

## SOMMARIO ESTESO

L'organismo umano è composto da una serie di minerali: alcuni si formano in condizioni fisiologiche e controllate e perciò sono detti biominerali fisiologici (ossa, denti e smalto). Questo tipo di processo di cristallizzazione è regolato da una serie di fattori: la modificazione di uno di questi potrebbe provocare l'alterazione del normale processo di cristallizzazione, dando luogo a tutta una serie di calcificazioni anomale. Queste calcificazioni sono chiamate patologiche e possono avere gravi conseguenze sull'organismo umano.

In funzione dell'organo o della parte del corpo colpita, distinguiamo vari tipi di calcificazioni patologiche: calcoli renali e delle vie urinarie, calcoli biliari, calcificazioni cardiovascolari, calcoli o depositi cristallini nelle ghiandole o condotti salivari, formazione di tartaro, depositi di pirofosfato calcico nella cartilagine, gotta (deposizione di acido urico).

Ognuna di queste patologie necessita di studi approfonditi, soprattutto sull'influenza che l'ambiente può esercitare sul loro sviluppo, vista la scarsa letteratura scientifica in merito.

La nefrolitiasi, o litiasi renale, si definisce come una patologia multifattoriale che implica la formazione di una struttura solida nella quale coesistono cristalli e materia organica nell'urina all'interno dei reni.

Questa è una malattia molto frequente che affligge dall'1 al 15% della popolazione mondiale. La prevalenza di litiasi renale differisce molto nelle diverse parti del mondo: in Asia è pari al 1-5%, in Europa al 5-9%, nel Nord America 13-15% ed in Arabia Saudita 18-20%. In Spagna, la prevalenza è superiore al 4% e raggiunge valori di circa il 14.3% nelle isole Baleari. In Italia la percentuale di prevalenza della litiasi renale varia dal 3% al 13% .

La litiasi renale è stata sempre presente, praticamente dall'inizio dell'umanità. Il calcolo più antico di cui si è a conoscenza è datato a 4800 a.C., ed è stato ritrovato in una tomba preistorica di El Amrah.

Il primo studio sulla composizione di un calcolo renale fu realizzato intorno al 1800 da Schellee (1742–1786) e Bergman (1734–1794) che identificarono un calcolo di acido urico. Tuttavia, nonostante gli studi su questa patologia si siano estesi ed approfonditi, al giorno d'oggi rimane ancora una patologia ad alta percentuale di recidive (il 75% nei 10 anni che seguono l'evento patologico) dovute al fatto che, nella maggior parte dei casi, non viene attuato un trattamento terapeutico efficace ed adatto al tipo di calcolo in esame.

Questa carenza è da correlare all'assenza di un approccio multidisciplinare che implica la conoscenza mineralogica e cristallografica del calcolo e, con lo scopo di colmare alcune di queste lacune, è stato svolto uno studio approfondito

sui calcoli renali.

Avendo osservato che lo sviluppo di calcoli renali in Italia negli ultimi dieci anni ha registrato un incremento, particolarmente accentuato nel Mezzogiorno, è stata presa come area di studio la Regione Basilicata, accogliendo anche la richiesta giunta dagli operatori medici del settore e dalle Istituzioni locali preposte alla tutela della salute umana, per porre l'attenzione sull'importanza dell'approccio chimico-mineralogico e petro-morfologico nello studio di biominerali con particolare riguardo a quelli che, accrescendosi all'interno del corpo umano, ne costituiscono una patologia, proprio come i calcoli renali.

Attualmente non risultano studi simili eseguiti in Italia. A livello internazionale, invece, la produzione scientifica mostra numerosi studi di settore sebbene condotti in prevalenza da medici che osservano il fenomeno da un altro punto di vista.

Lo studio dei calcoli renali in generale è abbastanza trascurato nella diagnostica medica. Questo impedisce allo studioso di nefrolitiasi di ottenere una vasta gamma di informazioni utili per comprendere l'origine della patologia e per risalire ai fattori influenzanti, molti dei quali sono legati all'interazione con l'ambiente circostante.

Lo scopo generale di questa tesi di dottorato è stato quello di approfondire le conoscenze mineralogiche, cristallografiche, morfologiche e chimiche dei calcoli renali al fine di implementare la loro classificazione morfo-composizionale e determinare i fattori geo-ambientali e comportamentali che maggiormente ne influenzano lo sviluppo in modo da definire una differente prevalenza geografica in Basilicata.

