of kidney stones*

L'età influisce molto sulla tipologia di calcoli (fig. 3.49). Nei giovani di età inferiore ai 30 anni sono molto più frequenti i calcoli di weddellite mentre negli ultra sessantenni prevalgono quelli di acido urico. I calcoli papillari di whewellite sono più diffusi nell'età adulta.

La stratificazione per età e per genere della frequenza dei diversi gruppi di calcoli (fig. 3.50) mostra che i calcoli di weddellite (gruppo 3-molto diffusi) si concentrano nelle giovani donne (<30 anni) e negli uomini adulti (31-60 anni).

Quelli di acido urico (gruppo 8) sono di totale dominio maschile con un massimo negli ultrasessantenni. Le donne più anziane risentono dei problemi di infezioni urinarie e quindi producono calcoli di struvite (gruppo 6).



**Figura 3.49 Distribuzione dei calcoli per fasce di età**  
*Age distribution of kidney stones*

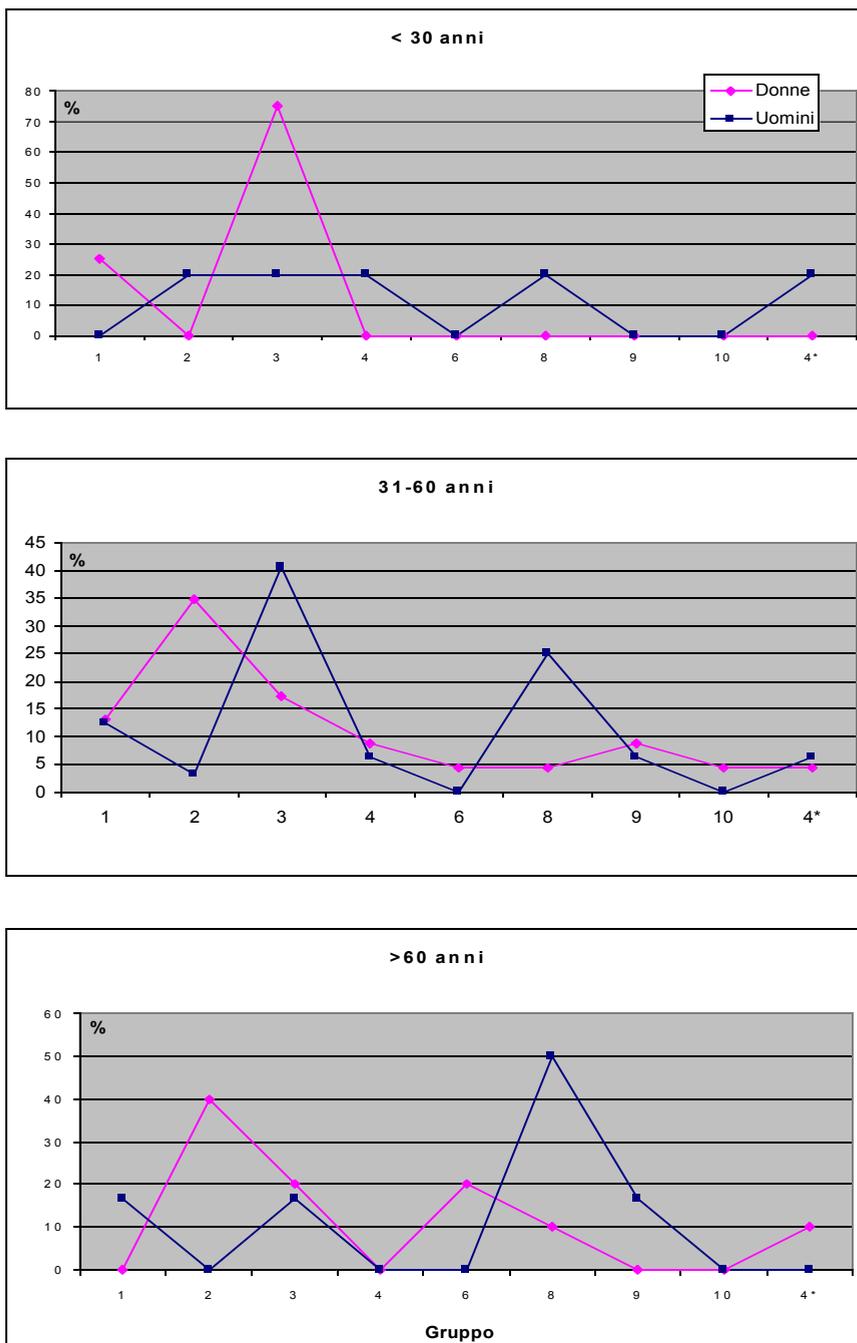
I calcoli papillari (gruppo 1) si alternano nella loro frequenza come pure i calcoli misti (gruppi 4 e 9). La nuova tipologia riscontrata tra i pazienti lucani (gruppo 4\*) è più frequente nei giovani < 30 anni e tra le ultrasessantenni.

