

УДК 544.02, 549.086

Роль органической компоненты в формировании патогенных минералов

О.А. Голованова^{1,а}, В.В. Корольков^{1,б}, В.А. Смолий^{2,с}¹Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского. Пр. Мира, 55а, Омск, Россия²НИИ «Нанотехнологии и наноматериалы», Южно-Российский государственный технический университет, ул. Просвещения 132, Новочеркасск, Россия^аgolovanoa2000@mail.ru, ^бkorolkov-92@mail.ru, ^сvikk-toria@yandex.ru

Статья поступила 15.10.2012, принята 5.02.2013

Наличие органического вещества в патогенных минералах привлекает внимание исследователей, поскольку есть вероятность влияния данной составляющей на процесс формирования камня. Однако в настоящее время не существует единой теории, объясняющей природу взаимодействия минеральной и органической составляющих ОМА. Проблема исследования органической составляющей патогенных агрегатов остается актуальной ввиду ее специфичности и определения в значительной степени процесса патологического фазообразования в организме человека. Материалом для комплексного анализа белковых соединений послужила коллекция камней жителей Омского региона: мочевые камни (40 образцов), зубные камни (85 образцов) и слюнные камни (14 образцов). Установлено, что содержание органических веществ белковой природы в почечных камнях зависит от минерального состава образца. По минеральному составу среди уролитов выделяют оксалатные (соли щавелевой кислоты), фосфатные (соли ортофосфорной кислоты) и уратные (мочевая кислота и ее соли) камни, однако наиболее распространены уролиты смешанного типа. Водорастворимые органические соединения с пептидной связью представлены простыми белками в уратных, уратно-оксалатных, фосфатных, фосфатно-оксалатных почечных камнях; простыми белками и гликопротеинами в оксалатных камнях. Результаты анализа показали, что содержание водорастворимых органических соединений с пептидной связью изменяется в широком диапазоне в образцах почечных камней смешанного типа. Исследование коллекции зубных и слюнных камней жителей Омского региона позволило выявить в них наличие 15 аминокислот и определить их количественное содержание. При этом установлено, что качественный набор аминокислот во всех случаях одинаков. Однако соотношение средних содержаний аминокислот для физиологических растворов и образующихся в них органоминеральных агрегатов различно. Для определения органических соединений холелитов (желчных камней) была разработана методика экстракционного извлечения. В результате детального изучения коллекции желчных камней Омского региона выявлено, что основными компонентами являются холестерин; холестерин с добавками билирубиновой компоненты и карбонаты кальция различной модификации. Полученные данные о составе и содержании органической компоненты в ОМА подтверждают гипотезу об активном ее участии в процессах кристаллизации патогенных фаз в организме человека. Выявлено наличие и определено количественное содержание аминокислот в органической компоненте почечных, зубных и слюнных камней различного минерального состава. Показано различие аминокислотных составов физиологических растворов (моча и ротовая жидкость) и образующихся в ней органоминеральных агрегатов. Сделан вывод о влиянии белковой компоненты на процессы кристаллизации патогенных фаз в организме человека.

Ключевые слова: органоминеральные агрегаты (ОМА), органическая компонента, аминокислоты, кристаллизация.

Role of organic component in pathogenic mineral formation

О.А. Golovanova^{1,а}, V.V. Korol'kov^{1,б}, V.A. Smoliy^{2,с}¹Omsk State University, 55a Mira av., Omsk, Russia²Research Institute «Nanotechnologies and Nanomaterials», South Russian State Technical University, 132, Prosveshcheniya str., Novochechassk, Russia^аgolovanoa2000@mail.ru, ^бkorolkov-92@mail.ru, ^сvikk-toria@yandex.ru

Received 15.10.2012, accepted 5.02.2013

The presence of organic matter in the pathogenic minerals attracts researchers' attention because there is the possibility of this component impact on stone formation. At present, however, there is no single theory to explain the nature of interaction of the OMA mineral and organic components. The problem of studying the organic component of pathogenic aggregates is of current interest because of its specificity and, to a large extent, the determination of the pathological process of phase formation in the human body. The material for the analysis of the complex protein compounds has become a stone collection of Omsk region inhabitants: urinary stones (40 samples), dental tartars (85 samples) and salivary stones (14 samples). It has been found that the organic content of protein nature in nephroliths depends on the sample mineral composition. As to mineral composition, the uroliths are divided into oxalate (oxalic acid salts), phosphate (ortho-phosphates), and urate (uric acid and its salts) stones, but the most common are the mixed type uroliths. Water-soluble organic compounds with peptide bond in proteins are represented by simple proteins in uric, urate-oxalate, phosphate, phosphate-oxalate nephroliths; by simple proteins and glycoproteins in oxalate stones. The results of the analysis have shown that the content of water-soluble organic compounds with a peptide bond changes in a wide range in the mixed type uroliths samples. The research

of dental and salivary stones collection of Omsk region inhabitants has allowed revealing presence of 15 amino acids and determining their quantitative content. It has also been found that the amino acids qualitative set in all cases is the same. However, the ratio of the average amino acids contents for normal saline solutions and organo-mineral aggregates formed in them is different. To determine gallstones organic compounds, the extraction technique has been developed. As a result of a detailed study of the Omsk region gallstones collection, it has been revealed that the major components are cholesterol, cholesterol with addition of bilirubin and calcium carbonate components of various modifications. The obtained data on the composition and content of the OMA organic components confirm the hypothesis of its active part in the pathogenic phase crystallization processes in the human body.

Key words: organic-mineral aggregates (OMA), organic components, amino acids, crystallization.

Введение. Наличие органического вещества в почечных камнях привлекает внимание исследователей, поскольку есть вероятность влияния данной составляющей на процесс формирования камня [1 – 9 и др.].

Известно [10 – 20 и др.], что содержание органического (неминерального) вещества в органических агрегатах (OMA), по данным разных исследователей, колеблется в значительных пределах, от единиц до десятков массовых процентов. По данным Т. Sugimoto, Y. Funae [21], органическая матрица составляет 2-3 % от общей массы камней.

По данным А.А. Кораго [3], белок составляет 58-73 % от массы органического вещества. Все белковые соединения почечных камней подразделяются на две большие группы: белки, встречающиеся в плазме крови (сероидентичные), и белки, не встречающиеся в плазме крови (несероидентичные). Содержание этих веществ в мочевых камнях примерно одинаково (50 % и немногим более) [12]. Углеводные соединения (манноза, глюкоза, N-ацетилглюкозамин и др.) в матрице камня в свободном виде не встречаются, обнаруживаются только в соединении с белком.

