

Н. М. Богдан<sup>1</sup>, Д. С. Степанова<sup>1</sup>, С. Л. Богза<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Інститут органічної хімії НАН України, Україна  
02094, м. Київ, вул. Мурманська, 5. E-mail: n\_bogdan@email.ua<sup>2</sup> Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України, Україна

## Оптимізація процесу розчинення фосфатних конкрементів нирки людини *in vitro*

**Мета.** Дослідити вплив фізико-хімічних параметрів літолітичних композицій на ступінь розчинення фосфатних конкрементів.

**Результати та їх обговорення.** Вивчено ряд факторів, що впливають на ефективність застосування літолітичних композицій при розчиненні фосфатних ниркових конкрементів. Показано, що при підвищенні температури розчину вище 38,5°C збільшення швидкості розчинення мінеральної складової і денатурація білкової матриці конкременту є конкурентними процесами. Встановлено, що ступінь розчинення каменя при збільшенні швидкості його омивання збільшується лінійно. Визначено оптимальні значення температури, швидкості подачі розчину і концентрації комплексу для розчинення ниркових конкрементів *in vivo* з урахуванням фізіологічних можливостей нирки.

**Експериментальна частина.** В експерименті використано 73 нативних, видалених оперативним шляхом конкременти. Шаруватість каменя візуалізували шляхом забарвлення барвником Кумасі R-250. Хімічну і структурну однорідність фосфатних конкрементів визначали за допомогою аналізу їх інфрачервоних спектрів. ІЧ-спектри отримано на спектрофотометрі Specord M-80 у таблетках KBr. Для контролю рН середовища використовували прилад ION 700 (Eutec Instruments).

**Висновки.** Показано, що з урахуванням фізіологічних можливостей нирки температура розчинів для літолізу не повинна перевищувати 37,5°C, оптимальна швидкість подачі розчину становить 5 мл/хв, а ефективна концентрація комплексу – 0,02–0,20 моль/л.

**Ключові слова:** нирковий конкремент; літоліз; температура; швидкість літолізу; концентрація комплексу

**N. M. Bogdan<sup>1</sup>, D. S. Stepanova<sup>1</sup>, S. L. Bogza<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine<sup>2</sup> L. M. Litvinenko Institute of Physical Organic and Coal Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine

### Optimization of the process of dissolution of phosphate calculi of the human kidney *in vitro*

**Aim.** To study the influence of physicochemical parameters of litholytic compositions on the degree of dissolution of phosphate calculi.

**Results and discussion.** A number of factors affecting the effectiveness of litholytic compositions on dissolution of phosphate renal calculi have been studied. It has been shown that with increasing the temperature of the solution above 38.5°C the increase of the dissolution rate of the mineral component and denaturation of the protein matrix of the calculi are competitive processes. It has been determined that the degree of litholysis while increasing the speed of the calculus washing increases linearly. The optimal values of temperature, solution feed rate and complexon concentration for dissolution of renal calculi *in vivo* have been determined taking into account the physiological capabilities of the kidney.

**Experimental part.** 73 native, surgically removed calculi were used in the experiment. The stratification of the calculus was visualized by staining with Kumassi R-250. The chemical and structural homogeneity of phosphate calculi was determined by analyzing their infrared spectra. IR spectra were obtained on a Specord M-80 spectrophotometer in KBr tablets. An ION 700 instrument (Eutec Instruments) was used to control the pH of the medium.

**Conclusions.** It has been shown that taking into account the physiological capabilities of the kidney the temperature of litholysis solutions should not exceed 37.5°C, the optimum feed rate of the solution is 5 mL/min, and the effective complexon concentration is 0.02–0.20 mol/L.

**Key words:** renal calculus; litholysis; temperature; litholysis rate; complexon concentration

**N. M. Bogdan<sup>1</sup>, D. S. Stepanova<sup>1</sup>, S. L. Bogza<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> Институт органической химии НАН Украины, Украина<sup>2</sup> Институт физико-органической химии и углехимии им. Л. Н. Литвиненко НАН Украины, Украина

### Оптимизация процесса растворения фосфатных конкрементов почки человека *in vitro*

**Цель.** Исследовать влияние физико-химических параметров литолитических композиций на степень растворения фосфатных конкрементов.

