

LA CALCOLOSI RENALE DI CALCIO. PROSPETTIVE DIAGNOSTICHE E PREVENTIVE

T. Arcidiacono¹, A. Terranegra², R. Biasion², L. Soldati², G. Vezzoli¹

¹ Unità di Nefrologia e Dialisi, Istituto Scientifico San Raffaele, Università Vita Salute, Milano

² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Milano

Calcium kidney stones. Diagnostic and preventive prospects

Kidney stone disease is one of the main causes of hospitalization in Italy. Its prevalence increased in the last century and is probably still increasing. The pathogenesis of the disease is not known, although two main theories have been elaborated. The first hypothesizes that hydroxyapatite deposition in the interstitium of the renal papillae (Randall's plaque) precedes urinary calcium oxalate precipitation on the ulcerated surface of the papilla to form a stone. The second presumes the tubular lumen of Bellini's duct to be the site where calcium-oxalate salts precipitate to form the nucleus for stone formation within the urinary tract.

These pathogenetic processes may be favored by different dietary and genetic factors. The genes involved are not known, although many studies have been performed. Polymorphisms of genes coding for the vitamin D receptor, calcium-sensing receptor, interleukin-1 receptor antagonist, and urokinase were found to be associated with kidney stones, but these results have not been replicated. Different nutrients are suspected to predispose patients to calcium kidney stone disease. A high intake of animal proteins, sodium, vitamin C and oxalate has been implicated in stone formation, whereas calcium, alkalis and phytate may have a protective effect.

The prevention of calcium stone formation is based on the recognition of risk factors like those already mentioned here. Furthermore, a family history of kidney stones may be useful in identifying subjects predisposed to become calcium stone formers. However, the expectations of the scientific community are turned to the advances in genetics and to the findings of genetic studies, which may provide diagnostic tools and criteria to define the risk profile of the single individual. (G Ital Nefrol 2007; 24: 535-46)

KEY WORDS:

Calcium,
Kidney stones,
Oxalate,
Randall's plaque

PAROLE CHIAVE:

Calcio,
Calcolosi renale,
Ossalato,
Placca di Randall

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Giuseppe Vezzoli
Unità di Nefrologia e Dialisi
IRCCS Ospedale San Raffaele
Via Olgettina, 60
20132 Milano
e-mail: vezzoli.giuseppe@hsr.it

I dati epidemiologici ad oggi disponibili dimostrano che la calcolosi renale ha una elevata frequenza nella popolazione, tanto da essere fra le tre principali cause di ricovero in ambito nefro-urologico, insieme alla ipertrofia prostatica e alla insufficienza renale cronica (Tab. I). I dati ISTAT relativi al 1994, indicano che in Italia l'incidenza della calcolosi è pari a 1.68 nuovi casi per 1000 abitanti, con un totale di 95000 nuovi casi/anno, mentre la prevalenza risulta di 17/1000 abitanti, pari a 974000 pazienti calcolotici. Come è ben noto, queste frequenze sono aumentate nel corso degli ultimi anni. Dal 1995 ad oggi i ricoveri ospedalieri per calcolosi si sono attestati intorno a 100000 all'anno con 12000 interventi chirurgici, 50000 interventi ESWL, e una spesa annua ospedaliera di

250 milioni di euro circa. I ricoveri ospedalieri erano 60000 nel 1988 (dati ISTAT).

Il più recente studio epidemiologico Italiano, condotto in una cittadina del milanese, ha osservato valori di prevalenza superiori a quanto registrato dall'ISTAT: dal 1986 e al 1998 la prevalenza di calcolosi era aumentata dal 6.8 al 10.1% negli uomini e dal 4.9 al 5.8% nelle donne (1). In questo studio l'incidenza risultava di 4 casi su 1000 abitanti (6/1000 negli uomini e 1.8/1000 nelle donne). Oltre ad una spiccata diffusione, la calcolosi presenta anche una elevata recidività, calcolata del 50% a 10 anni e del 75% a 20 anni (2). La calcolosi di calcio giustifica la più ampia fetta di questi malati, comprendendo il 70-80% dei casi.

Questi dati dimostrano il rilevante peso economico e

TABELLA I - LA CALCOLOSI RENALE È UNA DELLE TRE PRINCIPALI CAUSE DI RICOVERO PER MOTIVI NEFRO-UROLOGICI INSIEME ALL'INSUFFICIENZA RENALE E ALLA IPERPLASIA PROSTATICA. IL NUMERO TOTALE DI RICOVERI OSPEDALIERI IN ITALIA NEL 1999, 2001 E 2003, COMPREDENTE DAY-HOSPITAL E RICOVERI ORDINARI, VIENE RIPORTATO PER QUESTE TRE CAUSE DI DEGENZA (Dati del ministero della salute al sito http://www.ministero-salute.it/programmazione/sdo/ric_informazioni/sceltadia.jsp)

Causa ricovero	Numero Ricoveri		
	1999	2001	2003
IRC	81.728	74.020	81.753
Calcolosi	99.993	100.904	95.279
Iperplasia prostatica	65.976	72.633	73.434

sociale della calcolosi renale. La prevenzione primaria e secondaria rappresenta perciò un obiettivo cruciale per il Nefrologo, che è la figura più adatta ad affrontare i complessi e diversificati aspetti metabolici alla base della calcolosi, soprattutto della più comune calcolosi di calcio. Questo compito non si prospetta facile perché sono ancora sconosciuti molti aspetti causali della malattia ed è possibile che le cause siano molteplici e si combinino in modo diverso nei singoli casi. La calcolosi di calcio è, infatti, una patologia complessa a patogenesi multifattoriale e probabilmente eterogenea, cioè una patologia nella cui eziopatogenesi interagiscono molteplici variabili genetiche ed ambientali. Tra queste possiamo includere l'escrezione urinaria di calcio, ossalato e citrato, che vengono dosate nella pratica clinica e che come tutte le variabili quantitative hanno un substrato genetico di tipo poligenico (3, 4). Il loro valore fenotipico è però influenzato anche da diverse componenti ambientali, tra le quali la principale è probabilmente la dieta. Queste brevi considerazioni fanno intuire quanto si prospetti difficile l'esplorazione dei meccanismi che sono alla base della calcolosi renale. Nei successivi paragrafi cercheremo di descrivere i fattori di suscettibilità noti o potenziali, in modo da definire i moderni indirizzi patogenetici e clinici della calcolosi renale di calcio.

LE IPOTESI PATOGENETICHE

La precipitazione salina nelle urine è il meccanismo di base attraverso il quale si forma un calcolo renale di calcio (5). Resta però ancora da spiegare come questo avvenga e attraverso quali fasi. Le prevalenti teorie patogenetiche individuano nell'interstizio renale o nel lume tubulare la sede degli eventi che conducono alla formazione del calcolo (Fig. 1). La prima teoria è stata sviluppata sulla base dell'ipotesi che Randall aveva proposto negli anni '40. Secondo Randall il calcolo di ossalato si sviluppa su depositi interstiziali di idrossia-

patite posti sulla superficie delle papille renali, definiti oggi come "placche di Randall" (6). A conferma di questa ipotesi, recenti studi endoscopici hanno osservato come nei pazienti con calcoli di calcio idiopatici i calcoli di ossalato fossero adesi alle papille renali, in aree dove la superficie della papilla era ulcerata ed era sede della placca di Randall (7). L'esame istologico ha poi dimostrato che le placche di Randall erano composte da depositi di idrossiapatite nell'interstizio papillare. Esse avevano origine dalla membrana basale dell'epitelio del tratto discendente dell'ansa di Henle da dove si sviluppavano verso la superficie della papilla occupando l'interstizio e avvolgendo le strutture tubulari e vascolari (8, 9). Esse potevano, se molto estese, associarsi a fenomeni di sofferenza tubulare, quali atrofia e vacuolizzazione cellulare. Non erano viceversa osservati depositi calcifici intratubulari e dilatazione tubulare. In un successivo studio è stato anche osservato che i segni di sofferenza tubulo-interstiziale erano più marcati nei pazienti con calcolosi di calcio-fosfato, nei quali poteva svilupparsi necrosi cellulare, fibrosi interstiziale e glomerulosclerosi (10). Da questi risultati sembra che i sali di idrossiapatite dell'interstizio papillare, una volta esposti all'urina, possano diventare nuclei di precipitazione eterologa per l'ossalato di calcio urinario, permettendo così lo sviluppo del calcolo renale nel lume del tratto urinario.