В настоящее время единой теории, объясняющей природу взаимодействия минеральной и органической составляющих OMA, не существует. Можно представить три варианта этого взаимодействия:

1) прямое участие органической матрицы в построение камня путем связывания компонентов минеральных фаз и инициирование собственной минерализации;

2) ингибирование и/или промотирование кристаллизации минеральных фаз путем избирательного адсорбционного взаимодействия с этими фазами. Эти варианты соответствуют активному участию органического вещества в камнеобразовании;

3) косвенное (неактивное) участие за счет патогенного образования в камнеобразующих растворах органических белковых и неорганических компонентов камней под действием одних и тех же внешних и внутренних факторов (инфекции, нарушение белкового обмена и т. д.).

В целом, из анализа литературы следует, что проблема исследования органической составляющей патогенных агрегатов остается актуальной, так как многие исследователи отмечают, что именно ее специфичность контролирует в значительной степени процесс патологического фазообразования в организме человека [10 – 20 и др.].

Экспериментальная часть. Материалом для исследований послужила коллекция камней жителей Омского региона: мочевые камни (40 образцов), полученные как путем открытого оперативного вмешательства, так и с помощью дистанционной литотрипсии; зубные камни больных генерализованным пародонтитом

(85 образцов) и слюнные камни из околоушной и подъязычной слюнных желез и их протоков (14 образцов).

В процессе работы была использована комплексная методика анализа белковых соединений в мочевых, зубных и слюнных камнях.

При изучении срезов и шлифов во всех образцах почечных камней фиксировалось наличие органической неминеральной составляющей методом качественного анализа, срезы камней обрабатывали кислым раствором сулемы – бромфеноловым синим (БФС – 0,5 г красителя бромфенолового синего, 10 г двухлористой ртути (сулема) и 20 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, непрерывно помешивая до полного растворения сулемы, затем помещают в мерную колбу вместимостью 1 литр и доводят водой до метки).

Суммарное содержание белка определяли по методу Кельдаля [22]. Данный метод включает следующие процедуры: минерализация пробы по Кельдалю, отгонка аммиака, титрование полученного дистиллята [22]. Количественное определение неминерального азота проводили для образцов, в которых отсутствуют азотсодержащие минералы (струвит и ураты).

Предел обнаружения белковых соединений при использовании данной методики – 10^{-3} % масс., относительное стандартное отклонение составило 0,02.

Для определения доли водорастворимой составляющей в белковой фракции мочевых камней было проведено усовершенствование методики фотометрического определения белков по Бенедикту [22].

Качественный и количественный аминокислотный состав почечных камней определяли методом ионообменной колоночной хроматографии (анализатор Т-339). Для анализа готовили порошкообразную среднюю пробу исследуемого образца массой 1,5 г, которую подвергали кислотному гидролизу (6 М соляная кислота) при температуре 105 °С в течение 24 часов [23]. В качестве ионообменной смолы использовали сульфированный полистирол. Пороговая чувствительность метода – 10^{-4} % масс., относительное стандартное отклонение 0,04.

Исследование аминокислотного состава зубных и слюнных камней выполнено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на аминокислотном анализаторе ААА – 39М. Образцы для анализа готовились путем кислотной деминерализации пептидных связей 6 М соляной кислотой при температуре 105 °С в течение 24 часов [23]. Разделение смеси аминокислот полученных белковых гидролизатов на индивидуальные аминокислоты проводилось в катионообменной колонке хроматографа с использованием буферных растворов с тремя значениями рН: 3,5; 4,25; 9,45. Об-

наружение и количественное определение отдельных аминокислот выполнено при помощи спектрофотометрического детектора прибора на длинах волн 570 нм и 440 нм. Пределы обнаружения аминокислот составляли 10^{-4} % масс.

Результаты и их обсуждение. По минеральному составу среди уролитов выделяют оксалатные (соли щавелевой кислоты), фосфатные (соли ортофосфорной кислоты) и уратные (мочевая кислота и ее соли) камни. Наиболее распространены уролиты смешанного типа: оксалатно-фосфатные, оксалатно-уратные и др. [10 – 16].

Изучение коллекции почечных камней жителей Омского региона позволило определить общее содержание белка в оксалатных и фосфатно-оксалатных камнях (табл. 1), которые указывают на то, что в камнях оксалатного типа наблюдается почти вдвое большее содержание белка, чем в камнях фосфатно-оксалатного типа. Данные статистической обработки показали, что эти отличия достоверны ($P = 0,95$; $t_{\text{расч}} = 4,66 > t_{\text{табл}} = 2,37$)

Таблица 1

Содержание общего белка в почечных камнях

Камни	Диапазон, % масс.	Среднее содержание, % масс.
Оксалатные	0,90-1,01	0,96
Фосфатно-оксалатные	0,42-0,71	0,55

В табл. 2 приведены содержания водорастворимых органических веществ с пептидной связью в оксалатных, фосфатных, уратных, уратно-оксалатных и фосфатно-оксалатных камнях.

Таблица 2

Содержание водорастворимых органических веществ с пептидной связью в почечных камнях

Камни	Диапазон, % масс.	Среднее содержание, % масс.
Оксалатные	2,2-2,4	2,3
Фосфатные	1,4-1,6	1,5
Уратные	2,1-2,2	2,15
Фосфатно-оксалатные	0,88-3,8	2,34
Уратно-оксалатные	2,0-2,6	2,30

Массовое содержание водорастворимых органических веществ с пептидной связью в почечных камнях составляет 0,8-3,8 масс. %, в зависимости от принадлежности образца к определенной классификационной группе. При этом содержание вышеуказанных органических соединений колеблется в более широких пределах в образцах почечных камней смешанного типа,

особенно фосфатно-оксалатных. Данный факт, по видимому, объясняется различным по длительности периодом изменения рН среды при образовании камней смешанного типа, при котором происходит накопление органического вещества [1, 3, 12, 15, 22].