**Результаты и их обсуждение.** Изучен ряд факторов, влияющих на эффективность применения литолитических композиций при растворении фосфатных почечных конкрементов. Показано, что при повышении температуры раствора выше 38,5°C увеличение скорости растворения минеральной составляющей и денатурация белковой матрицы конкремента являются конкурентными процессами. Установлено, что степень растворения камня при увеличении скорости его омывания увеличивается линейно. Определены оптимальные значения температуры, скорости подачи раствора и концентрация комплексона для растворения почечных конкрементов *in vivo* с учетом физиологических возможностей почки.

**Експериментальна частина.** В експерименті використано 73 нативних, удалених оперативним путем конкремента. Слоистість каменя визуалізували путем окраски красителем Кумасси R-250. Хімічну і структурну однорідність фосфатних конкрементів визначали з допомогою аналізу їх інфрачервоних спектрів. ІК-спектри отримані на спектрофотометрі Specord M-80 в таблетках KBr. Для контролю рН середовища використовували прибор ION 700 (Eutech Instruments).

**Висновки.** Показано, що з урахуванням фізіологічних можливостей нирки температура розчинення для літолізу не повинна перевищувати 37,5°C, оптимальна швидкість подачі розчину становить 5 мл/хв, а ефективна концентрація комплексона – 0,02–0,20 моль/л.

**Ключові слова:** нирковий конкремент; літоліз; температура; швидкість літолізу; концентрація комплексона

Проблема сечокам'яної хвороби (СКХ) має надзвичайно важливе значення – це одне з найпоширеніших урологічних захворювань. Показник щорічної захворюваності на нефролітиаз у світі варіюється в межах 0,5–5% і постійно зростає [1, 2]. Перше місце в розповсюдженні займають ниркові камені, друге – камені сечоводу як наслідок виходу каменя з нирки. СКХ виявляють у будь-якому віці, але найчастіше – у працездатному (30–55 років). Вибір методу лікування залежить від багатьох факторів, але все ж таки перевага надається оперативним методам втручання (хірургічному, дистанційній літолітичній терапії (ДЛТ)), тому консервативна терапія традиційно не розглядається як альтернатива видаленню каменя [3] у практичній урології.

Вдале впровадження у клінічну практику дистанційного дроблення каменя в нирках і сечовідних каналах (ESWL) свого часу склало враження про появу методу, здатного остаточно вирішити проблему сечокам'яної хвороби. Однак з часом було показано [3, 4], що для методу ESWL характерний такий же відсоток рецидивів СКХ, як і для інших «stone-free» методів. Це сприяло формуванню думки про те, що слід суттєво розширити дослідження етіології і патогенезу цього захворювання, ініціювати пошук кількісних факторів ризику, ефективних про- і метафілактичних заходів СКХ і створення нових методів швидкої і повної евакуації каменя з нирок. На наш погляд, найбільш перспективним є поєднання ESWL і хемолітолізу [5]. Саме такий комбінований метод дозволив би значно знизити коло ускладнень і звести до мінімуму рецидивне каменеутворення.

В нашій роботі досліджено ряд факторів, що впливають на ефективність застосування літолітичних композицій при розчиненні фосфатних ниркових конкрементів: концентрація комплексону, температура і швидкість потоку літолітичного розчину у нирці та їх взаємозв'язок за різних фізіологічних значень рН середовища.

Літолітичні композиції, які застосовують у клініці, мають температуру 38°C, відповідну до температури внутрішніх органів людини. Невеликі відхилення температури розчинів викликають дискомфорт, що супроводжується ознобом, підвищенням температури тіла і т. п. Тому дослідження залежності експериментальної швидкості

розчинення конкрементів від температури розчинів було проведено для того, щоб встановити, чи помітно впливає її зміна на механізм розчинення ниркового каменя.