Per il raggiungimento di questo scopo, sono stati definiti degli obiettivi specifici da perseguire:

- Individuazione della distribuzione geografica della patologia attraverso uno studio epidemiologico triennale per risalire al tasso di prevalenza relativo nelle diverse aree della regione aventi differenze geologiche, pedologiche e climatiche;
- Determinazione della composizione di un elevato numero di calcoli renali raccolti in un triennio grazie alla collaborazione dello staff medico del Dipartimento di Nefrologia e Litotrissia dell'Azienda Ospedaliera Regionale San Carlo di Potenza, attraverso l'utilizzo di tecniche integrate di microscopia e diffrazione;
- Implementazione dei più recenti schemi classificativi sui calcoli renali;
- Descrizione di strutture interne di calcoli prevalenti e ricostruzione degli scenari di crescita dei biominerali patologici più diffusi in Basilicata;

- Dosaggio di specifici elementi chimici perché particolarmente coinvolti nel processo di cristallizzazione (Ca, Mg) o perché rappresentanti dei potenziali rischi per la salute umana (Pb, Cr), per avere ulteriori dati a supporto del possibile ruolo di alcuni elementi chimici nel processo di nucleazione e crescita dei calcoli o semplicemente per valutarne il loro ruolo in termini di monitoraggio ambientale;
- Valutazione dei fattori predisponenti ed influenzanti i processi di biomineralizzazione.

## **MATERIALI E METODI**

Al fine di individuare le nefrolitiasi prevalenti è stato eseguito uno studio epidemiologico triennale (2003-2005) in collaborazione l'Ufficio Risorse Finanziarie e investimenti del sistema salute della Regione Basilicata.

Lo studio epidemiologico attivato è di tipo descrittivo, dove l'eleggibilità "a CASO" è dettata dalle seguenti caratteristiche:

“soggetto residente in qualsiasi comune della Basilicata, di qualsiasi sesso ed età, che nel periodo di osservazione prestabilito (2003-2005) è stato ricoverato presso una qualsiasi struttura ospedaliera nazionale per le diagnosi “Calcolosi urinaria con complicazioni e/o litotrissia mediante ultrasuoni” (DRG 323) e “Calcolosi urinaria senza complicazioni” (DRG 324); [DRG = Diagnosis Related Groups; in italiano “Raggruppamenti Omogenei di Diagnosi”, ROD]”.

Un campione rappresentativo dei residenti in Basilicata, corrispondente ai ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera principale della Regione, il “San Carlo” di Potenza, è stato selezionato per risalire alle abitudini dietetiche e comportamentali attraverso la somministrazione di un questionario per tutto il periodo di osservazione.

Il questionario comprende una serie di domande riguardanti i dati personali (sesso, età, stato civile, indirizzo completo e livello scolastico), socio-economici (tipo di lavoro, attività sportiva) e la storia medica (peso, altezza, anamnesi personale e familiare, abitudini alimentari). In particolare sulle abitudini alimentari, ci sono domande specifiche sulle quantità giornaliere e sul tipo di acqua utilizzata (imbottigliata o meno). Inoltre, se consumano, e con quale frequenza, alcuni cibi e bevande particolari (es. vegetali ricchi in ossalati) e nel caso siano prodotti biologici, il luogo esatto di coltivazione per valutare la possibilità di ingerire elementi chimici promotori di calcoli provenienti dal suolo coltivato.

Su tutti i calcoli renali raccolti nel triennio 2006-2009 è stata eseguita una caratterizzazione morfo-composizionale con l'impiego di tecniche integrate di microscopia ottica ed elettronica a scansione e di diffrazione di raggi X per

polveri.

Mediante tecniche di spettroscopia ottica e di assorbimento atomico è stato eseguito il dosaggio di alcuni elementi chimici particolarmente coinvolti nel processo di cristallizzazione dei calcoli (Ca, Mg) o perché potenzialmente tossici (Pb, Cr).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### *La prevalenza di calcolosi renale in Basilicata ed i possibili fattori influenzanti*

Lo studio epidemiologico è stato sicuramente il primo passo verso la comprensione del problema e, integrando questo con i dati derivanti dai questionari somministrati ai pazienti, si è potuto confermare che l'andamento della patologia in Regione è concorde con l'andamento nazionale e mondiale, sia in termini di genere prevalente (maschile) che in termini di fascia di età più colpita (40-60 anni).

In base ad una popolazione regionale media annua pari a circa 597000 residenti in Regione (da stime intercensuali ISTAT), si registrano circa 10 malati di calcolosi all'anno su 1000 residenti in Basilicata.