Differentemente dai pazienti con calcolosi idiopatici, i pazienti affetti da calcolosi secondaria a malassorbimento, studiati con le metodiche endoscopiche, non presentavano placche di Randall sulle papille, bensì noduli calcifici intratubulari posti all'apice della papilla nel dotto di Bellini e composti da idrossiapatite (8). Altri piccoli depositi minerali erano trovati adesi ai tubulociti del dotto collettore, che si presentavano sofferenti e con tubuli dilatati (8). Questi risultati lasciano intuire come vi possa essere più di un possibile meccanismo patogenetico per la nefrolitiasi e ciascun meccanismo possa correlarsi con uno specifico quadro metabolico. La placca di Randall potrebbe essere la

lesione iniziale nei pazienti con calcolosi idiopatica e con escrezione di calcio normale-elevata (11). Il nodulo nel dotto di Bellini potrebbe essere la lesione iniziale nei pazienti con calcolosi ed iperossalaturia, come si osserva nelle forme secondarie a malassorbimento. In entrambi i casi un deposito di idrossiapatite farebbe da nucleo eterologo per la precipitazione del calcio-ossalato o calcio-fosfato (8).

A fianco di queste risultati, un'ampia serie di dati nell'uomo e negli animali dimostra che la precipitazione di cristalli nel lume tubulare e la conseguente sofferenza dei tubolociti sono i primi eventi che conducono allo sviluppo di calcolosi. L'ossalato sembra rivestire un ruolo fondamentale in questo meccanismo attraverso la sua intrinseca tossicità per le cellule tubulari sia quando è sotto forma di molecola libera che di cristallo (12). L'esposizione dei tubolociti all'ossalato provoca la loro vacuolizzazione, apoptosi e necrosi con caduta di detriti cellulari nel lume tubulare e l'esposizione nel lume tubulare di proteine della membrana basolaterale. Tra i detriti, soprattutto i frammenti fosfolipidici delle membrane cellulari sarebbero capaci di fare da nucleo per la precipitazione dei sali di calcio nel lume (13). Alcune proteine della membrana basolaterale come l'osteopontina sarebbero esposte sulla membrana luminale a seguito dell'insulto indotto dall'ossalato sul tubolocita e legherebbero i cristalli di ossalato provocandone la ritenzione nel lume (14). Il meccanismo della adesione e ritenzione nel lume è sostenuto anche dalle forze elettrostatiche tra le glicoproteine della membrana cellulare e i cristalli; esso favorirebbe la crescita e la aggregazione dei cristalli e la tossicità tubulare dei cristalli stessi (15). Alla fine di questo processo, i macroaggregati di cristalli formati nel tubulo, potrebbero essere trattenuti a livello del dotto di Bellini, la cui apertura nella pelvi è di diametro (10-20 μm) inferiore a quello del lume tubulare (60-100 μm), dando il via in questa sede ad un nido per lo sviluppo di un calcolo (16). Altri ricercatori hanno ipotizzato che i macroaggregati potrebbero migrare nell'interstizio e da qui dare origine al calcolo (13, 16). Indipendentemente dalla sede e dalla composizione di calcio-ossalato o calcio-fosfato, dal deposito di cristalli interstiziale o tubulare, si svilupperebbe un calcolo attraverso un processo di flogosi locale, al quale farebbe seguito l'erosione e l'ulcerazione della papilla. Il deposito di cristalli sarebbe così esposto nella via urinaria e diventerebbe nucleo di calcificazione per il calcolo vero e proprio (13).

Questi lavori hanno il merito di avere messo in rilievo la relazione tra infiammazione e calcolosi renale che potrebbe anche spiegare lo sviluppo di IRC in una parte dei pazienti con nefrolitiasi di calcio. Essi considerano però l'ossalato come il principale attore nel processo di litogenesi.

TEST DI VERIFICA

1) La placca di Randall è composta da:

- Depositi di idrossiapatite che originano dalla membrana basale del tratto discendente dell'ansa di Henle
- Depositi di ossalato di calcio che originano dalla membrana basale del tratto discendente dell'ansa di Henle
- Detriti cellulari sui quali si depositano i sali di idrossiapatite nel tubulo renale
- Depositi interstiziali di calcio lungo il nefrone
- Noduli fibrosi con un centro calcifico esposti nel lume del calice.

2) Nella patogenesi del calcolo renale:

- Il calcio è ritenuto il fattore più importante per la precipitazione dei sali nel tubulo
- L'ossalato è ritenuto il fattore più importante per la precipitazione dei sali nella placca di Randall
- Il calcio è ritenuto il fattore più importante per la precipitazione dei sali nella placca di Randall
- Il fosfato è lo ione fondamentale per la precipitazione dei sali nella placca di Randall
- Il fosfato è lo ione fondamentale per la precipitazione dei sali nel tubulo.

3) La prevalenza attuale della calcolosi renale nella popolazione Italiana è:

- Minore dell'1%
- Superiore al 10%
- Minore del 10%
- Tra il 10 e il 15%
- Superiore al 15%.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

I DETERMINANTI DIETETICI

Il calcio

All'opposto di quanto creduto fino a qualche anno fa, diversi studi hanno evidenziato in modo consistente come una dieta caratterizzata da un basso contenuto di calcio aumenti il rischio di formazione di calcoli, oltre ad aumentare anche la predisposizione alla osteopenia. Un basso apporto dietetico di calcio si verifica quando è scarso il consumo di latticini, essen-

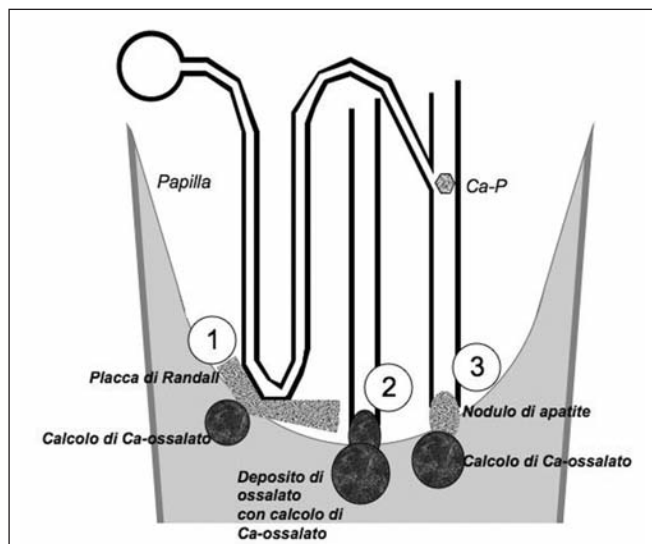


Fig. 1 - Nella papilla renale il calcolo di ossalato di calcio può svilupparsi in 3 ipotetici modi: 1) a ridosso di una placca di Randall ulcerata alla superficie della papilla che fa da nucleo di precipitazione; 2) per precipitazione di sali di calcio ossalato nel tubulo, ritenuti a livello dell'orificio papillare del dotto di Bellini ed esposti al flusso urinario per erosione della papilla; 3) per precipitazione di sali di calcio ossalato nel tubulo, su un nucleo di idrossiapatite ritenuto a livello dell'orificio papillare del dotto di Bellini ed esposto al flusso urinario per erosione della papilla.

do questi gli alimenti più ricchi di calcio. In assenza di latticini, il contenuto alimentare di calcio scende a 400 mg/die. Il rischio di sviluppo di calcolosi è di circa il 30% superiore nei soggetti che introducono quantitativi di calcio inferiore a 600 mg/die, rispetto ai soggetti con introito dietetico maggiore di 1000 mg/die (17, 18). Così pure in un trial clinico controllato e randomizzato (19) condotto su soggetti con calcolosi di calcio-ossalato recidivante e ipercalciuria, i pazienti sottoposti ad una dieta ad alto contenuto di calcio (1200 mg/die) avevano un rischio di sviluppare calcolosi del 51% più basso rispetto a coloro che assumevano un quantitativo di calcio minore di 400 mg/die. Il favorevole effetto sulla produzione di calcoli viene spiegato attraverso la capacità del calcio alimentare di combinarsi con l'ossalato nell'intestino formando sali insolubili; viene così ridotta la quota di ossalato disponibile per l'assorbimento e conseguentemente la sua escrezione (20).