С использованием t -критерия Стьюдента было выявлено, что отличие в средних значениях содержаний веществ с пептидной связью между фосфатной группой камней и группами оксалатных, уратных, уратно-оксалатных камней достоверно значимо ($P = 0,95$; $t_{\text{эсп}} = 10,89 > t_{\text{табл}} = 2,37$; $t_{\text{эсп}} = 8,2 > t_{\text{табл}} = 2,57$; $t_{\text{эсп}} = 19,6 > t_{\text{табл}} = 2,45$ соответственно). Отличия в средних значениях содержаний веществ с пептидной связью между фосфатной и фосфатно-оксалатной группами не найдено ($P = 0,95$; $t_{\text{эсп}} = 1,4 < t_{\text{табл}} = 2,45$).

Можно выделить три основных типа локализации органических веществ белковой природы в уролитах [22]: ядерная (в центре агрегата; рис. 1); прослоечная (концентрические и лучевые прослойки; рис. 2а); диффузная (в виде вкраплений в кристаллы минералов; рис. 2б). Как правило, в почечных камнях чаще всего фиксируются одновременно все типы локализации органического вещества с заметным преобладанием того или иного типа локализации.

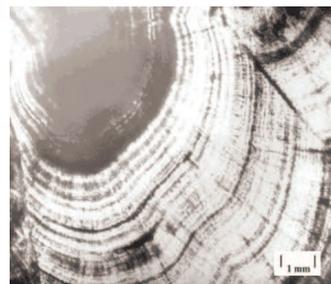


Рис. 1. Сферолитовое строение уратного почечного камня

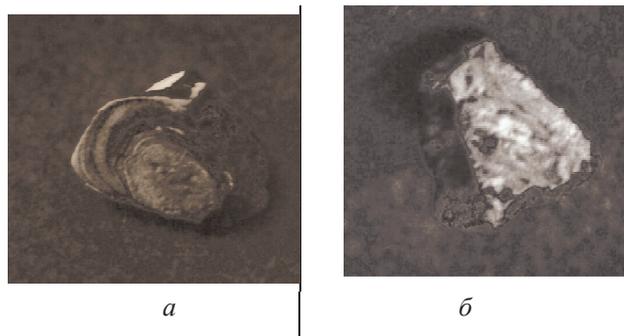


Рис. 2. Локализация органического вещества в почечных камнях: а – ядерно-прослоечная; б – диффузно-прослоечная

Послойный анализ камня фосфатно-оксалатного типа, зонального строения позволил установить распределение водорастворимых белковых соединений (рис. 3). Этот результат наглядно иллюстрирует процесс воспаления, происходящий в организме человека при образовании камня, представляющий собой по характеру колебательную постагрессивную реакцию (Лейборит) [24]. Такие колебания носят случайный характер, возникая неперiodически в результате вмешательства какого-нибудь необычного фактора среды.

Например, в тканях, в которые проникают микробы или другие раздражители, возникают в определенном порядке явления тканевого, клеточного и гуморального характера, группируемые под названием воспаление, которые можно рассматривать как принимаемую организмом меру защиты.

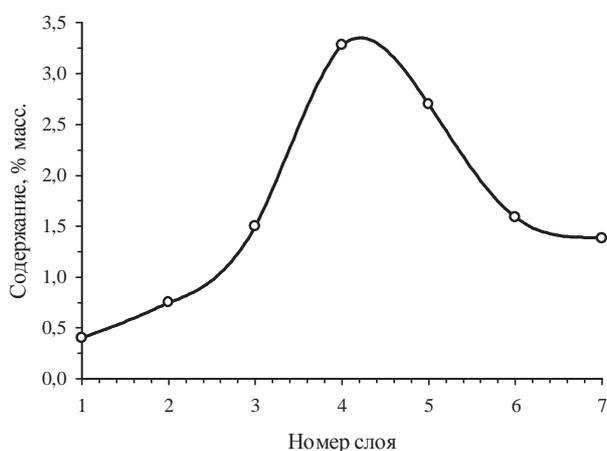


Рис. 3. Результаты послойного анализа белковых соединений в составе почечного камня.

Кроме того, как было показано нами ранее, фосфатные камни способны накапливать микроэлементы в большей степени, чем другие типы камней [1, 25 – 27]. Наряду с изоморфизмом фосфатных камней это, возможно, объясняется тем, что в составе белковой фракции фосфатных конкрементов преобладают глобулярные белки, основной функцией которых является транспорт в организме низкомолекулярных соединений и ионов металлов, вследствие чего они обладают высокой способностью связывать и накапливать микроэлементы. Этим и объясняется наибольшее количество микроэлементов в почечных камнях фосфатного типа.

Таким образом, мы видим, что содержание водорастворимых органических веществ с пептидной связью в почечных камнях зависит от минерального состава образца. Водорастворимые органические соединения с пептидной связью представлены простыми белками в уратных, уратно-оксалатных, фосфатных, фосфатно-оксалатных почечных камнях; простыми белками и гликопротеинами в оксалатных камнях. Необходимо отметить, что содержание водорастворимых органических соединений с пептидной связью изменяется в широком диапазоне в образцах почечных камней смешанного типа, особенно фосфатно-оксалатной группы.

Аминокислотный состав белковой составляющей почечных камней. Исследование коллекции почечных камней позволило установить в них наличие 14 аминокислот и определить их количественное содержание в составе органической неминеральной составляющей оксалатных, фосфатных, уратных, уратно-оксалатных и фосфатно-оксалатных камней (табл. 3).

Суммарное содержание аминокислот в исследуемых образцах варьируется в пределах 0,6101-2,228 % масс. и зависит от минерального состава камня. Ка-

чественный состав аминокислот (их число варьируется от 14 до 10) также зависит от фазового состава камней.

Таблица 3

Суммарное содержание аминокислот в почечных камнях

Камни	Диапазон, % масс.	Среднее содержание, % масс.
Оксалатные	0,610-0,701	0,660
Фосфатные	1,755-2,187	1,971
Уратные	2,228	2,228
Фосфатно-оксалатные	0,918-0,996	0,957
Уратно-оксалатные	2,024-2,109	2,067

Сопоставляя данные табл. 2 и табл. 3, можно отметить соответствие суммарного содержания аминокислот содержанию водорастворимых веществ с пептидной связью для всех групп почечных камней, за исключением оксалатной группы. Исходя из этого, можно предположить, что органические соединения с пептидной связью в уратных, уратно-оксалатных, фосфатных и фосфатно-оксалатных камнях представлены простыми белками.