Ogni campione è associato ad una persona residente in uno dei 131 comuni della Basilicata. Per individuare eventuali zone di maggiore produzione di calcoli renali, sono stati cartografati gli 80 campioni assimilando il punto di campionamento con la residenza dei rispettivi “produttori”.

Senza fare alcuna distinzione di tipologia di calcolo, si può osservare che la distribuzione dei campioni copre quasi tutta la regione (fig. 3.51).

I calcoli contenenti prevalentemente ossalati hanno una distribuzione ampia, il gruppo della struvite e quello dei calcoli di acido urico risultano, invece, concentrati in un’area relativamente ristretta della regione.

Considerando la distribuzione geografica dei calcoli di acido urico si osserva che essi sono concentrati esclusivamente nel nord della regione (vedi scheda in appendice).



**Figura 3.50** Distribuzione per genere ed età degli otto gruppi di calcoli  
*Gender and age distribution of the 8 group of kidney stones*



**Figura 3.51** Distribuzione geografica dei calcoli analizzati  
*Geographical distribution of analyzed kidney stones*

### 3.4 DISCUSSIONE

Al termine della fase di caratterizzazione dei calcoli renali raccolti, una serie di importanti risultati sono emersi.

Il 56% dei soggetti coinvolti nello studio ha prodotto un singolo calcolo espulso intero o in frammenti, mentre il restante 44% ha espulso più calcoli contemporaneamente.

Questo può essere il segnale che il processo di biomineralizzazione non è unico ed esclusivo, ma possono avvenire in contemporanea più mineralizzazioni nel rene a partire dalla stessa soluzione urinaria. Anche ammettendo che i diversi esemplari si siano generati in tempi diversi, la loro genesi non interferisce con quella degli altri calcoli già formati.

Il 56% dei calcoli sono prodotti da uomini, confermando la loro maggiore predisposizione.

Le dimensioni sono variabili ma associate alla tipologia di calcolo. La loro struttura porosa, priva di organizzazione e la velocità di crescita dei cristalli può spiegare perché i calcoli di struvite (e di fosfati in generale) raggiungono le più grandi dimensioni. A seguire ritroviamo i calcoli di acido urico.

I più piccoli sono quelli del gruppo 3, composti prevalentemente da weddellite che, a causa della morfologia dei cristalli, non riesce a generare aggregati molto grandi; è frequente che parte di questi non rimanga attaccato al corpo centrale del calcolo molto a lungo. Solo in presenza di idrossapatite tra i cristalli, che funge da legante, possiamo ottenere calcoli di weddellite di maggiori dimensioni.

Le osservazioni delle caratteristiche esterne dei calcoli risultano accomunate con la tipologia di calcolo e nello stesso tempo riflettono la loro struttura interna.

Questo è un importante assunto in quanto suggerisce che i caratteri esterni di un calcolo sono determinati dallo stesso meccanismo di formazione e sviluppo del biominerale in quanto in un ambiente “chiuso” come quello di un rene non esistono forze meccaniche esterne che possano modellare la forma esterna del calcolo.

Questo è molto evidente in calcoli di tipo 1 e 2 di ossalato di calcio monoidrato, meno per quelli di acido urico dove a parità di forma esterna possiamo avere strutture compatte o disordinate.