Un'altra importante caratteristica che emerge dagli studi sull'argomento è il differente ruolo litogeno del calcio introdotto con gli alimenti rispetto a quello introdotto con integratori farmacologici (17). Questi ultimi, infatti, sono spesso assunti al di fuori dei pasti e ciò potrebbe determinare, da un lato un maggior picco di escrezione di calcio con le urine, dall'altro

una minore efficacia del legame del calcio con l'ossalato dietetico a livello intestinale. Entrambi questi fenomeni concorrono nel sostenere una maggiore saturazione urinaria per i sali di calcio ossalato e la tendenza alla loro precipitazione nelle urine. Questo aspetto è stato analizzato da Curhan in due diversi studi che hanno coinvolto due differenti popolazioni; nel primo, condotto su un gruppo di donne anziane, emergeva come quelle che consumavano integratori farmacologici di calcio avevano un rischio di recidiva di calcolosi del 20% superiore rispetto al gruppo di controllo (21); nel secondo, condotto invece su popolazione di giovani donne e uomini, questo stesso dato non veniva confermato (18). I risultati contraddittori di questi due studi sono confermati anche da altre ricerche; dal complesso di questi dati, si può dedurre che il rischio di calcolosi può crescere nel corso della supplementazione farmacologica con calcio, anche se in modo non prevedibile.

L'ossalato

L'ossalato urinario deriva per la maggior parte dal metabolismo endogeno di glicina, glicolato, idrossiprolina e vitamina C. A questo si aggiunge la quota che deriva dalla dieta, della quale solo il 10% (0.1-0.2 mmol) viene assorbito e successivamente filtrato ed escreto a livello renale (22). In molti soggetti affetti da nefrolitiasi di calcio, l'ossalato assorbito nell'intestino è stato trovato aumentato. Questo difetto potrebbe essere causato da una maggiore disponibilità dello ione nel lume intestinale, a seguito di una ridotta degradazione dell'ossalato da parte di agenti quali *Oxalobacter Formigenes*, la cui presenza sembra essere ridotta nell'intestino dei pazienti con calcolosi (23). A causa della scarsità di dati circa il contenuto di ossalato nei cibi, non vi sono in letteratura risultati definitivi sulla relazione tra l'ossalato dietetico e la calcolosi renale.

Nonostante le discrete quantità di ossalato contenute in frutta e verdura, gli studi epidemiologici hanno dimostrato che la frequenza di calcolosi è meno marcata nei soggetti vegetariani. Probabilmente questo dato è legato alla bassa quota di ossalato dietetico che viene assorbita, ma anche all'importanza di altri nutrienti nella litogenesi. Inoltre, più che la quantità totale escreta nelle 24 ore, potrebbero essere i picchi di concentrazione urinaria post-prandiale di ossalato ad avere particolare rilevanza nella litogenesi. Un ruolo importante nel determinare questi picchi urinari potrebbe essere giocato dalla velocità di assorbimento intestinale, oltre che dal contenuto di ossalato degli alimenti (24).

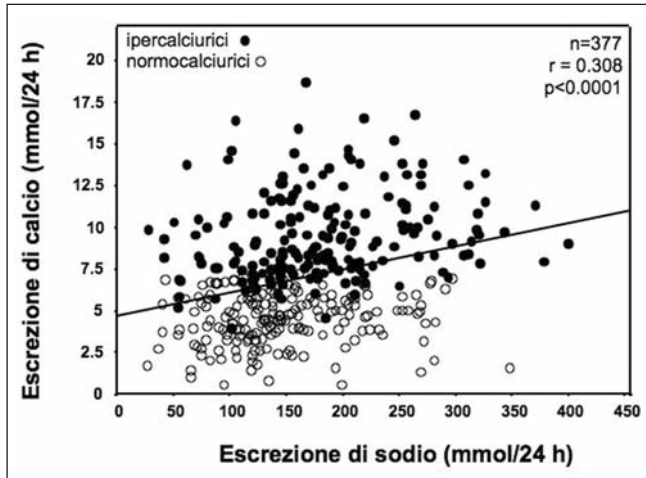


Fig. 2 - Tra l'escrezione di sodio e di calcio esiste una correlazione positiva nei pazienti con calcolosi renale di calcio, divisi in ipercalciurici e normocalciurici.

Il sodio

Diversi studi hanno ipotizzato il potenziale effetto pro-litogeno dell'elevato *intake* di sale da cucina, anche se non esiste una chiara evidenza epidemiologica che la dieta ricca di sodio-cloruro sia associata al rischio di calcolosi renale. In uno studio prospettico randomizzato, la dieta iposodica associata ad una riduzione dell'apporto proteico ha dimostrato un positivo risultato sulle recidive (19). Questo effetto può essere spiegato dall'influenza che il carico sodico esercita sul metabolismo del calcio e del citrato. Ad un elevato consumo di sale fa seguito una riduzione del riassorbimento tubulare di sodio e conseguentemente anche di calcio (Fig. 2). In modo opposto, una restrizione dietetica di sodio stimola invece il riassorbimento di calcio e determina una riduzione della calciuria (25). Un incremento di 6 g del sodio cloruro ingerito è in grado di provocare un incremento della calciuria pari a 40 mg nei soggetti sani e a 80 mg nei soggetti calcolotici ipercalciurici (26). Oltre al potente effetto calciurico, il sodio pare avere un ulteriore ruolo pro-litogeno determinando una riduzione dei livelli di citrato urinario. I meccanismi attraverso i quali questo accade non sono ancora del tutto chiariti, ma potrebbero fare seguito all'espansione del volume extracellulare che può determinare una condizione di acidosi extracellulare attraverso l'inibizione del riassorbimento prossimale di bicarbonato e della secrezione distale di protoni (27). Questi meccanismi coinvolgono anche una

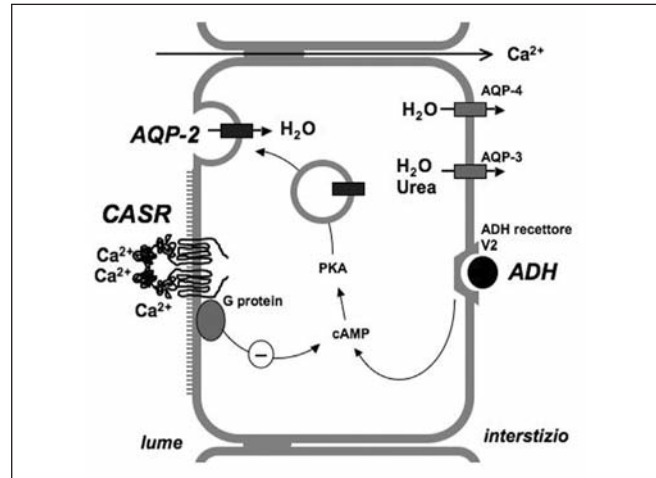


Fig. 3 - Modello della cellula principale del tubulo collettore che esprime sulla membrana luminale il calcium-sensing receptor (CaSR). Quando il CaSR è attivato dagli ioni calcio, inibisce attraverso una G protein la produzione di cAMP e quindi deprime l'attività antidiuretica dell'ADH, che usa il cAMP come segnale intracellulare. L'ADH interagisce con queste cellule attraverso il recettore V2 provocando l'espressione sulla membrana luminale dei canali dell'acqua AQP2. Il CaSR in questo tratto di nefrone ha quindi un effetto diuretico.

sostanza pro-litogena come l'acido urico, la cui escrezione urinaria aumenta nella condizione di espansione del volume extracellulare, come pure la tendenza a precipitare nelle urine.

