



УДК 541.1+616.613-003.7

© 2008

Н. М. Богдан

Физико-химическое моделирование фосфатного нефролитиаза

(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)

The basic physico-chemical and biochemical parameters of the formation of phosphatic kidney stones are determined on model systems. It is established that the structures similar to kidney stones can be formed only in the simultaneous presence of fiber and mineral components, being under metastable conditions.

Имеющиеся в настоящее время представления о химизме камнеобразования в почке базируются на предположении о ведущей роли отдельного субстрата и не учитывают как форм его существования, так и влияния различных факторов на изучаемые явления. Как было показано в работах [1–6], основными факторами, способствующими (или препятствующими) образованию фосфатных камней, являются повышенные концентрации камнеобразующих компонентов Ca^{2+} , аммония (NH_4^+), неорганического фосфора Р (преимущественно в виде HPO_4^{2-} и PO_4^{3-}); повышенные значения рН мочи; недостаток защитных коллоидов; пониженное содержание ингибиторов камнеобразования — цитратов, пирофосфатов, магния, кислых мукополисахаридов (хондроитин-сульфат и гепарансульфат), аминокислот, олигопептидов и др. Однако, как показывает опыт, изменение содержания любого отдельного из перечисленных выше субстратов не приводит к образованию конкремента. Более того, наши наблюдения позволяют заключить, что на возможность формирования камня в значительной мере влияют как концентрации (и их соотношения) всех приведенных веществ, так и условия их взаимодействия.

Целью настоящего исследования является изучение физико-химических особенностей механизма образования *in vitro* кальций-фосфатных конкрементов. В работе изучено влияние природы белка, его концентрации, вида денатурирующего агента и рН среды на структуру образующихся искусственных конкрементов в системе фосфат кальция — белок — денатурирующий агент.

Оказалось, что получить осадок, по своим физико-химическим свойствам аналогичный почечным конкрементам, невозможно при наличии в реакционной среде только низкомолекулярных глобулярных белков (яичный и сывороточный альбумин), даже при более чем

10-кратном избытке камнеобразующей компоненты (раствор KH_2PO_4 с коррекцией pH системы), а также при добавлении денатурирующих агентов, варьировании pH раствора, изменении температуры системы. По-видимому, это является общим свойством низкомолекулярных глобулярных белков и может рассматриваться как проявление “защитного механизма коллоидов” — пептидов среднего молекулярного веса, которые обычно присутствуют как в моче здоровых людей [4], так и в моче некоторых нефрологических больных [5].

Эксперимент с фибриллярными белками показал, что структура образующихся осадков в системе белок — денатурирующий агент — камнеобразующий компонент и в этом случае во многом определяется не только химической природой материальных субстратов, но и условиями проведения опытов. Так, при электролитном составе растворов, аналогичном моче в норме, в условиях мягкого встряхивания реакционного сосуда, содержащего фибриноген и глобулярные белки, при варьировании pH в диапазоне от 6,5 до 8,5 образуются различные количества не реагирующих между собой белковых сгустков. За пределами этого интервала pH белковые сгустки не образуются. Причиной этому являются как увеличение растворимости минеральных камнеобразующих веществ, участвующих в образовании белковых сгустков, при $\text{pH} < 6,5$, так и щелочной гидролиз белков при $\text{pH} > 8,5$. Интервал pH 7–8 является наиболее благоприятным для образования цельного фибринового сгустка, а множественные белковые сгустки образуются преимущественно за пределами указанного диапазона pH. Кроме того, отмечено влияние pH (табл. 1) на время формирования фибриновых сгустков, которое изменяется от 1 мин ($\text{pH} \simeq 7,5$) до 2 мин на граничных значениях диапазона pH 6,5–8,5. Интересно, что в процессе последующей кальцинации фибриновых сгустков в растворе их слияние не происходит, что, по-видимому, объясняет происхождение множественных камней в почечной лоханке.

Следует отметить, что при введении в систему денатурирующих агентов фибриногена и тромбина образуются более рыхлые первичные структуры, в то время как при наличии в качестве денатурирующего агента танина, в модельных растворах образуются более плотные конкременты, по своим свойствам мало отличающиеся от естественных.

Медленная кальцинация фибриноген-тромбиновых сгустков и связанная с этим невысокая плотность образованных на их основе конкрементов является, на наш взгляд, следствием быстрого образования неоднородных исходных белковых структур, что, по-видимому, затрудняет их дальнейшую равномерную кальцинацию. Однако, плотность фибринового сгустка и, следовательно, время процесса кальцинации можно изменять, варьируя природу денатурирующего агента и его концентрацию. Так, при концентрации фибриногена и тромбина 0,2% образование сгустка происходит за 1–2 мин, в то вре-

Таблица 1. Влияние pH на скорость образования твердой фазы в системе солевой раствор — альбумин (0,2%) — фибриноген (0,2%) — танин (0,2%)

Минеральная камнеобразующая компонента	pH	Время образования твердой фазы, с	Результат эксперимента
PO_4^{3-} (0,21 г/л)	6,9	2 мин	Несколько фибриновых сгустков
	7,6	58	Несколько фибриновых сгустков, стремящихся слиться
	7,9	57	Один сгусток
	8,2	55	Несколько фибриновых сгустков, располагающихся произвольно
	8,5	110	Отдельный сгусток

мя как при наличии в реакционной среде танина время образования сгустков увеличивается до 0,4–1,5 ч. При этом в последнем случае образуется более плотный и однородный белковый сгусток, а при его кальцинации — более плотный и однородный конкремент.