Non è possibile confrontare il risultato per la regione Basilicata e quello a livello nazionale, perché provengono da tipologie di studio differenti ma, soprattutto, non si riferiscono ad una popolazione di riferimento ugualmente stratificata per sesso e per età: si avvicina comunque, molto al dato proposto da Serio & Fraioli (1999) per l'Italia.

Il tasso di prevalenza a livello regionale è destinato a salire se viene calcolato per aree di competenza delle ASL (Azienda Sanitaria Locale) della Regione. Tra le 5 ASL si registra uno scarto di 5 malati di calcolosi su 1000 abitanti, con un massimo per l'ASL n. 2 di Potenza. Una prevalenza media maggiore di 12‰ abitanti si rileva in comuni della zona N-NW della regione, ad eccezione di qualche caso isolato nella parte meridionale.

La calcolosi renale è una patologia molto diffusa in Basilicata principalmente in particolari aree che sono accomunate da caratteri demografici e stili di vita della popolazione. In tali aree, dopo gli studi effettuati, si è supposto che anche l'ambiente, potenzialmente favorevole allo sviluppo di calcoli renali, potesse dare un forte contributo.

Attraverso un approccio statistico, è stato verificato che i fattori che possono contribuire alla distribuzione di un maggiore tasso di prevalenza di calcolosi nelle aree di dominio appenninico in Basilicata sono: il genere maschile, un'età compresa tra i 40-59 anni, le basse temperature, l'alta quota che favorisce una dieta ricca in proteine animali e la durezza delle acque. La combinazione di

questi e di altri fattori può spiegare perché vivere in alcune aree della Basilicata aumenterebbe il rischio di formazione di calcoli renali.

I fattori di rischio determinati per la Basilicata potrebbero non essere ritenuti tali in altre regioni: questo perché la calcolosi renale è una patologia multifattoriale ed il peso di ogni fattore è legato ad una combinazione di più variabili. Risulta necessario, quindi, eseguire studi con il medesimo approccio metodologico in molte altre località per confermare e/o modificare i risultati ottenuti.

Analizzando le percentuali delle risposte ad alcune domande che riguardano le informazioni socio-economiche dei pazienti (tipo di lavoro, attività sportiva) e la loro storia medica (anamnesi personale e familiare, abitudini alimentari), si osserva che:

- il numero dei pazienti che ha già sofferto di nefrolitiasi è più della metà, quindi è diffuso il problema delle recidive;
- anche se più della metà dei pazienti afferma di avere familiari che sono stati o sono affetti da nefrolitiasi, il dato non è pienamente a supporto dell'ipotesi di un fattore ereditario predominante per questa patologia;
- il clima che caratterizza le diverse stagioni non influisce sugli stadi dolorosi della patologia;
- non si riscontrano correlazioni tra nefrolitiasi ed altre malattie;
- alcuni stili di vita considerati dannosi e predisponenti alla nefrolitiasi, quali la sedentarietà, l'eccessiva sudorazione, l'ambiente di lavoro surriscaldato, la scarsa attività fisica, non sembrano influenzare l'insorgere della patologia.

#### *La caratterizzazione compositiva dei calcoli renali*

Per risalire all'influenza ambientale sullo sviluppo dei calcoli renali, i risultati dello studio statistico sono stati verificati e/o perfezionati grazie all'approfondimento delle conoscenze mineralogiche, cristallografiche, morfologiche e chimiche dei calcoli renali stessi.

Su più di 100 calcoli renali raccolti in un triennio (espulsi spontaneamente o asportati chirurgicamente da pazienti residenti in regione) è stata eseguita una caratterizzazione morfo-compositiva con l'impiego di tecniche integrate di microscopia ottica ed elettronica a scansione e di diffrazione di raggi X per polveri.

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 (fase mono-idrata - whewellite; fase bi-idrata - weddellite);
- fosfati di calcio (idrossapatite e struvite, 6%);
- acido urico;
- cistina.

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).

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.

Su un numero rappresentativo di calcoli renali di dimensioni maggiori, sono state ricavate delle sezioni sottili a cui è seguita un'attenta analisi petrografica da cui si è evito che i calcoli di whewellite presentano al loro interno, di solito, più nuclei di accrescimento: il calcolo risulta quindi essere il risultato di più processi di nucleazione e crescita che si sviluppano simultaneamente. Questa struttura conferisce al calcolo una durezza elevata che rende più complicata la sua frantumazione attraverso le tecniche di litotrissia.