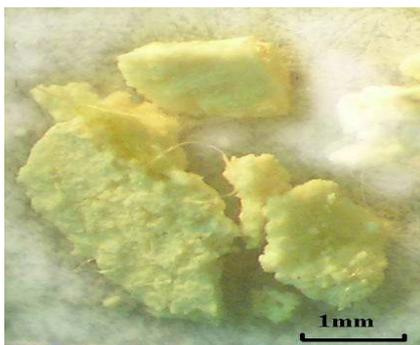
Значительное различие в суммарном содержании аминокислот и содержании водорастворимых веществ с пептидной связью для оксалатной группы камней можно объяснить тем, что, помимо простых белков, в состав таких камней входят сложные белки – гликопротеины, углеводные компоненты которых (например, N-ацетилглюкозамин) содержат связь –CO–NH–, дающую вклад в конечный результат, определяемый по методу Бенедикта, но не образуют аминокислот при гидролизе.

Согласно соотношению средних концентраций аминокислот в почечных камнях (глутаминовая кислота > лизин > пролин > аланин > треонин > валин > глицин > серин > фенилаланин > аргинин > лейцин > триптофан > метионин > изолейцин) не соответствует соотношению содержаний аминокислот в моче человека [22]: глицин > глутаминовая кислота > лизин > пролин, серин, аланин, треонин > аргинин, триптофан > фенилаланин, лейцин > валин > изолейцин > метионин). Содержание глутаминовой кислоты и лизина в почечных камнях существенно выше, чем других аминокислот, и превышает их содержание в моче. Это позволяет предположить наиболее активное участие, как этих аминокислот, так и белков с их высоким содержанием в процессе образования почечных камней, вследствие наличия в составе лизина дополнительной аминогруппы, а в глутаминовой кислоте дополнительного карбоксильного остатка.

Аминокислотный состав белковой составляющей зубных и слюнных камней. Минеральный состав зубных и слюнных камней (рис. 4) менее разнообразен, чем почечных камней. Они сложены

преимущественно фосфатными минералами, причем преобладающим минералом является апатит.

чаются от таковых для ротовой жидкости и различны в разных типах камней.



а



б

Рис. 4. Зубные (а) и слюнные (б) камни

Исследование коллекции зубных и слюнных камней жителей Омского региона позволило выявить в них наличие 15 аминокислот и определить их количественное содержание. При этом установлено, что качественный набор аминокислот во всех случаях одинаков. В среднем суммарное содержание аминокислот в слюнных камнях несколько выше, чем в зубных (табл. 4), поскольку концентрация белка в среде их образования больше, что согласуется с данными [3].

В ротовой жидкости содержание аминокислот на порядок меньше, что говорит об их сильном концентрировании в камнях в процессе литогенеза.

Сравнение ряда средних содержаний аминокислот в зубных и слюнных камнях показало, что эти ряды отли-

Таблица 4
Суммарное содержание аминокислот, % масс.

Объект	Диапазон	Среднее содержание
Зубные камни	2,64-13,08	6,47
Слюнные камни	4,64-12,31	7,54
Ротовая жидкость	0,28-0,40	0,34

Ротовая жидкость: глутаминовая кислота > лизин > лейцин > глицин > аспарагиновая кислота > серин > аланин > аргинин > тирозин > валин > треонин > изолейцин > гистидин > метионин.

Зубные камни: глутаминовая кислота > серин > аланин > глицин > аспарагин > лизин > фенилаланин > валин > лейцин > треонин > изолейцин > гистидин > аргинин > тирозин > метионин.

Слюнные камни: глутаминовая кислота > серин > фенилаланин > лизин > аргинин > аспарагин > тирозин > лейцин > глицин > валин > аланин > гистидин > изолейцин > треонин > метионин.

В обоих типах камней преобладают глутаминовая кислота и серин. Высокое содержание глутаминовой кислоты и серина можно объяснить сильным адсорбционным взаимодействием с гидроксилатапатитом за счет наличия в составе глутаминовой кислоты дополнительной карбоксильной группы, а в составе серина гидроксильной группы. Заметим, что приведенные здесь данные отличаются от данных [28], поскольку в работе выборка образцов в три раза больше, и эти данные следует считать более соответствующими реальному аминокислотному составу камней.

Полученные концентрационные ряды для разных ОМА сопоставлены между собой (табл. 5).

Примечательно, что во всех ОМА (табл. 5) доминирующей по содержанию является глутаминовая кислота, что указывает на особую ее роль в процессах формирования данных биоминералов [12, 13, 22, 28 – 32].

Таблица 5

Концентрационные ряды аминокислот ОМА из организма человека

ОМА	Ряды аминокислот
Зубные камни	Glu > Ser > Ala > Gly > Asp > Lys > Phe > Val > Leu > Thr > Ile > His > Arg > Tyr > Met
Слюнные камни	Glu > Ser > Phe > Lys > Arg > Asp > Tyr > Leu > Gly > Val > Ala > His > Ile > Thr > Met
Почечные камни	Glu > Lys > Ala > Pro > Thr > Val > Gly > Ser > Phe > Arg > Met > Leu > Ile

Белковая составляющая желчных камней. Анализ литературных источников показал, что в настоящее время среди исследователей не существует единого мнения о причинах и механизме образования и роста желчных камней (рис. 5), однако некоторые

авторы указывают на особую роль соединений белковой природы в протекании этих процессов. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимо провести исследования, направленные на определение именно этой составляющей конкрементов.