На рис. 1 подано залежності ступеня розчинення фосфатних конкрементів від температури літолітичного розчину. Залежності при різних значеннях рН мають практично однаковий вигляд. У всіх випадках спостерігаємо зростання швидкості розчинення конкременту в інтервалі температур 32,5–37,5°C і практично повну відсутність розчинення при температурі більше 37,5°C. Збільшення ступеня розчинення конкрементів в інтервалі температур розчину 32,5–37,5°C при рН 6–8 вказує на те, що розчинення конкрементів у даній області температур відбувається у кінетичному режимі, тобто швидкість процесу визначається хімічною взаємодією комплексону, що міститься у розчині, з катіонами конкременту. Однією з можливих причин збільшення швидкості розчинення є зменшення гідратної оболонки  $\text{Ca}^{2+}$  і як наслідок зниження енергії активації, необхідної для хелатоутворення, а також зміщення конформаційної рівноваги комплексону – етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) в активну форму, здатну до хелатоутворення. Однак, як показано в роботі [6], інтегральна швидкість розчинення конкрементів визначається як кінетикою процесу розчинення на по-

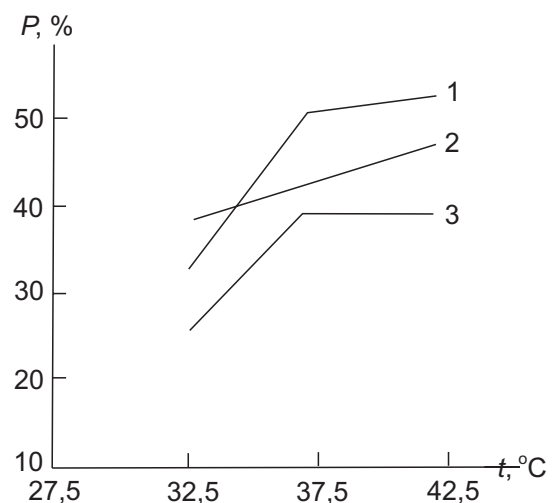


Рис. 1. Залежність ступеня розчинення фосфатних конкрементів від температури при різних значеннях рН розчину: 1 – рН 6,0; 2 – рН 7,0; 3 – рН 8,0

верхні каменя, так і умовами дифузії у розчині. Зі збільшенням швидкості утворення розчинних комплексів кальцію найбільш повільною стадією розчинення каменя стає швидкість виведення продуктів реакції вглиб розчину, внаслідок чого процес переходить у дифузійний режим. Вочевидь, це і обумовлює відсутність приросту ступеня розчинення  $P$ , % з ростом температури вище  $37,5^{\circ}\text{C}$ .

Можливо також, що при  $t > 37,5^{\circ}\text{C}$  на швидкість розчинення конкрементів впливає і ступінь денатурації білкової матриці. Зі збільшенням температури дійсно необхідна більша енергія для того, щоб вивести денатурований білок із каменя [7]. Однак залишається відкритим питання: чи є помітним ступінь денатурації білкової матриці при  $t = 42,5^{\circ}\text{C}$  і чи впливає це на його лужний гідроліз при  $\text{pH} = 8$ ? Дослідження розчинення фосфатних ниркових каменів при різних температурах літолітичного розчину показало, що при підвищенні температури розчину вище  $38,5^{\circ}\text{C}$  збільшення швидкості розчинення мінеральної складової і денатурація білкової матриці конкременту є конкурентними процесами. Зростання ступеня денатурації білків конкременту уповільнює видалення неорганічної частини від поверхні каменя, тому збільшення температури літолізу не приводить до підвищення його ефективності.

Швидкість циркуляції розчину у нирковій мисці (та *in vitro*) також чинить суттєвий вплив на дифузійні процеси, які відбуваються у поверхнево-му шарі конкременту, у зв'язку з чим важливою є не стільки об'ємна, скільки лінійна швидкість потоку рідини. Пропускна спроможність нирок є обмеженою, тому фізіологічно граничні швидкості пропускання літолітичних розчинів звичайно не перевищують 5 мл/хв. Однак з метою дослідження механізму розчинення каменя ми значно варіювали швидкість омивання конкременту в експерименті. Нами досліджено залежність розчинення фосфатного каменя від швидкості потоку розчину за різних значень  $\text{pH}$  середовища *in vitro*. Встановлено, що при збільшенні швидкості в 10 разів (від 5,0 до 50,0 мл/хв) ступінь розчинення конкрементів збільшується лише у 2,5 рази. На рис. 2 наведено залежності ступеня розчинення конкрементів (склад – переважно ортофосфат кальцію) від швидкості потоку літолітичного розчину за різних значень  $\text{pH}$ . Видно, що значення  $\text{tg}\alpha$  залежностей 1 і 2 практично не відрізняються, в той час як ступінь розчинення каменя при більших швидкостях потоку рідини збільшується лінійно до швидкості його омивання.

