

ОРГАНИЧЕСКАЯ МИНЕРАЛОГИЯ И БИОМИНЕРАЛОГИЯ

DOI <https://doi.org/10.30695/zrmo/2019.1484.07>

© Д. чл. Е. В. МАШИНА, С. Н. ШАНИНА

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ХОЛЕЛИТОВ И ЕГО СВЯЗЬ С МИНЕРАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТОЙ

*Институт геологии Коми НЦ УрО РАН,
167982, Сыктывкар, ул. Первомайская, 54;
e-mail: borovkova@geo.komisc.ru, shanina@geo.komisc.ru*

Исследования аминокислотного состава холелитов (желчных камней) жителей Республики Коми показали значимые отличия холестериновых и пигментных образцов. Установлено, что при формировании карбонатной или фосфатной составляющей в холелитах большое значение имеет специфичность белковой компоненты. Показано, что содержание аминокислот выше в образцах с присутствием минеральной составляющей и неоднородно по разрезу холелитов. Присутствие D-форм аминокислот в пигментных и холестериновых холелитах, является следствием участия в их образовании различных микроорганизмов.

Ключевые слова: холелиты, патогенная минерализация, биоминеральные образования, аминокислоты, холестерин, билирубин.

E. V. MASHINA, S. N. SHANINA. AMINO ACID COMPOSITION OF GALLSTONES AND ITS CONNECTION WITH THE MINERAL COMPONENT

Institute of Geology, Komi Science Center Ural Branch RAS, Syktyvkar, Russia

The study of the amino acid composition of gallstones of the Komi Republic residents has shown the significant differences in cholesterol and pigment specimens. It has been revealed that during formation of the carbonate or phosphate component in gallstones, the specificity of the protein component is of great importance. It is shown that the content of amino acids is higher in samples with presence of the mineral component and is non-uniform through the cross-section of gallstones. The presence of D-forms of amino acids in pigment and cholesterol gallstones is a consequence of the participation in their formation of various microorganisms.

Key words: gallstones, pathogen mineralization, biomineral formation, amino acids, cholesterol, bilirubin.

ВВЕДЕНИЕ

Многие вопросы, касающиеся проблемы патогенного минералообразования в организме человека, до сих пор остаются без ответа. До настоящего времени недостаточно изученным остается механизм взаимодействия между органическими и минеральными компонентами в ходе биоминералообразования. В частности, исследованию аминокислотного состава органической компоненты мочевых, зубных и других камней посвящено сравнительно небольшое

число работ (Пятанова, 2004; Голованова, 2006; Каткова, 2006; Каткова и др., 2008). Среди подобных образований наименее изучена белковая составляющая холелитов, часто формирующихся в результате желчнокаменной болезни (холелитиаза). В этом случае актуальным представляется выявление связи между слагающим холелиты белковым веществом и сопутствующими ему минеральными соединениями. В желчи и желчных камнях установлены такие белки, как альбумин, глобулины, муцин, N-аминопептидаза, фосфолипаза C, остеопонтин (Rawson, 1962; Екимова и др., 2009; Chikvaidze et al., 2009; Imano et al., 2010).

Согласно распространенной классификации, желчные камни делятся на две основные группы: пигментные и холестериновые. На пигментные холелиты приходится менее 20 % случаев (Кораго, 1992). Главным компонентом холестериновых камней является холестерин $C_{27}H_{46}O$ — гидрофобное органическое вещество, состоящее из трех взаимосвязанных шестичленных и одного пятичленного углеродных ядер, с гидроксильной группой у третьего углеродного атома. Основными составляющими пигментных камней являются билирубинат кальция — $C_{33}H_{34}N_4O_6Ca$ и билирубинат меди $C_{33}H_{34}N_4O_6Cu$ (Li et al., 1995). Билирубин $C_{33}H_{34}N_4O_6$ представляет собой гидрофобное органическое вещество, состоящее из четырех пиррольных колец и двух карбоксильных групп в боковых цепях. Наличие двух карбоксильных групп в молекуле билирубина обуславливает его кислотные свойства и способность образовывать соли.

Минеральные фазы в холелитах представлены карбонатом кальция $CaCO_3$ (ватерит, арагонит и кальцит) и фосфатом кальция (карбонатапатит $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ и гидроксилапатит $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (Ефимова и др., 2005; Машина, 2014; Машина и др., 2015). Данные неорганические химические соединения довольно широко распространены в природе, в виде основных минеральных компонентов костной ткани, различных раковин. Их образование происходит при непосредственном участии белкового вещества. Например, за регуляцию процессов минерализации при формировании раковины у моллюсков, состоящих из карбоната кальция, отвечает белок конхиолин (Дроздова, 1977). В составе этого белка обнаружены высокие содержания кислых аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой). Предполагается, что в белковой матрице раковин имеются активные центры, в которых концентрируются катионы и анионы, ответственные за образование минеральной фазы. Так, например, кислые аминокислоты выполняют функции фиксации кальция (Дроздова, 1977).