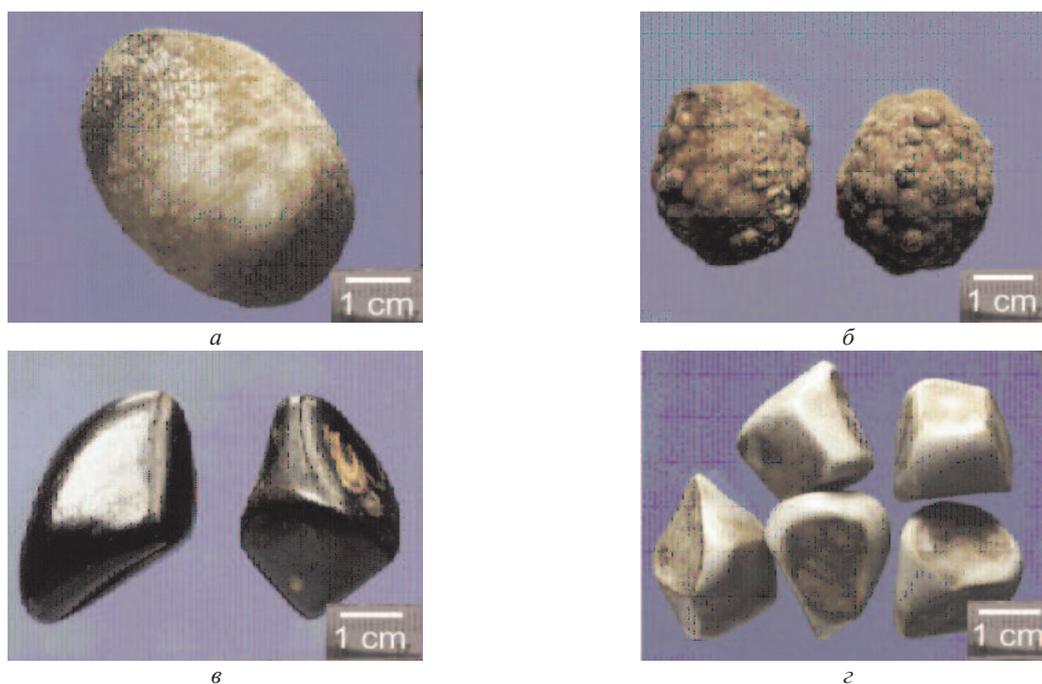


Рис. 5. Морфология желчных камней: *а* – овальные; *б* – в форме туговых ягод; *в-г* – граненые (фасеточные)

Согласно литературным данным холеолиты содержат следующие группы соединений: холестерин (80-90 % от массы камня), желчные кислоты, белки, билирубин, минеральные соли (в основном CaCO_3), микроэлементы и др.

Специфическое строение объектов исследования (холеолитов), химический состав которых качественно отличается от состава уролитов, заставляет использовать при их изучении несколько другой подход для анализа. Исходя из того, что состав данных камней главным образом представлен холестерином, для анализа белковой составляющей необходимо провести извлечение холестерина из конкремента и концентрирование белка.

Важным является подбор экстракционной системы, позволяющей проводить наиболее эффективное разделение белковой и холестериновой составляющей в образцах. Для количественного определения содержания белковых соединений в образцах существует большое число методик, однако их недостатком является то, что они не всегда учитывают специфику объектов исследования и рассчитаны в основном на анализ растворов. К числу таких методик относится и фотометрическое определение белков по Бенедикту. В основе данного метода лежит реакция образования окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белков с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в исследуемой пробе. Оптическую плотность растворов измеряли спектрофотометрически ($\lambda = 330 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$). К достоинствам данной методики можно отнести высокую чувствительность (предел обнаружения белка составляет 30 мкг/мл) и простоту исполнения. Однако применение этой методики для анализа белковых соединений холеолитов осложнено необходимостью их перевода в раствор, концентрация которого не должна быть меньше нижнего предела обнаружения данного метода.

Эффективным способом извлечения необходимых соединений из анализируемых образцов и снижения пределов обнаружения при их фотометрическом определении служит экстракционное концентрирование. При этом необходимо учитывать тот факт, что полученные водные концентраты не должны содержать вещества, мешающие определению белка. В данном случае к таковым относится холестерин (содержание которого в камне достигает 80-90 %), образующий с водой коллоидные растворы, способные рассеивать свет, что влечет за собой погрешности при спектрофотометрическом анализе. Поэтому, чтобы избежать артефакта, необходимо проводить предварительное извлечение холестерина из образца. Другие соединения, содержащиеся в камнях, не оказывают существенного влияния на результаты спектрофотометрического определения белка (включая билирубин, который нерастворим в воде).

С целью выбора более эффективной методики для извлечения холестерина отдельно от белка исследованы следующие экстракционные системы: ацетон, этиловый спирт, толуол, хлороформ. Выбор данных растворителей обусловлен в первую очередь тем, что согласно справочным данным они могут быть использованы для перевода в раствор холестерина, являющегося основным компонентом холеолитов. Однако на основании физико-химических характеристик данных соединений (полярность, наличие в их составе лиофильных и лиофобных групп и другие свойства, определяющие экстракционную способность вещества) можно предположить, что результаты растворения биоминералов, являющихся многокомпонентными образцами, будут различны.

На основании этого предположения на первом этапе нашей работы была изучена общая экстракционная способность вышеперечисленных растворителей при температуре 20–22 °С и времени экспозиции 1 и 2 суток.

Таблица 6

Результаты растворения образцов желчных камней
(масса пробы – 0,2 г, объем экстрагента – 15 мл, время экстракции – 48 часов)

Растворитель	Образец № 7		Образец № 9	
	Степень растворения, %	W, % (P = 0,95)	Степень растворения, %	W, % (P = 0,95)
Этанол	28,83	14,44	30,75	17,07
Ацетон	77,17	1,98	70,88	7,08
Хлороформ	95,33	1,09	93,92	0,41
Толуол	96,00	0,52	94,75	0,35

Таблица 7

Результаты растворения образцов желчных камней (образец № 7)
(масса пробы – 0,2 г, объем экстрагента – 15 мл, время экстракции – 24 и 48 часов)

Растворитель	24 часа		48 часов	
	Степень растворения, %	W, % (P = 0,95)	Степень растворения, %	W, % (P = 0,95)
Этанол	20,67	10,91	28,83	14,44
Ацетон	65,33	5,43	77,17	1,98
Хлороформ	94,83	1,1	95,33	1,09
Толуол	94,50	0,53	96,00	0,52