На рис. 2 прямі 1 та 2 описують розчинення фосфатних конкрементів, які складаються із ортофосфату кальцію, прямі 3 та 4 – каменів, що складаються із сумішей гідрофосфату і ортофосфату кальцію у різних співвідношеннях (за даними

ІЧ-спектроскопії). Порівняння даних залежностей показує, що не дивлячись на різну розчинність різноманітних форм фосфату кальцію, при високих швидкостях потоку розчину хімічні і структурні відмінності різних форм фосфатів мало впливають на швидкість їх розчинення. Мабуть, це підтверджує припущення про те, що дифузія продуктів реакції є стадією, що визначає швидкість процесу розчинення конкрементів.

Лінійна швидкість потоку літолітичного розчину в нирці залежить також від площі перетину миски і розмірів каменя і відрізняється від об'ємної. Отже, при подачі літолітичного розчину з об'ємною швидкістю 5 мл/хв швидкість потоку у вільному від каменя перетині миски *in vivo* може значно варіювати в інтервалі 5–50 мм/хв [6]. Тому збільшення швидкості подачі розчину з метою збільшення швидкості омивання конкременту до максимально можливої ( $\approx 50$  мл/хв) видається недоцільним, оскільки не призводить до будь-якого помітного зростання швидкості розчинення каменя.

Вплив концентрації комплексу на ефективність літолізу було досліджено на прикладі ди-натрієвої солі етилендіамінтетраацетату (ЕДТА, трилон Б). З робіт [6–8] випливає, що комплексон необхідно брати у деякому надлишку по відношенню до концентрації катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  у розчинах. Разом із тим концентрація комплексу має бути суттєво нижчою за його граничну розчинність, а також розчинності його металокомплексів. Окрім того, сумарна концентрація компонентів літолітичного розчину має відповідати осмолярній концентрації сечі дорослої людини, яка знаходиться в інтервалі 0,9–1,4 моль/л [4, 5].

Експериментально встановлено, що при концентрації ЕДТА 0,001–0,20 моль/л на початковому етапі літолізу ступінь розчинення конкрементів збільшується майже лінійно (рис. 3), що характерно

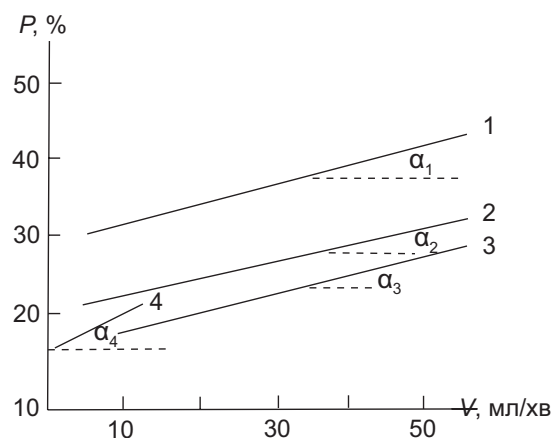


Рис. 2. Залежність ступеня розчинення фосфатних конкрементів від об'ємної швидкості літолітичного розчину:  
1 –  $\text{pH}$  7,0; 2 –  $\text{pH}$  9,0; 3 –  $\text{pH}$  7,0; 4 –  $\text{pH}$  7,0

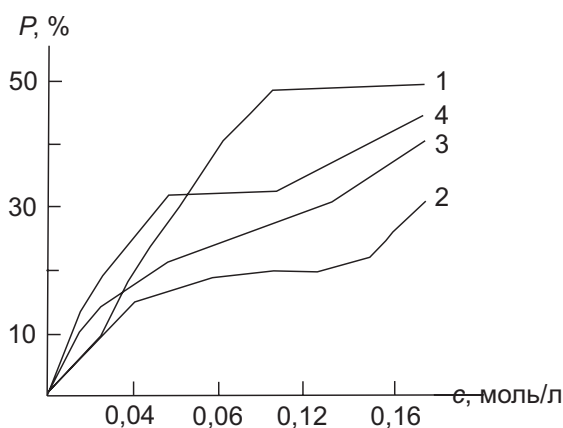


Рис. 3. Залежність ступеня розчинення фосфатних конкрементів від концентрації етилендіамінтетраацетату:  
1 – перший шар; 2 – другий шар; 3 – третій шар;  
4 – четвертий шар