Importante sottolineare la differenziazione dei calcoli misti che rappresentano la testimonianza di cambiamenti radicali di composizione della soluzione urinaria durante la crescita del cristallo, quindi utile studiarli sia per capire il processo genetico del campione ma anche per stabilire una corretta procedura di trattamento, sia che si tratti di litotrissia (le diverse fasi mineralogiche reagiscono in modo differente al bombardamento) sia di trattamento dietetico e/o farmacologico.

L'individuazione di una nuova tipologia di calcoli misti, composti da weddellite e struvite (denominato gruppo 4\*), conferma la necessità di una costante implementazione della classificazione dei calcoli renali.

L'analisi qualitativa dei diffrattogrammi rivela che i profili diffrattometrici di biominerali come gli ossalati riscontrati nei calcoli sono comparabili con quelli dei corrispondenti minerali formati in ambiente geologico, i cui profili sono stati utilizzati per l'interpretazione e per il confronto dei parametri di cella. Questo può significare che il ruolo svolto dalla parte biologica nella cristallizzazione di questo tipo di biominerali è molto ridotto, infatti solo lievi differenze, se pur statisticamente significative, sono state riscontrate dal confronto tra il valore

medio calcolato e quello di riferimento.

Alla luce della differenziazione di due tipologie di calcoli di whewellite (papillari e di cavità) sono stati confrontati i parametri di cella della whewellite nelle due tipologie di calcolo (tab. 3.9). E' emerso che la whewellite che costituisce un calcolo papillare ha dimensioni più piccole rispetto ad uno stesso cristallo accresciutosi in cavità renale. La differenza è in media significativa al 95%.

**Tabella 3.9 Valori medi dei parametri di cella della whewellite in due diverse tipologie di calcoli**  
*Average values of whewellite unit cell dimension in two kidney stones type*

FASE	SISTEMA	GRUPPO	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Volume cella (Å <sup>3</sup> )	
Whewellite	monoclinico	P2 1/c	6.3	14.6	10.1	90.0	109.5	90.0	874.9	
			valore medio	6.2	14.5	9.9	90.0	109.6	90.0	853.5
in calcoli papillari (n.9)			deviazione standard	0.1	0.1	0.3	0.0	0.3	0.0	16.6
			valore medio	6.4	14.6	10.1	90.0	110.2	90.0	880.9
in calcoli di cavità (n.15)			deviazione standard	0.2	0.1	0.1	0.0	1.6	0.0	14.7

Un minor tempo di contatto con la soluzione urinaria potrebbe essere alla base delle ridotte dimensioni di questi cristalli.

Le dimensioni dei cristalli sono normalmente dipendenti dal bilancio tra il livello di sovrassaturazione dell'urina e la concentrazione degli inibitori della cristallizzazione, ma frequenti periodi di eccessiva sovrassaturazione possono superare anche i poteri protettivi degli inibitori. Questo comporta il rischio della formazione di cristalli anomali molto grandi e sviluppo di maggiori aggregati che, se trattenuti nel tratto urinario e nei reni, possono diventare nuclei di formazione di altri calcoli [Robertson et al. 1975; Robertson & Peacock 1972].

Facendo convergere le informazioni sulla trasformazione della whewellite in whewellite, risulta che solo con tecniche integrate di microscopia e diffrazione è possibile identificare questo fenomeno che si sviluppa a partire dall'interno dei cristalli di whewellite per poi svilupparsi verso l'esterno, dove la superficie della whewellite viene conservata.

Dall'analisi dei parametri di cella delle whewelliti si osserva che queste presentano volumi della cella più grandi se sono whewelliti coinvolte nel processo di trasformazione in whewelliti. La differenza riscontrata è significativa al 95%. In presenza di più grandi cristalli di whewellite, quindi, la trasformazione in whewellite è più favorita.

Gli aggregati sferici sono ampiamente presenti tra i minerali e sono stati molto studiati [Chernov 1971; Punin 1981; Keith & Padden 1963]. E' stato possibile utilizzare queste conoscenze per applicarle alla crescita dei calcoli renali.