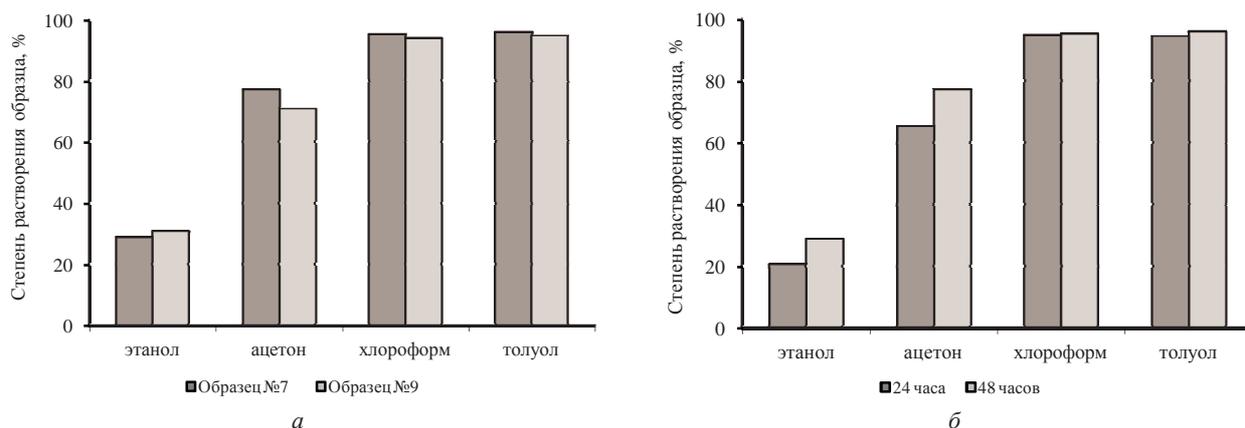


Рис. 6. Результаты растворения образцов желчных камней (масса пробы – 0,2 г, объем экстрагента – 15 мл): а – образцы № 7 и № 9 (время экстракции – 24 часа); б – образец № 7 (время экстракции – 24 и 48 часов)

Материалом для исследования служили два образца желчных камней. Эффективность растворения оценивалась величиной степени растворения и рассчитывалась на основании экспериментальных данных как отношение массы образца, перешедшего в раствор, к его исходной массе. Повторность опытов трехкратная. Результаты анализа приведены в табл. 6 – 7 и на рис. 6а, б.

Таким образом, согласно предварительным результатам можно предположить, что наиболее эффективное растворение желчных камней достигается при использовании в качестве экстрагента толуола, применение которого позволяет наиболее полно перевести образец в раствор, а полученные при этом результаты характеризуются максимальной воспроизводимостью.

Необходимо отметить и тот факт, что в ряду растворителей: спирт – толуол – ацетон – хлороформ отмечается увеличение интенсивности окраски экстрактов от практически бесцветной до оранжевой, что, видимо, обусловлено величиной растворимости пигмент-

ных веществ камня, в частности билирубина (λ_{max} (хлороформ) = 450 нм). На основании литературных и полученных экспериментальных данных можно предположить, что данные растворители можно использовать и для проведения дробной экстракции отдельных компонентов биоминералов (рис. 7).

Таким образом, детальное изучение омской коллекции желчных камней позволило установить, что их основными компонентами являются: холестерин (92 % от изученной выборки); холестерин с добавками билирубиновой компоненты; карбонаты кальция различной модификации в холестериновых камнях (арагонит, фатерит, кальцит) с преобладанием модификации арагонит.

Использование разработанного экстракционного отделения холестериновой составляющей позволило дополнительно определить компоненты желчных камней, не имеющих выраженной кристаллической структуры и присутствующих в очень малых количествах.

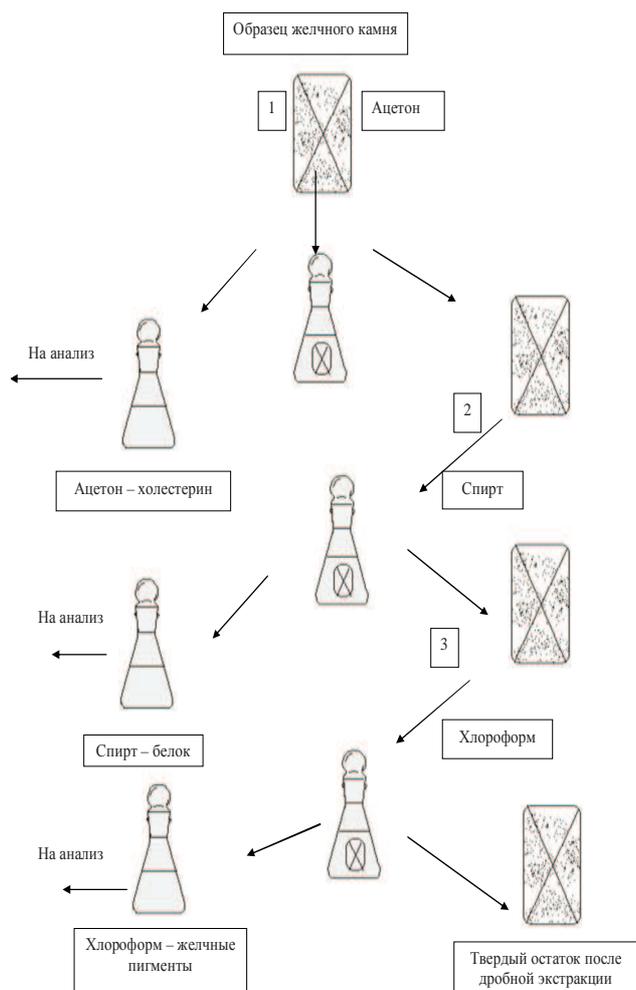


Рис. 7. Схема дробной экстракции компонентов желчных камней

Выводы. Таким образом, по полученным результатам можно сделать следующие выводы.

1. Выявлены значимые связи между белковым, минеральным и элементным составами ОМА.
2. Показано различие аминокислотных составов физиологических растворов и образующихся органоминеральных агрегатов.
3. Установлена высокая, и при этом избирательная, концентрация аминокислот в камнях разного типа по сравнению с формирующими их физиологическими жидкостями.
4. Сделан вывод об активном участии белковой компоненты в процессах кристаллизации патогенных фаз в организме человека, что подтверждается и результатами модельных экспериментов по кристаллизации основных фаз мочевых камней в присутствии аминокислот и белков в условиях, близких к физиологическим.

Литература

1. Зюзук Ф.В. Минералогія уролітів: автореф. дис. ... д-ра геол. наук. Львів, 2005. 52 с. укр.
2. Иванов М.А., Панин А.Г., Стедик О.В. Принципы структурно-вещественной классификации почечных камней: тез. докл. Федоровской сессии. 2006. С. 18–20.
3. Кораго А.А. Введение в биоминералогію. СПб.: Недра, 1992. 280 с.