La combinazione del dato mineralogico e quello morfologico ha consentito, inoltre, di ottenere importanti informazioni anche sul sito di formazione di alcuni tipi di calcoli.

Circa il 29% dei calcoli renali composti da ossalato di calcio, è formato dalla forma di ossalato bi-idrato, cioè weddellite formatasi in cavità renali. In una percentuale elevata (11%) di calcoli di ossalato di calcio nella forma mono-idrata la whewellite si è sviluppata a contatto con le pareti renali. Il nucleo di questo tipo di calcolo si può formare esclusivamente dove la parete del rene (epitelio) risulta alterata o danneggiata: le cellule dell'epitelio danneggiato tendono ad accumulare calcio creando così le condizioni favorevoli per i processi di calcificazione. In alcuni casi lo stesso epitelio danneggiato può fungere da substrato per la nucleazione di calcoli di whewellite: in questo caso, il nucleo del calcolo è composto quasi interamente da materia organica.

Su un numero rappresentativo di campioni sono stati dosati alcuni elementi chimici presenti per capirne l'importanza ed il coinvolgimento nel processo di biomineralizzazione.

Alla luce dei risultati ottenuti, appare chiaro che tutte le tipologie di calcoli contengono svariati elementi in tracce. La tipologia di calcolo però influisce sulle quantità degli elementi: la presenza particolarmente abbondante di alcuni elementi non può essere solo il risultato di una assunzione da una dieta standard ma, necessariamente, deve essere interpretata come un segnale di una qualche anomalia nella catena alimentare e quindi nell'ambiente circostante. Particolare attenzione è stata rivolta ad elementi potenzialmente tossici come il piombo ed il cromo.

### *La classificazione dei calcoli renali*

Questo approccio più dettagliato allo studio dei calcoli renali, ha permesso di implementare i più recenti schemi classificativi degli stessi, con l'individuazione di un nuovo gruppo di calcoli formati in prevalenza da weddellite e struvite.

Per avere una valutazione comparativa della percentuale di prevalenza dei calcoli lucani sulla base dello stesso grado di dettaglio applicato, i risultati ottenuti sono stati confrontati con la prevalenza riscontrata a seguito di studi di caratterizzazione dei calcoli in altre comunità europee (vista la mancanza di dati nazionali), come quella delle isole delle Baleari e quella francese, al fine di individuare eventuali similitudini e/o differenze.

Dal confronto è possibile trarre alcune importanti conclusioni. E' possibile osservare che, nella comunità lucana, i calcoli più frequenti risultano essere sempre quelli composti da ossalato in calcio, mentre si registra un più alto numero di calcoli di acido urico a discapito di quelli composti da fosfati di calcio. 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. Talvolta, il nucleo di questi tipi di calcoli, è rappresentato da frammenti di calcoli precedenti che hanno subito un trattamento di litotrixxia che però non lo ha ridotto a dimensioni tali da poterlo facilmente espellere o eliminare con un trattamento farmacologico appropriato. Questa maggiore abbondanza non è inusuale per l'Italia 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.

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

Quest'ultimo punto potrebbe giustificare la distribuzione geografica dei calcoli di acido urico concentrati esclusivamente nel nord della regione, zona

con prevalente diffusione di acque poco dure. Queste zone, inoltre, sono caratterizzate da una scarsa radiazione solare e temperature medie più basse rispetto al resto della regione, tutti fattori che non favoriscono l'assunzione di liquidi e il maggior assorbimento di calcio.

## CONCLUSIONI

L'idea progettuale portata a termine nasce da un'attenta analisi della situazione sanitaria ed ambientale regionale che vede una stretta correlazione causa-effetto fra condizioni di vita e comparsa della calcolosi renale che, se non adeguatamente trattata, può comportare gravi danni alla salute umana e conseguentemente, un elevato costo sociale.

Il progetto di ricerca ha visto la messa in atto di uno studio multidisciplinare partendo dallo studio epidemiologico della nefrolitiasi in Basilicata, dalla raccolta e caratterizzazione chimico-mineralogica e petro-morfologica di più di 100 calcoli renali, fino allo studio dei fattori demografici, geo-ambientali e comportamentali influenzanti i processi di crescita dei suddetti biominerali.

L'attività scientifica condotta rappresenta un primo esempio di studio italiano sui calcoli renali ed i fattori ambientali su scala regionale.