Come si osserva, infatti, i calcoli di whewellite presentano al loro interno più nuclei di accrescimento. Questa forma di aggregazione sferica è quella più adatta in condizioni di crescita non stazionaria (non in equilibrio), come quella di una

soluzione urinaria accompagnate, poi, da periodi di dissoluzione consentendo così la fusione di questi aggregati.

Il calcolo, quindi risulta essere il risultato di più processi di nucleazione e crescita che si sviluppano simultaneamente. La crescita dei cristalli procede così autonomamente finendo, poi, per ostacolarsi a vicenda.

Questo tipo di struttura conferisce ai calcoli di whewellite una durezza tale da renderli più difficili da frammentare, infatti è elevato il numero di casi di recidive tra le persone che hanno prodotto calcoli di questo tipo. La grave conseguenza di una frammentazione non correttamente eseguita si traduce in una impossibilità di espellere spontaneamente i frammenti (in quanto troppo grandi) che, rimanendo all'interno delle cavità renali, fungono da substrato per nuove cristallizzazioni.

La civilizzazione ha cambiato la tipologia fisico-chimica dei calcoli renali. Prima della rivoluzione industriale in occidente e nei paesi in via di sviluppo una forte percentuale di calcoli era legata alle infezioni delle basse vie urinarie (calcoli di struvite).

Nei paesi industrializzati nei tempi moderni questa tipologia di calcoli è diventata più rara. Si registrano, invece, in prevalenza calcoli renali costituiti soprattutto da ossalato di calcio, infatti la maggior parte degli studi scientifici concentrano l'attenzione su questa tipologia di calcoli.

Anche in Italia gli unici studi sui calcoli renali eseguiti si sono limitati ad analizzare parzialmente le tipologie di calcoli renali presenti sul territorio e limitando, per genere e/o per età, la popolazione investigata.

Inoltre, pur constatando l'importanza di una *stone analysis* di dettaglio, sono ancora molti gli studi che si limitano a classificare i calcoli in sole quattro categorie sulla base del loro componente principale.

Perciò per avere una valutazione comparativa della percentuale di prevalenza dei calcoli lucani sulla base dello stesso grado di dettaglio applicato, ho dovuto confrontare i risultati con la prevalenza riscontrata a seguito di studi di caratterizzazione dei calcoli in altre comunità, come quella delle isole delle Baleari [Grases et al. 2002] e quella francese [Daudon et al. 2004], al fine di individuare eventuali similitudini e/o differenze correlabili a diverse abitudini alimentari, nel caso della comunità francese, e a diverse influenze ambientali, nel caso della comunità delle isole Baleari.

Sono state riportate anche le percentuali di prevalenza di calcoli di altre realtà mondiali molto diverse ma che rappresentano alcuni degli studi più recenti in materia.

Dal confronto è emerso che tra le due diverse comunità considerate, non si osservano differenze e le percentuali di prevalenza dei vari tipi di calcoli

sono uguali. Rispetto ai risultati ottenuti in Basilicata si osservano, invece, delle differenze.

Se i calcoli più frequenti risultano essere sempre quelli composti da ossalato in calcio, nella comunità lucana si registra un più alto numero di calcoli di acido urico a discapito di quelli composti da fosfati di calcio (fig. 3.55). L'abbondante presenza di acido urico quale componente prevalente nei calcoli di pazienti lucani, si evidenzia anche dall'alta percentuale di calcoli misti formati dalla combinazione di acido urico ed ossalati di calcio.

Questa maggiore abbondanza non è inusuale per l'Italia [Borghesi et al. 1990; Pavone-Macaluso & Miano 1979] e può essere collegata ad alcuni particolari fattori di rischio legati prima di tutto alle abitudini alimentari come un eccesso di proteine ed un consumo frequente di alcool [Robertson et al. 1979; Zechner et al. 1982; Robertson 1984].

I fattori di rischio per lo sviluppo di calcoli di acido urico sono da ricercarsi innanzitutto nel sito di biomineralizzazione che deve avere: delle cavità renali con bassa efficacia urodinamica per consentire la cristallizzazione, una sovrassaturazione rispetto all'acido urico (iperuricuria) e valori di pH < 5.5.