Bisogna però rilevare che l'effetto calciurico del sodio è stato osservato solo quando l'anione associato è il cloro, come nel caso del sale da cucina, mentre viceversa il carico di bicarbonato di sodio non causa alcun incremento della calciuria o della acidosi (28). Questo dato conferma indirettamente che il ruolo del sodio alimentare è mediato dall'effetto sulla volemia.

Il potassio

L'apporto alimentare di potassio avviene principalmente con la frutta e la verdura, dove lo ione accompagna gli anioni organici, come il citrato, che vengono metabolizzati a bicarbonato nell'organismo. Il potassio urinario è perciò un indice del carico dietetico di alcali. Quando il potassio aumenta nella dieta tende ad incrementare anche l'escrezione urinaria del citrato e si associa ad una significativa riduzione dei valori di calciuria (29).

Un elevato *intake* di potassio è in grado di ridurre il rischio di calcolosi del 30-50% (17). L'introito di potassio si è dimostrato inversamente associato al rischio di sviluppo di calcoli renali negli uomini e in donne anziane, mentre lo stesso risultato non è però stato confermato nelle giovani donne (18).

Viceversa, una restrizione dietetica di potassio oltre

ad incrementare l'escrezione urinaria di calcio, determina una condizione di ipokaliemia che stimola il riassorbimento tubulare del citrato, diminuendone l'escrezione urinaria. Quest'ultimo è considerato un importante inibitore della litogenesi in quanto è in grado di formare complessi solubili con il calcio libero urinario impedendone il legame con il fosfato e l'ossalato (29). Il citrato inibisce perciò il processo di nucleazione del calcolo, inibendo la crescita e l'aggregazione dei cristalli di ossalato di calcio e fosfato di calcio.

Le proteine animali

Le proteine animali rispetto a quelle vegetali contengono una quota maggiore di amminoacidi acidi che genera un carico di acidi normalmente escreto a livello renale. L'acidificazione che ne deriva causa ad una riduzione dell'escrezione di citrato e ad un aumento di quella del calcio (29, 30). L'effetto pro-litogeno delle proteine animali sembra inoltre potenziato dall'iperfiltrazione glomerulare che il carico proteico alimentare induce. L'iperfiltrazione sarebbe, infatti, seguita da un'ipertrofia renale con aumento della sintesi di vitamina D (31). Molti studi evidenziano un aumento di calciuria, uricosuria e fosfaturia nei pazienti che assumono quantità elevate di proteine animali; secondo alcuni Autori l'assunzione di proteine animali stimolerebbe anche la escrezione di ossalato (32).

Gli studi epidemiologici condotti non hanno però ottenuto risultati univoci riguardo all'azione delle proteine animali. Un aumento del rischio di calcolosi è stato dimostrato in un gruppo di soggetti maschi con *intake* di proteine animali superiore a 75 g/die (17). Questo risultato non è emerso invece in un campione di giovani donne (18). Un altro studio ha mostrato una prevalenza di calcolosi nettamente inferiore nei soggetti vegetariani (33). Sulla base di questi risultati e del maggior consumo di carne nella popolazione, le proteine animali sono oggi ritenute uno dei maggiori responsabili dell'aumento della frequenza di calcolosi durante gli ultimi cento anni. Sono però pochi gli studi pubblicati mirati a valutare il reale peso dell'azione delle proteine sul rischio di calcolosi; una dieta a basso o alto contenuto di proteine animali è stata spesso associata a contenuti particolari di altri nutrienti quali sale o il calcio, rendendo difficile la valutazione del peso di ciascun specifico nutriente sul rischio di calcolosi.

L'acqua e altri nutrienti

L'aumento dell'*intake* idrico nei pazienti con calcolosi è un provvedimento ormai ovvio. Si è però dibattuto alcuni anni fa se la diluizione urinaria fosse realmente opportuna, poiché, oltre ai promotori, essa riduce

anche le concentrazioni degli inibitori della cristallizzazione. Uno studio prospettico randomizzato ha risolto la questione dimostrando l'effetto positivo della diluizione urinaria, poiché il numero di coloro che recidivavano durante un *follow-up* di 5 anni era minore tra i pazienti trattati con acqua rispetto a quelli senza trattamento (12% vs 27%) (34). Altri studi retrospettivi hanno inoltre dimostrato, come il volume urinario era più scarso nei pazienti recidivanti rispetto a quelli non recidivanti (35).

Vi sono poi altri nutrienti, che sembrano svolgere un ruolo interessante nella prevenzione della calcolosi. Tra questi, recentemente, è stata data particolare importanza ai fitati (inositolo epafosfato) che si trovano in alte concentrazioni in cereali, legumi e verdure, e che vengono escreti a livello urinario. Queste sostanze si legano fortemente al calcio e svolgono un forte effetto inibitorio sulla cristallizzazione del calcio ossalato e calcio fosfato (36). È stato evidenziato che i livelli urinari di fitati sono particolarmente bassi in un gruppo di soggetti calcolotici; così pure in uno studio osservazionale condotto su giovani donne i fitati dietetici sono risultati inversamente associati con l'incidenza di calcolosi (18). I fitati sono perciò sostanze che potrebbero spiegare il beneficio della dieta vegetariana sulla litogenesi.

Altri nutrienti, come la vitamina C sembra attivare la formazione dei calcoli renali: il suo metabolismo porterebbe, infatti, ad un incremento della produzione di ossalato. Un *trial* controllato ha evidenziato come la supplementazione giornaliera di 2 g di vitamina C incrementava significativamente l'escrezione di ossalato urinario. Un recente studio osservazionale ha mostrato che i soggetti che introducevano quantità di vitamina C superiore al grammo aumentavano del 40% il rischio di formare calcoli rispetto a chi ne consumavano meno di 90 mg al giorno, che è l'apporto quotidiano raccomandato (37).

Bisogna poi considerare che probabilmente anche l'apporto complessivo calorico potrebbe essere implicato nello sviluppo di calcolosi e che ricercatori Italiani hanno proposto di includere la calcolosi renale di calcio nelle manifestazioni della sindrome metabolica (38).

TEST DI VERIFICA

1) Nell'unico studio controllato e randomizzato realizzato fino ad oggi:

- La dieta povera di ossalato non ha prodotto miglioramento sulla frequenza di calcolosi nei pazienti affetti
- La dieta ipoproteica è stata più efficace della normoproteica nel prevenire la calcolosi

- c. La dieta iposodica è stata efficace nel ridurre le recidive di calcolosi
- d. La dieta iposodica e normoproteica si è dimostrata più efficace della dieta ipocalcica nel ridurre le recidive di calcolosi
- e. La dieta iposodica e normoproteica si è dimostrata più efficace della dieta ipocalcica nel prevenire il primo episodio di calcolosi.