4. Нигматулина Е.Н., Сокол Э.В., Чиглинец А.Ю. Химический состав минералов почечных камней по данным рентгеноспектрального микронзондового анализа // Биокостные взаимодействия: жизнь и камень: материалы I междунар. симпозиума. СПб., 2002. С. 192–195.
5. Пальчик Н.А., Столповская В.Н., Леонова И.В. Особенности минерального состава и структуры мочевых камней и их распространенность у пациентов из разных районов Новосибирской области // Минералогия техногенеза – 2001: сб. ст. Миасс, 2001. С. 99–108.
6. Полиенко А.К. Особенности онтогении почечных камней: автореф. дис. ... канд. геол.-минер. наук. Л., 1986. 21 с.
7. Серняк П.С. Значение суточных колебаний pH мочи в распознавании химического состава мочевых камней // Урология и нефрология. 1984. № 3. С. 21–26.
8. Сокол Э.В., Нигматулина Е.Н., Чиглинец А.Ю. Химический состав минералов почечных камней по данным рентгеноспектрального микронзондового анализа // Биокостные взаимодействия: жизнь и камень: материалы I междунар. симпозиума. СПб., 2002. С. 192–195.
9. Millan A., Sohnel O., Grases F. The influence of crystal morphology on the kinetics of growth of calcium oxalate monohydrate // Crystal Growth. 1997. Vol. 179. P. 231.
10. Голованова О.А., Борбат В.Ф. Почечные камни. М.: Мед. книга, 2005. 172 с.
11. Пятанова П.А. Физико-химическое исследование почечных камней, формальный генезис: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Омск, 2004. 20 с.
12. Тиктинский О.Л., Александров В.П. Мочекаменная болезнь. СПб.: Медицина, 2000. 384 с.
13. Каткова В. И., Симаков А. Ф. Роль аминокислот в генезисе биоминеральных образований // Сыктывкарский минералогический сб. 1998. № 27. С.58–66.
14. Кадурын С.В. Парагенетические ассоциации минералов и онтогения ОМА в почках людей: автореф. дис. ... канд. геол. наук. Львов, 2001. 22 с.
15. Москалев Ю.И. Минеральный обмен. М.: Медицина, 1985. 288 с.
16. Бельская Л.В., Голованова О.А., Пятанова П.А. Роль аминокислот в процессе образования зубных и почечных отложений // Минералогия техногенеза – 2006: сб. материалов семинара. Миасс, 2006. С. 175–182.
17. Билобров В.М., Миронов О.Л. Биохимический состав и структура матрицы почечных камней. Донецк, 1987. 43 с.
18. Голованова О.А., Пятанова П.А., Россеева Е.В. Анализ закономерностей распределения белковой составляющей мочевых камней // Докл. Акад. наук. 2004. Т. 395, № 5. С. 1–3.
19. Голованова О.А., Россеева Е.В., Франк-Каменецкая О.В. Аминокислотный состав камней мочевой системы человека // Вестн. СПбГУ. 2006. Сер. 4. Вып. 2. С. 123–127.
20. Пальчик Т.А., Мороз Т.Н., Леонова И.В., Мирошниченко Л.В. Минералообразование в организме человека // Биокостные взаимодействия: жизнь и камень: материалы II междунар. симпозиума. СПб., 2004. С. 186–189.
21. Sugimoto T., Funae Y., Rubben H., Nishio S., Hautmann R., Lytzeier N. Resolution of proteins in the kidney stone matrix using high-performance liquid chromatograph // European Urology. 1985. Vol. 11, № 5. P. 334–340.
22. Голованова О.А. Патогенные минералы в организме человека. Омск, 2007. 395 с.
23. Оценка мясной продуктивности крупного рогатого скота: рекомендации / Сиб. отд-ние РАСХН, СибНИПТИЖ, СибНИИМС. 2-е изд. Новосибирск, 2001. 156 с.
24. Голованова О.А., Пятанова П.А., Россеева Е.В. Морфологические особенности почечных камней пациентов Омского региона // Изв. вузов. Сер. Химия и химическая технология. 2002. Т. 45, Вып. 2. С. 109–113.
25. Биохимия / под ред. Е.В. Северина. М.: ГЭОТАР Мед., 2003. 356 с.
26. Пальчик Н.А., Столповская В.Н., Леонова И.В. Особенности минерального состава и структуры мочевых камней и их распространенность у пациентов из разных районов Новосибирской области // Минералогия техногенеза – 2001: сб. ст. Миасс, 2001. С. 99–108.
27. Потапов С.С., Паршина Н.В., Чиглинец А.Ю. Статистическое исследование уролитов и уролитиаза жителей Челябинской области // Минералогия техногенеза – 2002. Миасс, 2002. С. 109–123.
28. Ozgurtas T., Yakut G, Gulec M, Serdar M, Kutluay T. Role of urinary zinc and copper on calcium oxalate stone formation // Urol Int. 2004. Vol. 72 (3). P. 233–236.
29. LeGeros R.Z., Bleiwas C.B., Retino M., Rohanizadeh R., LeGe-

ros J.P. Zinc effect on the in vitro formation of calcium phosphates: relevance to clinical inhibition of calculus formation// *Am J. Dent.* 1999. Vol. 12 (2). P. 65-71.

30. Shad Muhammad Aslam, Ansari Tariq Mahmood, Afzal Uzma, Kauser Samina, Rafique Muhammad and Khan Misbahul Islam. Major Constituents, Free Amino Acids and Metal Levels in Renal Calculi from Multan Region // *OnLine Journal of Biological Sciences.* 2001. Vol. 1, N 11. P. 1063-1065.

31. Голованова О.А., Ачкасова Е.Ю., Пунин Ю.О., Желяев Е.В. Основные закономерности кристаллизации оксалата кальция в присутствии аминокислот // *Кристаллография.* 2006. Т. 51, № 2. С. 376-382.

32. Голованова О.А., Пунин Ю.О., Изатулина А.Р. Кристаллизация оксалата кальция в присутствии органических и неорганических добавок // *Кинетика и механизм кристаллизации. Нанокристаллизация. Биокристаллизация: тез. докл. IV междунар. науч. конф. Иваново, 2006.* 48 с.

References

1. Zuzuk F. V. Mineralogy of uroliths: avtoref. dis... d-ra geol. nauk. Lviv, 2005. 52 s. ukr.

2. Ivanov M.A., Panin A.G., Stetsik O.V. Principles of nephroliths structural and material classification: tez. dokl. Fedorovskoy sessii. 2006. S. 18-20.