Questi parametri chimici critici sono strettamente legati all'eccessivo consumo di alimenti ricchi in purina (carne, salumi, crostacei, pesce e legumi) e scarso apporto nella dieta di succo di agrumi, bevande gassate e vegetali. Anche la caffeina e l'alcool possono aumentare la concentrazione di acido urico nelle urine.

I bassi valori di pH sono influenzati anche dalla qualità delle acque ingerite. Se c'è un consumo frequente di acque poco dure e debolmente bicarbonatiche non si favorisce l'alcalinizzazione delle urine.

Sulla base dei risultati dello studio statistico illustrato nel capitolo 2 di questa tesi dottorale, era stata individuata una correlazione positiva tra consumo di acque dure (durezza >22.5°f) e prevalenza di nefrolitiasi in Basilicata (*Odds ratio* >1.27;  $p < 0.001$ ), indicando che un consumo di acque ricche in calcio aggrava lo sviluppo di calcolosi.

Questa evidenza deve essere rivalutata con l'osservazione che una generalizzazione dei fattori di rischio della patologia non è consentita ma si dovranno trattare le singole tipologie di calcolo come patologie assistenti.

E' stato osservato che i calcoli di acido urico sono concentrati esclusivamente nel nord della regione. Sicuramente le abitudini alimentari che caratterizzano tutto l'arco appenninico, con un elevato consumo di carni rosse, predispone maggiormente allo sviluppo di questa tipologia di calcoli, ma è pur vero che non lungo tutto l'arco appenninico è possibile imbattersi con gli stessi risultati in

Gruppi e sottogruppi n. campioni	BASILICATA (Sud Italia) 80	Forme (Nord Italia) (Borghesi et al., 1990)	Isole Baleari (Spagna) (Garcés et al., 2002)	Francia (Daudon et al., 2004)	Isole Baleari (Spagna) (Garcés et al., 1993)	North Jordania (Alkhood, 2007)	sud India (Srijjo et al., 2007)	mond India (Srijjo et al., 2005)	Sudan (Galla et al., 1998)
1 Whewellite papillare	11%		12,90%		314	30	37	1050	80
2 Whewellite di conifò	15%		15,40%	43,70%	25,10%			74%	
3 Weddellite	20%		33,60%	21,50%	14,10%			19%	
4 OSALATI DI CALCO	59%	27,40%	63,10%	65,20%	39,20%	26,70%	45%	95%	65%
4 Weddellite + idrossapatite	6%		11,20%		2,7%		45%		
5 Idrossapatite	0%		7,10%	12,7%				1,80%	1,80%
6 Struvite	4%		4,10%	2,2%			2,50%	1,42%	1,42%
7 Brucite	0%		0,50%	1,1%					
8 FOSFATI DI CALCO	4%	1%	11,30%	16%	21%		2,50%	3,22%	15,80%
8 ACIDO URICO	15%	25,50%	8,20%	8,70%	10,80%	6,70%	7,50%	0,95%	11,80%
9 Whewellite + Acido Urico	6%	8%	2,60%		1,20%	10%			
10 CISTINA	1%	0,90%	1,10%	1,10%					0%
Altro (diverse associazioni o altri calcoli poco frequenti)	5,00%	36,30%	1,00%		1,20%	55,60%		2,75%	7,40%

Figura 3.52 Confronto delle percentuali di prevalenza dei calcoli in Basilicata con altri studi  
*Percentage comparison between kidney stones prevalence in Basilicata and in previous studies*

termini di prevalenza di calcoli di acido urico a parità di dieta.

Altri fattori devono entrare in gioco per spiegare questa distribuzione.

Riguardo alla durezza delle acque, i comuni con prevalenza di calcoli di acido urico hanno acque potabili poco dure e ricadono in zone dove il contenuto di carbonati nel suolo, come da indicazioni della carta dei carbonati, è inferiore al 10%.

Tutti i soggetti affetti da calcoli di acido urico hanno dichiarato di fare uso domestico delle acque comunali e di consumare diverse tipologie di acque imbottigliate.

Le etichette di tutte le acque indicate sono state raccolte e confrontate.

Le acque presentano tutte un basso contenuto in bicarbonati (150-200mg/L) ed una bassa durezza (2-7°f).