Целью данного исследования было изучение аминокислотного состава холестериновых и пигментных холелитов, обнаруженных у жителей Республики Коми, а также установление связи аминокислотного состава с минеральной компонентой желчных камней.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования нами были отобраны 17 проб холестериновых и 8 проб пигментных холелитов. Образцы были разделены на семь групп:

холестериновые:

- без минеральной составляющей (обр. 1, 9, 47, 49, 52, 54, 67);
- содержащие фосфат кальция (обр. 2, 33, 43, 51);

— содержащие карбонат кальция: ватерит (обр. 8, 53, 58, 74), арагонит (обр. 22, 76);

пигментные:

— без минеральной составляющей (обр. 17, 25, 48);

— содержащие фосфат кальция (обр. 55);

— содержащие карбонат кальция: арагонит (обр. 79, 80);

— содержащие диоксид кремния (обр. 68, 83).

Для изучения фазового состава холелитов использовали рентгеноструктурный (Shimadzu XRD-6000; CuK_α -излучение, шаг сканирования 0.02° , скорость съемки 1 гр/мин) и ИК-спектроскопический (ИнфраЛюм ФТ-02) методы, а также сканирующий электронный микроскоп (VEGA3 TESCAN) с энергодисперсионной приставкой X-Max (РЭМ).

Для извлечения аминокислот из образцов применяли кислотный гидролиз в 6М HCl при 105°C в течении 12 ч. Выделенные из гидролиза аминокислоты очищали от примесей и переводили в N-пентафторпропионовые изопропиловые эфиры соответствующих аминокислот. Идентификация и определение содержания аминокислот в образцах выполнены на газовом хроматографе GC-17A (Shimadzu). Для разделения D- и L-энантиомеров полученных эфиров аминокислот использовалась капиллярная колонка Chirasil-L-Val (длина 50 м, внутренний диаметр 0.25 мм) (Шанина, Голубев, 2010).

С целью определения содержания кальция в образцах применялся атомно-эмиссионный с индуктивно-связанной плазмой анализ (спектрометр Optima-4300). Для идентификации микробной флоры применялся метод ПЦР (использовались универсальные праймеры, фланкирующие 5'-концевой участок гена 16S рДНК длиной порядка 1000 п. о.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фазовый состав холелитов

Данные о составе холелитов были получены рентгеноструктурным и ИК-спектроскопическим методами. В холелитах (обр. 1, 9, 47, 49, 52, 54, 67, 2, 33, 43, 51, 8, 53, 58, 74, 22, 76) установлен холестерин по основным полосам на ИК-спектрах: ОН групп в области 3400 см^{-1} , ассиметричным и симметричным валентным колебаниям CH_2 и CH_3 при 2934 и 2868 см^{-1} , деформационным колебаниям CH_2 и CH_3 групп 1466 и 1376 см^{-1} , валентным колебаниям скелета C—C при 1056 см^{-1} . Методом рентгеноструктурного анализа кристаллический холестерин определен по основным пикам: 34, 5.9, 4.7, 3.8 Å. В ИК-спектрах холелитов (обр. 17, 25, 48, 55, 76, 79, 80, 68, 83) фиксируются полосы, соответствующие связям в билирубине: 3409 см^{-1} , относящаяся к валентным колебаниям NH групп, 2929 и 2866 см^{-1} , характерные для валентных колебаний CH_2 и CH_3 групп, 1661 , 1626 , 1571 , 1254 см^{-1} валентных колебаний C=C , C—N , C=O и деформационных колебаний NH групп. В пробах (обр. 2, 33, 43, 51, 55) на ИК-спектрах имеются также полосы 604 , 593 см^{-1} деформационных колебаний группы $[\text{PO}_4]$ (рис. 1). Присутствие в холелитах карбоната кальция установлено по основным полосам на дифрактограммах: 3.51, 3.25, 2.70, 2.05, 1.84, 1.80, 1.63 Å для ватерита (обр. 8, 53, 58, 74); 3.40, 3.28, 2.70, 2.49, 2.37, 2.34, 2.19, 2.11, 1.97 Å для арагонита (обр. 22, 76, 79, 80) (рис. 2, 3). По данным РЭМ фосфат кальция в образцах имеет глобулярную структуру и сосре-

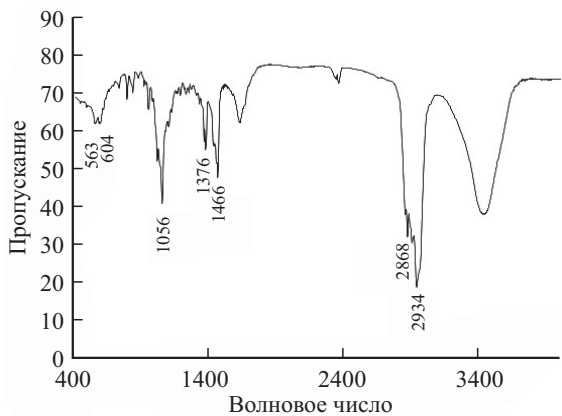


Рис. 1. ИК-спектр холестеринового холелита (обр. 2).