I fattori di rischio determinati per la Basilicata potrebbero non essere ritenuti tali in altre regioni, questo perché la nefrolitiasi è una patologia multifattoriale ed il peso di ogni fattore è legato ad una combinazione di più variabili. Risulta necessario, quindi, eseguire studi con il medesimo approccio metodologico in molte altre località per confermare e/o modificare i risultati ottenuti.

L'utilizzo di un approccio statistico, per risalire all'influenza ambientale sullo sviluppo dei calcoli renali, ha consentito di determinare una serie di fattori di rischio geo-ambientali quali le basse temperature, le alte altitudini, la scarsa radiazione solare, la durezza delle acque e le caratteristiche del suolo, che consentono di delimitare le aree a rischio alla porzione appenninica della Basilicata.

Le associazioni statistiche riscontrate sono state verificate e/o perfezionate grazie all'approfondimento delle conoscenze mineralogiche, cristallografiche, morfologiche e chimiche dei calcoli renali.

In particolare, i risultati hanno consentito di assegnare ai calcoli di acido urico, che mostrano una elevata percentuale di prevalenza distribuita esclusivamente nel nord della Basilicata, dei fattori influenzanti il loro sviluppo legati prima di tutto alle abitudini alimentari come un eccesso di proteine ed un consumo di acque poco dure con basso contenuto in bicarbonati che non facilitano l'alcalinizzazione dell'urina.

Durante la *stone analysis* è stata documentata la presenza di strutture di crescita particolarmente rilevanti ai fini della comprensione dei meccanismi di formazione o che sono testimonianza delle relazioni esistenti tra minerali, nonché delle associazioni mineralogiche inusuali che sono indicatori di cambiamenti di chimismo nel sito di mineralizzazione.

Ciò ha permesso di implementare i più recenti schemi classificativi dei calcoli renali, con l'individuazione di un nuovo gruppo di calcoli formati in prevalenza da weddellite e struvite, presente in piccole o in quantità comparabili all'altra fase.

La composizione mineralogica e l'analisi della struttura interna del calcolo hanno consentito di classificare ogni calcolo, e di conseguenza ogni paziente, in più di 30 sottogruppi differenti, ognuno caratterizzato da fattori etiologici specifici utili per programmare appropriati interventi di cura e prevenzione della patologia, specie in presenza di calcoli misti che richiedono un intervento calibrato per ogni fase mineralogica presente.

Per ultimo, ma non meno importante, è stato effettuato il dosaggio di alcuni elementi chimici presenti nei calcoli renali per capirne l'importanza ed il coinvolgimento nel processo di biomineralizzazione.

I risultati raggiunti dall'attività di ricerca potranno essere di supporto agli operatori medici del settore e alle Istituzioni locali deputate alla salvaguardia della salute umana, per mettere in atto interventi di prevenzione e cura oltre che fornire informazioni aggiuntive sui fattori di rischio per la nefrolitiasi in Basilicata.

Nel dettaglio serviranno a:

- Calibrare una cura farmacologica e/o dietetica in funzione della corretta tipologia di calcolo renale che permetterà di ridurre le recidive;
- Individuare, in relazione alla composizione e struttura, la zona di nucleazione ed accrescimento dei calcoli renali che consentirà di effettuare un trattamento farmacologico più efficace;
- Monitorare e mitigare i fattori geo-ambientali considerati a rischio in alcune aree della Basilicata e per alcune tipologie di calcoli.

Le conoscenze acquisite durante questo studio potranno essere oggetto di formazione, scambio e trasferimento di competenze al personale sanitario presente presso le strutture ospedaliere locali e non ed oggetto di azioni di sensibilizzazione rivolta alla popolazione, con particolare riferimento alle zone ed ai soggetti più a rischio.

#### QUESTIONI APERTE

I risultati ottenuti con il progetto di ricerca evidenziano l'importanza di continuare lo studio dei calcoli renali ampliando ed approfondendone alcuni aspetti.

In particolare, si ritiene necessario continuare le attività messe in atto in precedenza approfondendo gli aspetti geo-ambientali di alcune aree a rischio ed estendendo l'approccio multidisciplinare adottato e lo studio epidemiologico nel tempo, sia in Basilicata che in altre regioni, con lo scopo di rafforzare le correlazioni precedentemente riscontrate tra prevalenza di nefrolitiasi e fattori geo-ambientali.

Continuare la raccolta e caratterizzazione dei calcoli consentirà di migliorare il dato di percentuale di prevalenza delle diverse tipologie, sulla base di una classificazione sempre più dettagliata ed implementata con la nuova tipologia di calcoli renali.