Queste caratteristiche non consentono ai calcoli di acido urico di dissolversi perché non incontrano un ambiente alcalino.

Un altro fattore di rischio legato allo sviluppo di calcoli, in particolare, di acido urico è il clima inteso come temperatura. Come detto in precedenza, una relazione tra basse temperature e sviluppo di calcoli è possibile in quanto le basse temperature, non invogliando ad un consumo frequente di liquidi in genere, portano i soggetti ad avere un più basso volume urinario.

La maggiore sovrassaturazione causata da un volume urinario ridotto è, quindi, da considerarsi una causa anche dei calcoli di acido urico che si distribuiscono in zone con basse temperature medie annue.

A queste zone corrisponde anche una radiazione globale annua più bassa rispetto al resto della regione. E' noto che una maggiore esposizione alle radiazioni solari stimola la produzione di vitamina D che, a sua volta, favorisce l'assorbimento di calcio nell'organismo. Il calcio è il catione più abbondantemente coinvolto nei processi di cristallizzazione dei calcoli specie per quelli di ossalato e fosfato.

Nelle zone a maggiore prevalenza di calcoli di acido urico corrisponde in Basilicata una deficienza di quelli composti da fosfato di calcio.

Le due tipologie di calcoli possono considerarsi antagoniste in quanto presentano fattori etiologici molto differenti o addirittura opposti.

In futuro, una maggiore comprensione dei fattori che controllano la produzione di calcoli di acido urico può avere anche un'altra valenza considerato che l'acido urico ha anche un ruolo nello sviluppo della litiasi ossalocalcica.

La formazione di un nucleo eterogeneo sopra il quale i cristalli di ossalato di calcio si possono accrescere e sviluppare, rappresenta il primo e più importante stadio della litiasi ossalocalcica.

La maggiore capacità dell'acido urico di fungere da nucleante eterogeneo dell'ossalato di calcio, viene attribuita da molti studi alle caratteristiche cristallografiche simili tra cristalli di acido urico e di ossalato di calcio monoidrato [Grases et al. 1991].

### 3.5 BIBLIOGRAFIA

- Abboud IA (2007). Mineralogy and chemistry of urinary stones: patients from North Jordan. *Environ Geochem Health* 30: 445-463.
- Anderson DA (1972). Environmental factors in the aetiology of urolithiasis. *Proceedings of international symposium on renal stone research Basel:Karger*,130-144.
- Atakan IH, Kaplan M, Seren Gulay, Aktoz T, Gul H & Inci O (2007). Serum, urinary and stone zinc, iron, magnesium and copper levels in idiopathic calcium oxalate stone patients. *Int Urol Nephrol* 39: 351-356.
- Balla AA, Salah AM, Khattab AHH, Kombal A, Bongartz D, Hoppe B & Hesse A (1998). Mineral composition of renal stones from the Sudan. *Urol Int* 61: 154-156.
- Bellanato J, Delatte LC, Hidalgo A & Santos M (1973). Application of infrared spectroscopy to the study of renal stones. In: Dellatte LC, Rapado A, Hodgkinson A (eds.) *Urinary Calculi: Recent Advances in aetology, stone structure and treatment: proceeding of the International Symposium on Renal Stone Research*. S. Karger AG, Basel, Switzerland, pp. 237-246.
- Borghi L, Ferreti PP, Elia GF, Amato F, Melloni E, Traspasi MR & Novarini A (1990). Epidemiological study of urinary tract stones in a Northern Italian City. *Br J Urol* 65, 231-235.
- Breslau NA, Brinkley L & Hill KD (1988). Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 140-146.
- Brinkley LJ, Gregory J & Pak CYC (1990). A further study of oxalate bioavailability in foods. *J Urol*. 144: 94-96.
- Chai W, Liebman M, Kynast-Gales S & Massey L (2004). Oxalate absorption and endogenous oxalate synthesis from ascorbate in calcium oxalate stone formers and non-stone formers (abstract). *American Journal of Kidney Diseases: The official journal of the National Kidney Foundation*, 44, 1060-1069.
- Chernov A (1971). Theory of stability of faceted forms of crystals. *Kristallografiya* 16 (4), 842-863.
- Colombi P, Bontempi E, Valetti S, Alessandri I, Volta V, Massardi A & Depero LE (2003). In una dimora storica del XVI secolo, indagine di microdiffrazione dei raggi x con rivelatore bidimensionale in *Atti, III Convegno, Restauro e conservazione dei beni culturali: materiali e tecniche*, ed. Mascolo G. Dipartimento di Meccanica, Strutture, Ambiente e Territorio, Università degli Studi di Cassino.