Как отмечалось выше, структура фибриногенового осадка обычно гетерогенна и структурирована белковыми тяжами различной плотности. Это свойство образующегося осадка, по-видимому, является определяющим: образуется ли в конечном итоге одиночный конкремент или множественные камни (см. данные эксперимента, приведенные в табл. 1). В отличие от фибриногеновых систем, в модельной системе желатин — $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ — танин образуются более гомогенные структуры, что обусловлено гомогенностью исходного желатинового раствора. Последующее добавление денатурирующего агента и минеральной камнеобразующей компоненты в систему уплотняет и закрепляет эту структуру практически синхронно по всему объему раствора. Кроме того, гомогенность структуры желатина и его растворов позволяет осуществлять плавную регулировку как скорости, так и плотности образующегося гомогенного осадка путем варьирования концентрации танина. Это чрезвычайно важно для моделирования нефролитиаза *in vitro*. Поэтому, хотя система с фибриногеном несравненно более точно воспроизводит процесс образования почечного камня, система с менее активной желатиновой матрицей, на наш взгляд, является исключительно удобной моделью, более полно и корректно воспроизводящей все основные особенности процесса камнеобразования.

Степень кальцинации желатиновых сгустков нами изучалась по ее воздействию на растворы и взвеси $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Было установлено, что в достаточно разбавленных растворах образование конкремента или структур, ему подобных, не происходит. Однако это происходит в присутствии взвеси среднего фосфата кальция. При этом скорость седиментации и последующего образования плотного осадка определяется сродством фосфата к белку, степенью кальцинации последнего и зависит от адгезии частиц минеральной взвеси и белка, а также от размеров образующихся белково-кальций-фосфатных агрегатов. Поэтому динамика образования осадка белок-фосфат кальция изучалась нефелометрическим методом, позволяющим следить за процессом формирования осадка.

Для этого были изучены системы, содержащие желатин и $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, при различных условиях. Степень осаждения определялась по изменению оптической плотности раствора. На рис. 1, в качестве примера представлена типичная зависимость оптической плотности раствора от концентрации белкового субстрата и содержания $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ при различных рН. При этом варьировалось соотношение белка и фосфора ($C_{\text{жел}}/P_i$). При фиксированных значениях рН и содержания $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ варьирование концентрации желатина позволяет установить оптимальное отношение $C_{\text{жел}}$ к P_i , которое характеризует условия наиболее быстрого оседания взвеси. Так, даже в довольно кислых растворах (рН $\simeq 4,0$) и высоком содержании $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, равном 6 г/л, т. е. в условиях, характерных для относительно небольшой протеинурии (и отношении $C_{\text{жел}}$ к P_i , равном 1,60), может образовываться конкремент (рис. 1, кривая 1). Для достижения оптимальных условий осаждения взвеси (т. е. при меньшем содержании $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в модельной системе) необходим существенно больший избыток белка. Так, при рН $\simeq 4,0$ и содержании $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0,6 г/л, осадок образуется уже при концентрации желатина 0,8 г/л, $C_{\text{жел}}/P_i = 2 : 3$ (см. рис. 1, кривая 2).

Приведенные отношения $C_{\text{жел}}/P_i$, при которых в нашем модельном эксперименте образовывался осадок, практически совпадают с характерными для больных с кальций-фосфатными камнями. Согласно литературным данным [8], отношение концентрации общего

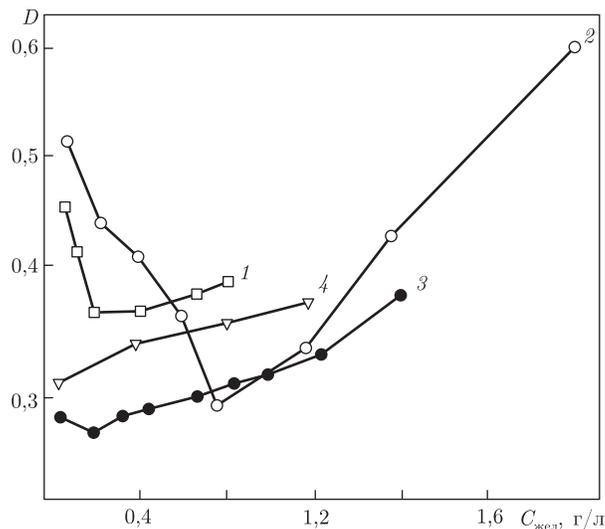


Рис. 1. Зависимость оптической плотности (D) водной взвеси $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ от концентрации (C) белкового субстрата:
 1 — 6 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ацетатный буфер, pH 3,96); 2 — 0,6 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ацетатный буфер, pH 3,98); 3 — 0,2 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ацетатный буфер, pH 3,38); 4 — 0,6 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (глициновый буфер, pH 8,53)