2) L'ossalato alimentare

- a. È il fattore più importante nella determinazione dell'escrezione urinaria dell'ossalato
- b. È il fattore più importante nel ridurre l'assorbimento intestinale del calcio
- c. Viene assorbito per una quota molto bassa che non ha rilievo per la litogenesi
- d. Viene assorbito per una quota del 10% circa
- e. È lesivo per le cellule intestinali, che diventano così più permeabili al calcio.

I DETERMINANTI GENETICI

La storia familiare positiva è probabilmente il fattore di rischio più predittivo della tendenza a sviluppare calcolosi renale di calcio. Questo vale soprattutto nei soggetti di sesso maschile e di età minore di 60 anni (39). In svariati studi osservazionali, infatti, la frequenza di parenti con calcolosi era più alta tra i pazienti con calcolosi calcica che tra i soggetti non calcolotici. In uno studio Svedese, il 29.6% dei familiari di primo grado dei pazienti *stone formers* era affetto da calcolosi di calcio, mentre tra i sani questo avveniva nel 17.4% dei loro familiari di primo grado. Lo stesso dato è stato osservato in uno studio Americano (16.2% vs 5.3%) (40, 41). In uno studio Italiano di Trinchieri et al., il 45% delle donne affette e il 31% degli uomini affetti aveva una familiarità positiva per nefrolitiasi (42). Questi risultati dimostrano il substrato genetico della malattia, ma le differenze percentuali, che si osservano nelle diverse popolazioni, probabilmente sanciscono il ruolo importante dei cofattori ambientali e culturali nel modificarne l'espressione. Quale sia il peso delle due componenti, ambientale-dietetica e genetica è ancora oggetto di studio (39).

Il *pattern* di trasmissione del carattere "calcolosi" è apparso come non-mendeliano sin dai primi studi (41), che ipotizzavano una trasmissione complessa e poligenica. Diversi geni sono probabilmente coinvolti nei diversi momenti dello sviluppo del calcolo, ma a tutt'oggi non sono stati individuati con certezza, ed è oggetto di discussione, anche il modello di determinazione genetica che sostiene la calcolosi di calcio. Circa quest'ultimo aspetto, ricerche specifiche non

sono state condotte, ad eccezione di uno studio che ha valutato la trasmissione dell'iperparcalciuria negli *stone formers* ipotizzando un gene maggiore capace di spiegare da solo la maggior parte della varianza della escrezione di calcio (43). In considerazione delle caratteristiche fenotipiche, è però poco probabile che un singolo gene possa essere responsabile della calcolosi; è più verosimile che possa intervenire un insieme di geni maggiori, con rilevante effetto sul fenotipo. Goodman et al. (44), hanno elaborato un modello nel quale 3-4 geni potrebbero fornire il principale contributo alla formazione dei calcoli renali di calcio, intervenendo sulla escrezione di citrato, calcio e ossalato. Una alternativa possibile è che più geni, ciascuno incapace da solo di causare calcolosi, agiscano in modo additivo predisponendo alla malattia calcolotica. Questo modello è particolarmente sfavorevole per i ricercatori, perché con il crescere del numero dei geni coinvolti cresce anche la difficoltà di definirli, sia per il minor peso dei singoli geni sul fenotipo, sia per le interazioni ambientali o genetiche che ne possono mascherare l'effetto nei pazienti (3, 4). Lo strumento utilizzato negli studi genetici sulla calcolosi idiopatica di calcio sono stati gli studi di associazione caso-controllo o familiari nei quali veniva ipotizzato un gene-candidato e studiata la cosegregazione dei suoi polimorfismi o di altri marcatori genetici con la calcolosi. Gli studi familiari di *linkage* viceversa sono stati utili per scoprire i geni responsabili delle forme monogenetiche di calcolosi renale (S. di Dent, acidosi tubulare, ecc.), ma sono poco efficaci nell'analisi dei caratteri non-mendeliani come la calcolosi di calcio idiopatica (45, 46). I difetti alla base della calcolosi potrebbero essere il risultato della variabilità fenotipica indotta dai polimorfismi genetici non conservativi, ma potrebbe anche derivare da un difetto quantitativo dell'espressione di uno o più geni, che viene modificata dai polimorfismi delle regioni regolatrici dell'espressione genica, complicando ulteriormente la definizione del quadro al ricercatore.

Parte degli studi genetici condotti hanno considerato come candidato i geni responsabili delle forme di calcolosi renale o di iperparcalciuria a trasmissione mendeliana, nell'ipotesi che i loro polimorfismi potessero aumentare la suscettibilità alla malattia calcolotica. Il gene codificante per il canale del cloro *CLCN5* responsabile della S. di Dent, il gene di *NPT2a* sito sul cromosoma 5q35 che codifica per un trasportatore sodio-fosfato del tubulo prossimale (47), il gene *PCLN-1* che codifica per la paracellina (48) sono stati perciò analizzati. Mutazioni o polimorfismi di questi geni sono stati trovati in singoli pazienti, senza però che queste avessero rilevanza in ampie casistiche (49, 50).

Altri geni sono stati oggetto di studio perché codificavano per proteine con potenziale valore fisiopatolo-

gico. Tra queste, recentemente il *Calcium-sensing receptor* (CaSR) ha catturato le maggiori attenzioni. Distribuito lungo tutto il nefrone, esso è in grado di "sentire" la concentrazione extracellulare di calcio e di modulare il riassorbimento di acqua, sodio e calcio lungo il tubulo, attraverso diverse vie di *signalling* intracellulare. Nel collettore riduce il riassorbimento dell'acqua impedendo l'espressione del canale dell'acqua (acquaporina 2) sulla membrana apicale delle cellule principali (Fig. 3). Negli stessi segmenti tubulari, inibisce il riassorbimento di sodio interferendo con il riciclo del potassio attraverso i canali specifici. Nel tratto ascendente spesso dell'ansa e nel convoluto distale inibisce il riassorbimento del calcio attraverso una inibizione dell'attività della pompa del calcio e del trasporto paracellulare di calcio (51). La concentrazione di calcio nell'interstizio midollare e papillare, già elevata grazie al meccanismo di concentrazione controcorrente, potrebbe ulteriormente incrementarsi nel periodo postprandiale e giocare così un ruolo importante nella calcolosi anche grazie all'associata stimolazione del CaSR che potrebbe diminuire il riassorbimento di acqua nel tubulo collettore accentuando ancora di più l'osmolarità interstiziale. Verrebbero così abnormemente amplificate le condizioni che favoriscono la precipitazione salina nell'interstizio a formare la placca di Randall o altri possibili depositi (52). Nonostante queste aspettative, gli studi di associazione in coppie di fratelli e caso-controllo tra i *locus* del CaSR (3q13-21) e la calcolosi hanno dato risultati negativi (53, 54), anche se uno di questi ha trovato un'associazione positiva tra il polimorfismo Arg990Gly dell'esone 7 del gene e l'iperparatiroidismo (53). Due studi nei soggetti con iperparatiroidismo primitivo però hanno osservato che i pazienti portatori dell'allele glicina al polimorfismo Arg990Gly svilupparono valori più elevati di calciuria e calcoli renali con frequenza significativamente più alta rispetto ai pazienti con l'allele arginina (55, 56). Questi risultati sembrano confermare l'importanza dei polimorfismi genetici del CaSR e della elevata escrezione di calcio per lo sviluppo di calcolosi almeno nell'iperparatiroidismo primitivo.