- Costa-Bauzá A, Perello J, Isern B & Grases F (2005). An experimental study on residual lithiasis after shock wave lithotripsy. *Urol. Res.* 33: 51-56.
- Daudon M, Bader CA & Jungers P (1993). Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc* 7:1081–1104
- Daudon M, Dore JC, Jungers P & Lacourt B (2004). Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach. *Urological research* 32(3): 241-247.
- De Mendonca OGC, Martini LA & Baxmann AC (2003). Effects of an oxalate load on urinary excretion in calcium stone formers. *J Renal Nutr* 13: 39-46.
- Drach GW (1978). Urinary lithiasis. In: Harrison JH, Gittes RF, Perlmutter AD, Stamey TA, Walsh PC (eds). *Compbell's urology*, Vol.1. Eastbourne: WBSaunders, 779- 878.
- Drach GW (2000). Secondary and miscellaneous urolithiasis. Medications, urinary diversions, and foreign bodies. *Urol Clin North Am* 27:269–273.
- Ferrari P & Bonny O (2004). Diagnostik und prevention des harnsauresteins. *Ther Umsch* 61: 571-574.
- Giannossi ML, Monelli G & Summa V (2009). The mineralogy and internal structure of kidney stones. *NDT Plus* 2009 2: 418-419.
- Gibson RI (1974). Descriptive human pathological mineralogy. *Am. Mineral.* 59: 1177-1182.
- Girija EK, Narayana Kalkura S, Sivaraman PB & Yokogawa Y (2007). Mineralogical composition of urinary calculi from southern India. *J Scientific & industrial Research* 66: 632-639.
- Goldfarb S (1988). Dietary factors in the pathogenesis and prophylaxis of calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 34: 544-555.
- Goldfarb s (1990). The role of diet in the pathogenesis and therapy of nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin N Am* 19: 805-820.
- Grases F, Costa-Bauzá A & García-Ferragut L (1998). Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Colloid Interface Sci* 74: 169-194.
- Grases F, Costa-Bauzá A, March JG & Masárová L (1991). Glycosaminoglycans, uric acid and calcium oxalate urolithiasis. *Urol Res* 19: 375-380.
- Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V & Conte A (2002). Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* 322, 29-36.
- Hess B (1996). Low calcium diet in hypercalciuric calcium nephrolithiasis: first do no harm. *Scanning Microsc* 10: 547-554.