3. Korago A.A. Introduction to biomineralogy. SPb.: Nedra, 1992. 280 s.

4. Nigmatulina E. N., Sokol E.V., Chiglintsev A.Yu. et al. Chemical composition of nephroliths according to X-ray microprobe analysis // *Biokostnye vzaimodeystviya: zhizn' i kamen': materialy I mezhdunar. simpoziuma.* SPb., 2002. S. 192-195.

5. Pal'chik N.A., Stolpovskaya V.N., Leonova I.V. et al. Features of the uroliths mineral composition and structure and their prevalence among patients from different districts of Novosibirsk Region// *Mineralogiya tekhnogeneza – 2001: sb. st. Miass, 2001.* S. 99-108.

6. Polienko A.K. Features of the nephroliths ontogeny: avtoref. dis...kand. geolog.-miner. nauk. L., 1986. 21 s.

7. Sernyak P.S. et al. The value of daily fluctuations in pH of the urine in identifying the uroliths chemical composition // *Urologiya i nefrologiya.* 1984. № 3. S. 21-26.

8. Sokol E.V., Nigmatulina E.N., Chiglintsev A.Yu. et al. Chemical composition of uroliths according to the X-ray microprobe analysis// *Biokostnye vzaimodeystviya: zhizn' i kamen': materialy I mezhdunar. simpoziuma.* SPb., 2002. S. 192-195.

9. Millan A., Sohnel O., Grases F. The influence of crystal morphology on the kinetics of growth of calcium oxalate monohydrate // *Crystal Growth.* 1997. V. 179. P. 231.

10. Golovanova O.A., Borbat V.F. Nephroliths. M.: Meditsinskaya kniga, 2005. 172 s.

11. Pyatanova P.A. Physico-chemical study of nephroliths, a formal genesis: avtoref. dis. ... kand. khim. nauk: 02.00.01. Omsk, 2004. 20 s.

12. Tiktinsky O.L., Aleksandrov V.P. Urolithiasis. SPb.: Meditsina, 2000. 384 s.

13. Katkova V.I., Simakov A.F. Role of amino acids in the genesis of biomineral formation// *Syktvykarsky mineralogicheskyy sb.* 1998. № 27. S. 58-66.

14. Kadurin S.V. Paragenetic minerals associations and OMA ontogeny in human kidneys: avtoref. dis.... kand. geol. nauk, LGU, Lvov, 2001. 22 s.

15. Moskalev Yu. I. Mineral metabolism. M.: Meditsina, 1985. 288 s.

16. Bel'skaya L.V., Golovanova O.A., Pyatanova P.A. The role of amino acids in the dental and kidney deposits formation // *Mineralogiya tekhnogeneza – 2006: sb. materialov seminarov.* Miass, 2006. S. 175-182.

17. Bilobrov V.M., Mironov O.L. Biochemical composition and structure of the nephroliths matrix. Donetsk, 1987. 43 s.

18. Golovanova O.A., Pyatanova P.A., Rosseyeva E.V. Distribution analysis of the uroliths protein component // *Doklady Akademii nauk.* 2004. T. 395. № 5. S. 1-3.

19. Golovanova O.A., Rosseyeva E.V., Frank-Kamenetskaya O.V. The amino acid composition of human uroliths // *Vestnik SPbGU. Ser. 4.* 2006. Vyp. 2. S. 123-127.

20. Pal'chik T.A., Moroz T.N., Leonova I.V., Miroshnichenko L.V. Mineral formation in the human body // *Biokostnye vzaimodeystviya: zhizn' i kamen': materialy II mezhdunar. simpoziuma.* SPb.: MO RAN, 2004. S. 186-189.

21. Sugimoto T., Funae Y., Rubben H., Nishio S., Hautmann R., Lytzeier N. Resolution of proteins in the kidney stone matrix using high-performance liquid chromatograph // *European Urology.* 1985. (11) № 5. P. 334-340.

22. Golovanova O.A. Pathogenic minerals in the human body. Omsk, 2007. 395 s.

23. Evaluation of the cattle meat producing capacity. Guidelines: Sibirskoye otdeleniye RASKhN, SibNIPTIZh, SibNIIMS. 2-e izd. Novosibirsk, 2001. 156 s.

24. Golovanova O.A., Pyatanova P.A., Rosseyeva E.V. Morphological features of nephroliths among the patients of Omsk region// *Izvestiya vuzov. Seriya «Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya».* 2002. T. 45. Vyp. 2. S. 109-113.

25. Biochemistry / Pod red. E.S. Severina. M.: GEOTAR Med., 2003. 356 s.

26. Pal'chik N.A., Stolpovskaya V.N., Leonova I.V. et al. Features of the uroliths mineral composition and structure and their prevalence among patients from different districts of Novosibirsk Region// *Mineralogiya tekhnogeneza – 2001: sb. st. Miass, 2001.* S. 99-108.

27. Potapov S.S., Parshina N.V., Chiglintsev A.Yu. et al. Statistical study of uroliths and urolithiasis among the residents of Chelyabinsk region // *Mineralogiya tekhnogeneza – 2002. Miass, 2002.* S. 109-123.

28. Ozgurtas T, Yakut G, Gulec M, Serdar M, Kutluay T. Role of urinary zinc and copper on calcium oxalate stone formation // *Urol Int.* 2004. V.72(3) P. 233-236.

29. LeGeros RZ, Bleiwas CB, Retino M, Rohanizadeh R, LeGeros JP. Zinc effect on the in vitro formation of calcium phosphates: relevance to clinical inhibition of calculus formation // *Am J. Dent.* 1999 –V.12(2) P. 65-71.

30. Shad Muhammad Aslam, Ansari Tariq Mahmood, Afzal Uzma, Kauser Samina, Rafique Muhammad and Khan Misbahul Islam. Major Constituents, Free Amino Acids and Metal Levels in Renal Calculi from Multan Region // *OnLine Journal of Biological Sciences,* 2001. –V.1 N11. P. 1063-1065.

31. Golovanova O.A., Achkasova E. Yu., Punin Yu. O., Zhelyaev E.V. Basic laws for calcium oxalate crystallization in the amino acids presence// *Kristallografiya.* 2006. T. 51. № 2. S. 376-382.

32. Golovanova O.A., Punin Yu.O., Izatulina A.R. Calcium oxalate crystallization in the organic and inorganic additives presence// *Kinetika i mekhanizm kristallizatsii. Nanokristallizatsiya. Biokristallizatsiya: Tezisy dokladov IV mezhdunar. nauchnoy konferentsii. Ivanovo, 2006.* 48 s.