Un secondo gene che ha ottenuto le attenzioni di molte ricerche, è stato il recettore della vitamina D (VDR, *locus* 12q12-14), che media l'effetto della vitamina D nelle cellule *target*. Diversi studi caso-controllo hanno osservato l'associazione della calcolosi con i polimorfismi genetici dell'introne 8 ed esone 9 dell'estremità 3' del gene VDR oppure con il polimorfismo del codone di inizio della trascrizione (57, 58). Altri studi, viceversa, non hanno osservato alcuna di queste associazioni (59, 60). Altri studi ancora, hanno trovato che le varianti alleliche di due polimorfismi genetici dell'estremo 3' del gene VDR si associavano nella

popolazione Italiana ad un andamento più severo della malattia, poiché i pazienti con questi genotipi presentavano familiarità più frequentemente positiva, urine più soprassature di calcio-ossalato, minore età di insorgenza e valori di citraturia più bassi (61, 62). È perciò possibile che questo gene intervenga sul fenotipo determinando l'andamento della malattia, anche se il livello di intervento non è ancora chiaro.

A questi studi se ne sono aggiunti altri che non sono mai stati confermati da successivi lavori. Uno di questi studi ha osservato una relazione della calcolosi di calcio con i polimorfismi genetici dell'antagonista del recettore della interleukina-1 (cromosoma 2q) mettendo in evidenza la relazione tra la flogosi e lo sviluppo di calcolosi (63). Altri hanno trovato una relazione della calcolosi con il gene dell'urochinasi (64), della E-caderina (66), e con il fattore di crescita endoteliale (65). Molte altre ricerche sono state condotte su altri genicandidati senza che nessuna ottenesse risultati positivi nell'uomo. Per brevità non citiamo questi studi e rimandiamo agli articoli di revisione già pubblicati per un loro esame.

Sono stati anche sviluppati ceppi di animali con calcolosi di calcio. Il primo è un ceppo di ratti ipercalcemici (67) che hanno un *locus* al cromosoma 1 associato alla calcolosi (68). Altri due esempi sono i topi knock-out che non esprimono il gene *Slc26a6* o della caveolina-1. Il gene *Slc26a6* codifica per lo scambiatore cloro-ossalato e limita l'assorbimento dell'ossalato nell'intestino (69). La caveolina-1 è la molecola strutturale delle caveole, che sono invaginazioni della membrana cellulare nelle quali hanno origine i segnali per diverse importanti attività cellulari (70).

TEST DI VERIFICA

1) Il *pattern* di trasmissione genetica della calcolosi renale di calcio idiopatica è:

- Poligenica
- Autosomica dominante
- Autosomica dominante a penetranza variabile
- Recessiva autosomica
- Variabile nelle diverse regioni e nazioni.

2) Il *calcium-sensing receptor*:

- È espresso nel tubulo prossimale, dove inibisce il riassorbimento di sodio
- È espresso nel tubulo distale, dove attiva il riassorbimento di calcio
- Non è espresso nel tubulo distale
- È espresso nel tubulo collettore, dove inibisce il riassorbimento di acqua
- È espresso nel tubulo connettore, dove inibisce il riassorbimento di fosfato.

3) I polimorfismi del gene del recettore della vitamina D:

- a. Sono stati trovati associati alla calcolosi renale di calcio in tutti gli studi condotti
- b. Non sono stati trovati associati alla calcolosi renale di calcio in tutti gli studi condotti
- c. Non sono stati studiati nella calcolosi
- d. Sono stati trovati associati alla calcolosi solo nella popolazione Asiatica
- e. Sono stati trovati associati all'andamento clinico della calcolosi di calcio in due studi Italiani.

QUALI INDICAZIONI PREVENTIVE E QUALI PROSPETTIVE DIAGNOSTICHE?

I dati epidemiologici ed economico sanitari che abbiamo elencato propongono la necessità di una seria prevenzione primaria e secondaria della calcolosi renale di calcio, i cui indirizzi siano basati sulle conoscenze fisiopatologiche ed eziologiche. Come abbiamo visto, però siamo ancora lontani dall'aver individuato con certezza gli indicatori di predisposizione alla malattia, poiché non conosciamo nei dettagli i meccanismi eziopatogenetici della nefrolitiasi. Tuttavia, i dati sino ad oggi raccolti hanno contribuito a fare crescere in modo sostanziale le nostre conoscenze, ponendo dei buoni fondamenti per le prossime ricerche e per tracciare alcune linee di condotta.

Il fattore che più di ogni altro può oggi indicare la predisposizione alla produzione di calcoli renali di calcio è la familiarità positiva per calcolosi calcica (39). Sono i soggetti giovani che non hanno sviluppato calcolosi, ma con familiari affetti che più di ogni altro vanno sorvegliati e studiati per gli altri fattori di predisposizione. Ovviamente l'altra categoria di soggetti da sorvegliare sono coloro che hanno già prodotto un calcolo.

Il primo elemento da valutare è l'*intake* di fluidi, che a scopo preventivo deve essere di almeno 2 litri di acqua al giorno, in modo da garantire altrettanta diuresi. Secondo dati Americani, il rischio relativo di calcolosi comincia e ridursi quando l'apporto idrico è di almeno 1700 cc/24 h: del 5% tra 1650 e 2050 cc, dell'11% tra 2050 e 2350 cc, del 29% sopra 2350 cc (17). La misura del volume urinario fornisce perciò oggi un criterio clinico tanto banale, quanto necessario per la valutazione del rischio litogeno.

Un secondo elemento è l'*intake* di proteine animali. La riduzione dell'apporto di proteine animali compensato dall'aumento delle non-animali è un provvedimento che viene oggi proposto nei pazienti con calcolosi e che potrebbe essere utile consigliare ai soggetti predi-

sposti ma non ancora affetti. L'apporto proteico totale dovrebbe essere di 0.8-1 g/kg *die* e può essere stimato mediante il dosaggio dell'urea urinaria e dei solfati urinari nelle 24 ore. La formula [urea urinaria x 0.18 + 13], dove l'urea è espressa in $\mu\text{moli}/\text{die}$, permette la stima dell'*intake* proteico in g/*die*. Non è però noto un valore soglia di *intake* proteico, oltre il quale il rischio di urolitiasi diventi significativo.

L'introduzione alimentare di calcio dovrebbe essere mantenuta intorno a 1 g negli uomini adulti fino 65 anni e nelle donne in premenopausa, per salire a 1.5 g negli uomini oltre i 65 anni e nelle donne in menopausa. Queste indicazioni sono state proposte dalla *consensus conference* del 1994 avente come obiettivo la prevenzione della osteoporosi (71), ma possono essere usate per la calcolosi di calcio, vista la prevalenza di osteopenia in questi pazienti e la funzione preventiva che ha l'assunzione di cibi ricchi di calcio nella calcolosi. Alcuni Autori preferiscono però rimanere poco al di sotto di questi limiti (0.8 g) per evitare un eccessivo incremento della calciuria. Il rischio di calcolosi comincia a crescere, secondo i dati epidemiologici Americani, quando l'*intake* di calcio è inferiore a 700 mg/*die* e diventa del 35% maggiore in chi introduce meno di 600 mg di calcio al giorno (17). Nonostante ciò alcuni centri prescrivono ancora oggi diete con restrizione dell'apporto di calcio nelle ipercalciurie assorbitive. Poiché la calciuria è poco correlata all'introduzione alimentare, l'*intake* può essere esplorato solo con l'indagine alimentare.

Nutrienti ad effetto pro-litiasico, il cui *intake* è facilmente esplorabile sono il sodio ed il cloro. La quantità di sodio e cloro nelle urine di 24 ore sono lo specchio fedele dell'introduzione di sale da cucina e quindi dovrebbe essere usata come indice clinico per la sorveglianza dei pazienti con calcolosi. Il loro apporto deve essere ridotto al di sotto di 3 g al giorno (130 $\mu\text{moli}/\text{die}$), per limitare la tendenza pro-litogena dell'ambiente urinario.