- Hodgkinson A (1971). A combined qualitative and quantitative procedure for the chemical analysis of urinary calculi. *J Clin Pathol* 24: 147-151.
- Holland TJB & Redfern SAT (1997). Unit cell refinement from powder diffraction data: the use of regression diagnostics. *Mineralogical Magazine* 61: 65-77.
- Holmes RP & Kennedy M (2000). Estimation of the oxalate content of foods and daily intake. *Kidney Int* 57: 1662-1667.
- Holmes RP, Goodman HO & Assimis DG (2001). Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int* 59: 270-276.
- ICDD (2005). Powder Diffraction File. International Centre for diffraction Data, edited by WF McClune, Newtown Square, PA: 19073-3272.
- Jaeger P (1996). Genetic versus environmental factors in renal stone disease. *Curr Opin Nephrol Hyperten.* 5: 342-346.
- Keith HD & Padden F J (1963). A phenomenological theory of spherulitic crystallization. *J. Appl. Phys.* 34: 2409-2421.
- Krumm S (1997). WinFit: a computer programm. [www.Geol.uni-erlangen.de/html/software/winsoft.html](http://www.Geol.uni-erlangen.de/html/software/winsoft.html)
- Lonsdale K, Sutor DJ & Wooley S (1968). Composition of urinary calculi by X-ray diffraction. Collected data from various localities. I. Norwich (England) and District. *Br. J. Urol.* 40: 33-36.
- Marshall RW, Cochran M & Hodgkinson A. (1972). Relationships between calcium and oxalic acid intake in the diet and their excretion in the urine of normal and renal-stone-forming subjects. *Clin Sci* 43: 91-99.
- Massey Lk (2003). Dietary influences on urinary oxalate and risk of kidney stones. *Front Biosci* 8: 584-594.
- Nakai H, Yanagawa M, Kameda K, Ogura Y & Kawamura J (1996). Transformation of calcium oxalate dihydrate crystals in solution: why is not calcium oxalate dihydrate detected in urinary calculi? *Proc VIII Int Symp Urol.* Dallas.
- Orlando MTD, Kuplich L, de Souza DO, Belich H, Depianti JB, Orlando CGP, Medeiros EF, da Cruz PCM, Martinez LG, Correa HPS & Ortiz R (2008). Study of calcium oxalate monohydrate of kidney stones by X-ray diffraction. *Powder Diffraction Suppl.* 23: S59-S64.
- Park SJ & Coe FL (1994). A increasing number of calcium oxalate stone events worsens treatment out com. *Kidney International* 45: 1722-1730.
- Pavone-Macaluso M & Miano L (1979). Epidemiology of urolithiasis in Italy – XVII Congres de la Società Internationale d’Urologie. Pris, Joly pp : 113-137
- Punin Yu O (1981). Splitting of crystals. *Proceeding of the Russian*

Mineralogical Society 6: 667-686.

- Rieu P (2005). Lithiases d'infection. *Ann Urol (Paris)* 39: 16-29.
- Robertson WC (1984) Urinary tract calculi. In: *Metabolic bone and stone disease* (Nordin BEC ed) pp 236-271, Churchill Livingstone, New York.
- Robertson WG & Peacock M (1972). Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone-formers. *Clin Sci* 43:499-506.
- Robertson WG, Peacock M, Marshall RW, Speed R & Nordin BEC (1975). Seasonal variations in the composition of urine in relation to calcium stone-formation. *Clinical Science and Molecular Medicine* 49: 597-602.
- Robertson WC, Heiburn PJ & Peacock M (1979). The effect of high animal protein intake on the risk of calcium stone-formation in the urinary tract. *Clin Sci.* 57: 285-588.
- Robertson WG & Peacock M (1982). The pattern of urinary stone disease in Leeds and in the United Kingdom in relation to animal protein intake during the period 1960-1980. *Urology International* 73: 394-399.
- Schlesinger N (2005). Dietary factors and hyperuricaemia. *Curr Pharm Des* 11: 4133-4138.
- Skrtic D, Fürdi-Nilhofer H & Markovic M (1987). Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. V. The influence of precipitation conditions and some additives on the nucleating phase. *J Cryst Growth* 80: 113-120.
- Sokol E, Nigmatulina E, Maksimova N & Chiglintsev A (2005).  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  spherulites in human kidney stones: morphology, chemical composition, and growth regime. *Eur. J. Mineral.* 17: 285-295.
- Spector M, Garden NM & Rous SN (1978). Ultrastructure and pathogenesis of human calculi. *Br. J. Urol.* 50: 12-15.
- Stitchantrakul W, Sopassathit W, Prapaipanich S & Domrongkitchaiporn S (2004). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35:1028-1033
- Takasaki BH (1971). An observation on the analysis of urinary calculi by infrared spectroscopy. *Calcif. Tissue Res.* 7: 232-240.
- Westbury EJ & Omenogor P (1970). A quantitative approach to the analysis of renal calculi. *J. Med Lab Technol.* 27: 462-747.
- Williams CP, Child DF, Hudson PR, Davies GK, John R, Anandaram PS & De Bolla AR (2001). Why oral calcium supplements may reduce renal stone disease: report of pilot study. *J. Clin. Pathol.* 54, 54-62.
- Zechner O, Pilliger II & Scheiber V (1982). Idiopathic uric acid lithiasis – epidemiologic and metabolic aspects. *J. Urol.* 128: 1219-1223.