для процесів, які відбуваються у кінетичному режимі. Подальше збільшення концентрації комплексу практично не впливало на швидкість розчинення каменя. Це також пояснюється тим, що процес переходить у дифузійний режим, в якому, як ми встановили, інтегральна швидкість розчинення конкрементів дійсно лімітується процесом відведення продуктів розчинення від поверхні у розчин. Показано, що оптимальна концентрація ЕДТА у літолітичному розчині має бути в інтервалі 0,02–0,20 моль/л.

#### Перелік використаних джерел інформації

- Saidakova, N. O.; Shuliak, O. V.; Shylo, V. N.; Dmytryshyn, A. A.; Kononova G. E. Urolithiasis: the state and problematic questions in rendering the specialized service to the population in Kyiv. *Urologiya* **2018**, 22 (1), 33–40. <https://doi.org/10.26641/2307-5279.22.1.2018.128123>.
- Romero, V.; Akpınar, H.; Assimos, D. G. Kidney Stones: A Global Picture of Prevalence, Incidence, and Associated Risk Factors. *Reviews in urology* **2010**, 12 (2/3): e86–e96. <https://doi.org/10.3909/riu0459>.
- Golovanova, O. A.; Frank-Kamenetskaya, O. V.; Punin, Yu. O. Specific features of pathogenic mineral formation in the human body. *Russ. J. Gen. Chem.* **2011**, 81 (6), 1392–1406. <https://doi.org/10.1134/S1070363211060442>.
- Rule, A. D.; Lieske, J. C.; Li, X.; Melton, L. J.; Krambeck, A. E.; Bergstralh, E. J. The ROKS Nomogram for Predicting a Second Symptomatic Stone Episode. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2014**, 25 (12), 2878–2886. <https://doi.org/10.1681/asn.2013091011>.
- Yachi, L.; Bennis, S.; Aliat, Z.; Cheikh, A.; Idrissi, M. O. B.; Draoui, M.; Bouatia, M. *In vitro* litholytic activity of some medicinal plants on urinary stones. *African Journal of Urology* **2018**, 24 (3), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.afju.2018.06.001>.
- Богдан, Н. М. О выборе кальций-связывающих реагентов для растворения биоминеральных патологий. *Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону* **2007**, 7, 174–181.
- Нельсон, Д.; Кокс, М. *Основы биохимии Ленинджера*. 3-е изд.; Лаборатория знаний: Москва, 2017; Т. 1.
- Gonzalez, R. D.; Whiting, B. M.; Canales, B. K. The History of Kidney Stone Dissolution Therapy: 50 Years of Optimism and Frustration with Renacidin. *Journal of Endourology* **2012**, 26 (2), 110–118. <https://doi.org/10.1089/end.2011.0380>.
- Богдан, Н. М. Физико-химические особенности образования и растворения фосфатных почечных конкрементов. Диссертация канд. хим. наук, Институт физико-органической химии и углекислоты им. Л. Н. Литвиненко НАН Украины, Донецк, 1994.
- Билобров, В. М.; Литвиненко, Л. М.; Чугай, А. В. Химический состав мочевых камней. *Урология и нефрология* **1984**, 3, 21–26.
- Kravdal, G.; Helgø, D.; Moe, M. K. Infrared spectroscopy is the gold standard for kidney stone analysis. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* **2015**, 135 (4), 313–314. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.15.0056>.

Received: 13. 03. 2020

Revised: 05. 05. 2020

Accepted: 29. 05. 2020

Роботу виконано в рамках теми Національної академії наук України «Розробка стратегії створення на основі принципів супрамолекулярної та «зеленої» хімії наноматеріалів, каталізаторів та біологічно-активних сполук із залученням викопної та відтворюваної сировини» (№ держреєстрації 0107U003004; період досліджень: 2007 – 2011 роки).