Per quanto riguarda l'ossalato, vista la scarsa percentuale assorbita l'obiettivo della prevenzione è di evitare i picchi dietetici e di escrezione, cioè i cibi particolarmente ricchi di ossalato come per esempio spinaci, bietole, cioccolato e nocchie che contengono più di 100 mg di ossalato per etto di prodotto. Il suo apporto dietetico non può purtroppo oggi essere stimato con indici laboratoristici ed anche in questo caso sarebbe utile l'analisi alimentare, pur con i limiti dello strumento.

In conclusione, le attuali tendenze propongono che la popolazione potenzialmente calcolotica va orientata ad una dieta iposodica, più ricca in vegetali a meno di carne. Paradossalmente i cibi più ricchi di ossalato sono anche quelli che vengono favoriti nella calcolosi. Probabilmente, a fianco dell'ossalato i vegetali conten-

gono sostanze come gli alcali o i fitati o forse altre sostanze non note che una volta escreti nelle urine hanno una attività antilithogena. Il peso di questi nella litogenesi è probabilmente superiore a quello pro-litogenico dell'ossalato. Non esistono indici sicuri dell'assunzione di vegetali, tranne indici indiretti quali l'escrezione urinaria di potassio e di citrato; il primo contenuto in frutta e verdure, il secondo influenzato del carico di alcali che accompagna i vegetali.

Quelle riportate fino ad ora, sono indicazioni semplici, ma di grande importanza dato che l'intervento non-farmacologico produce una sostanziale riduzione delle recidive, stimata del 60% a 5 anni (72). L'intervento non-farmacologico è facilmente praticabile e l'aderenza alle prescrizioni facilmente verificabile mediante la misura dei parametri urinari descritti. Tuttavia, le indicazioni proposte sottolineano quanto sia importante nella pratica clinica il contributo del dietista oppure l'acquisizione da parte del Nefrologo di competenza in campo dietologico. La prima delle due strade è secondo noi realisticamente più realizzabile, ma prevede che una nuova figura lavori con il Nefrologo nei centri che si occupano di calcolosi renale.

Le aspettative per individuare i soggetti predisposti alla calcolosi di calcio sono però legate soprattutto all'analisi genetica. In realtà la realizzazione di questa aspettativa si prospetta come difficile a breve termine. L'eterogeneità della malattia rende molto complicata l'individuazione dei geni, ma anche dei fenotipi associati e specificatamente coinvolti (calcolosi con ipocitraturia, con ipercalciuria, senza alterazioni metaboliche, ecc.). Probabilmente le possibilità di riuscita sono legate a studi di ampie dimensioni numeriche, nei quali l'associazione genotipo-fenotipo venga analizzata sia in studi caso-controllo che familiari (considerando i fratelli oppure i genitori del probando). Un punto critico è la scelta a priori dei geni-candidato che potrebbero essere estranei ai reali meccanismi eziopatogenetici. Una indagine dell'intero genoma nelle famiglie potrebbe fornire indicazioni sui loci genetici coinvolti, ma le possibilità di successo di questa strategia sono scarse, visto il probabile basso peso dei singoli geni sulla determinazione del fenotipo. Siamo perciò legati allo sviluppo delle conoscenze fiopatologiche, che dovranno crescere per consentirci di identificare i fattori più rilevanti da includere nelle indagini

genetiche. Sulla base di queste indicazioni e dei risultati delle prossime ricerche è possibile che siano disponibili tra qualche tempo dei test laboratoristici che permetteranno di definire nei soggetti interessati il profilo di rischio di calcolosi renale di calcio. Questi test si baseranno probabilmente sulla lettura degli aplotipi genetici, cioè della combinazione dei polimorfismi dei diversi geni coinvolti; i loro risultati definiranno un profilo di rischio che sarà ancor meglio definito una volta che i risultati genetici saranno accoppiati ai dati dietetici. Insieme l'informazione genetica e dietetica forniranno un quadro completo del rischio litogeno a cui un individuo è sottoposto.

RIASSUNTO

La nefrolitiasi rappresenta una delle principali cause di ospedalizzazione nel nostro Paese con una prevalenza in continuo aumento negli ultimi anni. Non sono chiari i meccanismi patogenetici della malattia, pur essendo state avanzate diverse ipotesi. Una prima teoria ipotizza che il calcolo si sviluppi su depositi interstiziali di idrossiapatite posti sulla superficie delle papille renali (placche di Randall); questi diventerebbero nuclei di precipitazione per l'ossalato di calcio e porterebbero alla formazione del calcolo nel lume del tratto urinario. Una seconda teoria vede nel dotto di Bellini la sede di precipitazione del calcio ossalato con formazione di un nucleo per l'aggregazione del calcolo. Questi eventi patogenetici possono essere favoriti da diversi fattori genetici ed ambientali. Ad oggi non vi sono risultati conclusivi circa i geni implicati. Alcuni studi hanno evidenziato una associazione della calcolosi con polimorfismi dei geni del recettore della vitamina D, del calcium-sensing receptor, dell'antagonista del recettore dell'inteleuchina-1, dell'urochinasi, ma questi risultati non sono stati confermati. Fra i vari nutrienti proteine, sodio, vitamina C e ossalato sono risultati predisporre alla calcolosi calcica; viceversa calcio, alcali e fitato sembrano avere un effetto protettivo.

La prevenzione della malattia è basata sul riconoscimento di questi fattori di rischio. Inoltre la storia familiare positiva è probabilmente il fattore di rischio più utile per individuare i soggetti predisposti alla malattia.

Le prospettive future sono rivolte all'elaborazione di studi genetici, che possano fornire i mezzi diagnostici ed i criteri per individuare il profilo di rischio nei singoli individui.

BIBLIOGRAFIA

1. Trinchieri A, Coppi F, Montanari E, et al. Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. *Eur Urol* 2000; 37: 23-5.
2. Trinchieri A, Ostini F, Nespoli R, et al. A prospective study

of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. *J Urol* 1999; 162: 27-30.