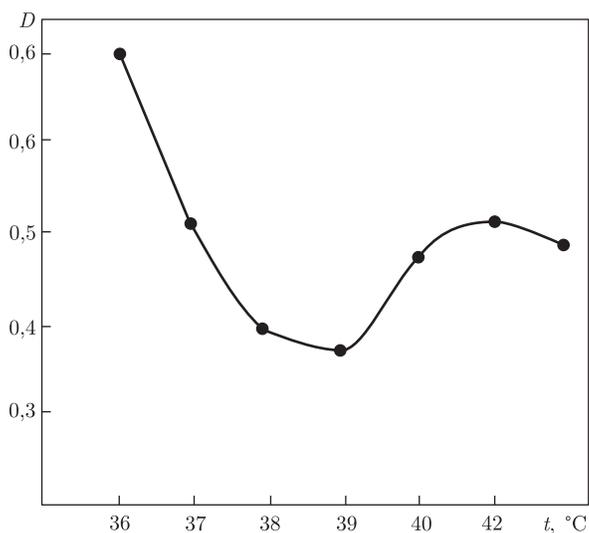


Рис. 2. Влияние температуры (t) на оптическую плотность (D) водной взвеси $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в присутствии белкового субстрата

белка к P_i , у больных фосфатным нефролитиазом лежит в интервале от 1 : 10 — 1 : 6 до 1 : 3 — 1 : 2.

Дальнейший рост концентрации белкового субстрата вызывает обратный эффект — стабилизирует взвесь $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Это происходит, вероятно, прежде всего, из-за увеличения общей вязкости раствора, которая затрудняет образование и седиментацию взвеси, что аналогично механизму “защитной функции коллоидов мочи” [8].

Изучение влияния температуры на эти процессы позволило обнаружить температурный оптимум камнеобразования, который для желатины составляет 39 °C (рис. 2).

При достаточно высокой концентрации фосфатов, в условиях сдвига рН как в кислую, так и в щелочную область образуется мелкодисперсный осадок. В этих условиях при $\text{pH} \simeq 6,5$ он состоит преимущественно из белка, а при $\text{pH} \simeq 8,5$ — образован преимущественно фосфатами. Этот факт, а также данные исследований модельных систем, содержащих глобулярный белок (альбумин), позволили установить нам наиболее общие условия появления “фосфатных диатезов”, которые, с одной стороны, определяются структурой белка, а с другой — рН среды в почечной лоханке.

Из полученных результатов следует, что образование конкрементов или мелкодисперсного осадка (“песка”) обусловлено сочетанием условий среды, а периодические изменения изученных в работе параметров среды способствуют образованию слоистых структур, аналогичных почечным камням радиально-зонального строения.

1. *Билобров В. М., Чугай А. В., Единьий Ю. Г. и др.* Биохимические особенности среды: Химический состав и строение почечных конкрементов // Структура органических соединений и механизмы органических реакций: Сб. науч. тр. — Киев: Наук. думка, 1986. — С. 126–157.
2. *Robertson V. G.* Physical chemical aspects of calcium stone formation in the urinary tract // *Ibid.* — P. 25–39.
3. *Чугай А. В.* Физико-химические основы определения химического состава почечных камней: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. — 02.00.04. — Донецк, 1989. — 18 с.
4. *Серов В. В.* Основы нефрологии. — Москва: Б. и., 1972. — Т. 1. — 191 с.
5. *Ратнер М. Я., Серов В. В.* // *Клин. медицина* — 1975. — № 8. — С. 16–22.
6. *Schulz E., Hackeschidt M., Stadie G.* Stromungetechnische Analuse des Pyelon-Molch-Sustens hinshinsichtlich der Harnsteingenese // *Urol, nephrol.* — 1982. — **75**, No 11. — P. 771–779.
7. *Bilobrov V. M., Chugaj A. V., Bessarabov V. I.* Urine pH Variation Dynamics in Healthy Individuals and Stone Formes // *Urol. Intern.* — 1900. — No 50. — P. 326–331.
8. *Миронов О. Л.* Химический состав почечных камней и фракционный состав белков сыворотки крови и мочи: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. — 02.00.04. — Донецк, 1991. — 18 с.

*Институт физико-органической химии
и углеродимии им. Л. Н. Литвиненко
НАН Украины, Донецк*

Поступило в редакцию 06.07.2007