3. Colhoun HM, McKeigue PM, Smith JD. Problems of reporting genetics associations with complex outcomes. *Lancet*

- 2003; 361: 865-72.
4. Manolio TA, Bailey-Wilson JE, Collins FS. Genes, environment and the value of prospective cohort studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 812-20.
 5. Kavanagh JP. Supersaturation and renal precipitation: the key to stone formation? *Urol Res* 2006; 34: 81-5.
 6. Randall A. The etiology of primary renal calculus. *Int Abstr Surg* 1940; 71: 209.
 7. Williams JC Jr, Matlaga BR, Kim SC, et al. Calcium oxalate calculi found attached to the renal papilla: preliminary evidence for early mechanisms in stone formation. *J Endourol* 2006; 20: 885-90.
 8. Evans AP, Lingeman JE, Coe FL, et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest* 2003; 111: 607-16.
 9. Vermooten V. The origin and development in the renal papilla of Randall's calcium plaques. *J Urol* 1942; 48: 27.
 10. Evans AP, Coe FL, Ritling SR, et al. Apatite plaque particles in inner medulla of kidneys of calcium oxalate stone formers: osteopontin localization. *Kidney Int* 2005; 68: 145-54.
 11. Low RK, Stoller ML, Schreiber CK. Metabolic and urinary risk factors associated with Randall's papillary plaques. *J Endourol* 2000; 14: 507-10.
 12. Khan SR, Shevock PN, Hackett R. Urinary enzymes and CaOx urolithiasis. *J Urol* 1989; 142: 846-9.
 13. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys, results of human, animal model and tissue culture studies. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8: 75-88.
 14. Khan SR, Johnson JM, Peck AB, et al. Expression of osteopontin in rat kidneys: induction during ethylene glycol induced calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 2002; 168: 1173-81.
 15. Kok DJ, Khan SR. Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. *Kidney Int* 1994; 46: 847.
 16. Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res* 2006; 34: 86-91.
 17. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* 1993; 328: 833-8.
 18. Curhan GC, Willett WC, Knight EL, et al. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women nurses' health study II. *Arch Int Med* 2004; 164: 885-91.
 19. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* 2002; 346: 77-84.
 20. Lemann J Jr. Composition of the diet and calcium kidney stones. *N Engl J Med* 1993; 328: 880-1.
 21. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, et al. Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med* 1997; 126: 497-504.
 22. Holmes RP, Assimos DG. The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. *Urol Res* 2004; 32: 311-6.
 23. Mittal RD, Kumar R. Gut-inhabiting bacterium *Oxalobacter formigenes*: role in calcium oxalate urolithiasis. *J Endourol* 2004; 18: 418-24.
 24. Baggio B, Gambaro G, Marchini F, et al. An inheritable anomaly of red-cell oxalate transport in "primary" calcium nephrolithiasis correctable with diuretics. *N Engl J Med* 1986; 314: 599-604.
 25. Muldowney FP, Freaney R, Moloney MF. Importance of dietary sodium in the hypercalciuria syndrome. *Kidney Int* 1982; 22: 292-6.
 26. Massey LK, Whiting SJ. Dietary salt, urinary calcium, and kidney stone risk. *Nutr Rev* 1995; 53: 131-9.
 27. Sakhaee K, Harvey JA, Padalino PK, et al. The potential role of salt abuse on the risk for kidney stone formation. *J Urol* 1993; 150: 310-2.
 28. Muldowney FP, Freaney R, Barnes E. Dietary chloride and urinary calcium in stone disease. *Q J Med* 1994; 87: 501-9.
 29. Taylor EN, Curhan GC. Diet and fluid prescription in stone disease. *Kidney Int* 2006; 70 (5): 835-9.
 30. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* 2003; 133: 855S-61S.
 31. Hess B, Ackermann D, Essig M, et al. Renal mass and serum calcitriol in male idiopathic calcium renal stone formers: role of protein intake. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1916-21.
 32. Borghi L, Meschi T, Maggiore U, Prati B. Dietary therapy in idiopathic nephrolithiasis. *Nutr Rev* 2006; 64 (7 Pt 1): 301-12. Review
 33. Robertson WG, Peacock M, Marshall DH. Prevalence of urinary stone disease in vegetarians. *Eur Urol* 1982; 8 (6): 334-9.
 34. Borghi L, Meschi T, Amato F, et al. Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: A 5-year randomized prospectivestudy. *J Urol* 1996; 155: 839-43.
 35. Strauss AL, Coe F, Deutsch L, Parks JH. Factors that predict relapse of calcium nephrolithiasis during treatment. A prospective study. *Am J Med* 1982; 72: 17-24.
 36. Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM. Inositol hexakisphosphate (InsP6) in urine: study of the relation between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* 2000; 85: 138-42.
 37. Traxer O, Huet B, Poindexter J, et al. Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factor. *J Urol* 2003; 170: 397-401.
 38. Mossetti G, Rendina D, DeFilippo G, et al. Relationship between metabolic syndrome and nephrolithiasis in a cohort of caucasian subjects from southern Italy. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2006; 3: 386-7.
 39. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, et al. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1568-73.
 40. Ljunghall S. Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects. *Br J Urol* 1979; 51: 249-52.
 41. Resnick M, Pridgen DB, Goodman HO. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* 1968; 278: 1313-8.
 42. Trinchieri A, Mandressi A, Luongo P, et al. Familial aggregation of renal calcium stone disease. *J Urol* 1988; 138: 478-81.
 43. Loreda-Osti JC, Roslin NM, Tessier J, et al. Segregation of urine calcium excretion in families ascertained for nephrolithiasis: evidence for a major gene. *Kidney Int* 2005; 68: 966-71.
 44. Goodman HO, Brommage R, Assimos DG, Holmes RP. Genes in idiopathic calcium oxalate stone disease. *World J Urol* 1997; 15: 186-94.
 45. Laird NM, Lange C. Family-based designed in the age of large-scale gene-association studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 385-94.
 46. Morton N. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *J Clin Invest* 2005; 115: 1425-30.
 47. Prie D, Huart V, Bakouh N, et al. Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter. *N Engl J Med* 2002; 347: 983-91.
 48. Kutluturk F, Temel B, Uslu B, et al. An unusual patient with hypercalciuria, recurrent nephrolithiasis, hypomagnesemia and G227R mutation of Paracellin-1. *Horm Res* 2006; 66: 175-81.
 49. Scheinman SJ, Cox JPD, Lloyd SE, et al. Isolated hypercalciuria with mutation in *CLCN5*: relevance to idiopathic

- hypercalciuria. *Kidney Int* 2000; 57: 232-9.
50. Lapointe J-Y, Tessier J, Paquette Y, et al. NPT2a gene variation in calcium nephrolithiasis with renal phosphate leak. *Kidney Int* 2006; 69: 2261-7.
 51. Ba J, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of renal mineral ion transport. *Cell Calcium* 2004; 35: 229-37.
 52. Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest* 2003; 111: 602-5.
 53. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, et al. Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2517-23.
 54. Lerolle N, Coulet F, Lantz B, et al. No evidence for point mutations of the calcium-sensing receptor in familial idiopathic hypercalciuria. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2317-22.
 55. Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, et al. Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different haplotypes of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 277-83.
 56. Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filopanti M, et al. R990G polymorphism of the calcium-sensing receptor and renal calcium excretion in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 687-92.
 57. Nishijima S, Sugaya K, Naito A, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with urolithiasis. *J Urol* 2002; 167: 2188-91.
 58. Chen WC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Tsai FJ. Association of the vitamin D receptor gene start codon Fok I polymorphism with calcium oxalate stone disease. *BJU Int* 2001; 87: 168-71.
 59. Chen HY, Hsu CD, Wu JY, Tsai FJ. No association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms with calcium oxalate stone formation. *Mol Urol* 2001; 5: 7-10.
 60. Relan V, Khullar M, Singh SK, Sharma SK. Association of vitamin D receptor genotypes with calcium excretion in nephrolithiatic subjects in northern India. *Urol Res* 2004; 32: 236-40.
 61. Mossetti G, Rendina D, Manno G, et al. The relationship of 30 vitamin D receptor haplotypes to urinary supersaturation of calcium oxalate salts and to age at onset and familial prevalence of nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2259-65.
 62. Mossetti G, Vuotto P, Rendina D, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and tubular citrate handling in calcium nephrolithiasis. *J Intern Med* 2003; 253: 194-200.
 63. Chen WC, Wu HC, Chen HY, et al. Interleukin-1beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms in patients with calcium oxalate stones. *Urol Res* 2001; 29: 321-4.
 64. Tsai FJ, Lin CC, Lu HF, Chen HY, Chen WC. Urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism is associated with urolithiasis. *Urology* 2002; 59: 458-61.
 65. Tsai FJ, Wu HC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Chen WC. Association of E-cadherin gene 3-UTR C/T polymorphism with calcium oxalate stone disease. *Urol Int* 2003; 70: 278-81.
 66. Chen WC, Chen HY, Wu HC, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is associated with calcium oxalate stone disease. *Urol Res* 2003; 31: 218-22.
 67. Bushinsky DA, Frick KK, Nehrke K. Genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 403-18.
 68. Hoopes RR, Middleton FA, Sen S, et al. Isolation and confirmation of a calcium excretion quantitative trait locus on chromosome 1 in genetic hypercalciuric stone-forming congenic rats. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1292-304.
 69. Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, et al. Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. *Nat Genet* 2006; 38: 474-8.
 70. Cao G, Yang G, Timme TL, et al. Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am J Pathol* 2003; 162: 1241-8.
 71. NIH Consensus conference. Optimal calcium intake. NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake. *JAMA* 1994; 272: 1942-4.
 72. Hoskins DH, Erickson SB, Vandenberg CJ. The stone clinic effect in patients with idiopathic calcium urolithiasis. *J Urol* 1983; 130: 1115-8.