Fig. 1. IR-spectrum of cholesterol gallstone (Sample 2).

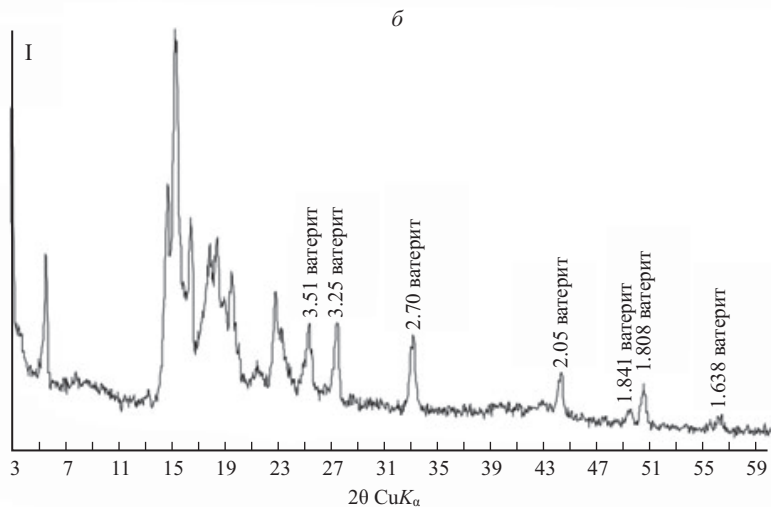
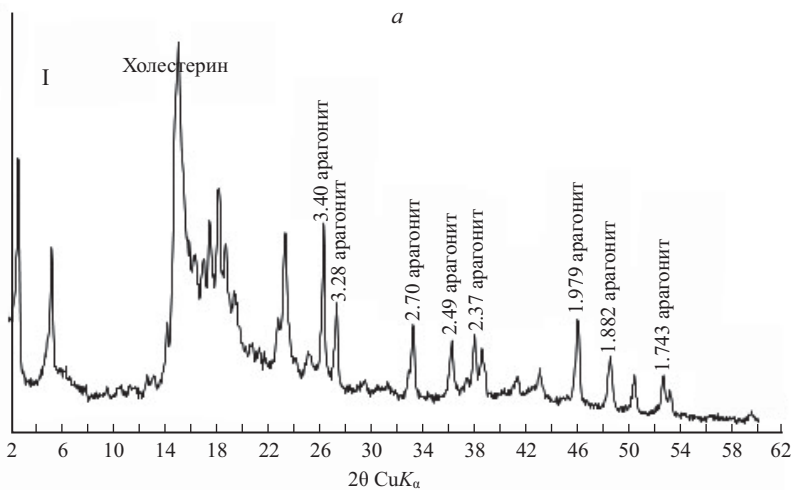


Рис. 2. Рентгенограммы холестериновых холелитов, содержащих: *a* — арагонит (обр. 76); *б* — ватерит (обр. 74).

Fig. 2. X-ray powder patterns of cholesterol gallstones containing: *a* — aragonite (Sample 76); *b* — vaterite (Sample 74).

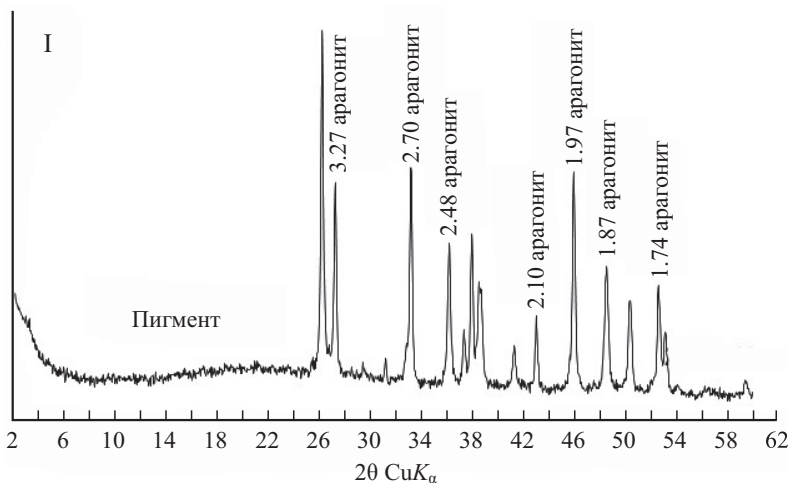


Рис. 3. Рентгенограмма пигментного холелита содержащего арагонит (обр. 79).
 Fig. 3. X-ray powder pattern of the pigment gallstone containing aragonite (Sample 79).

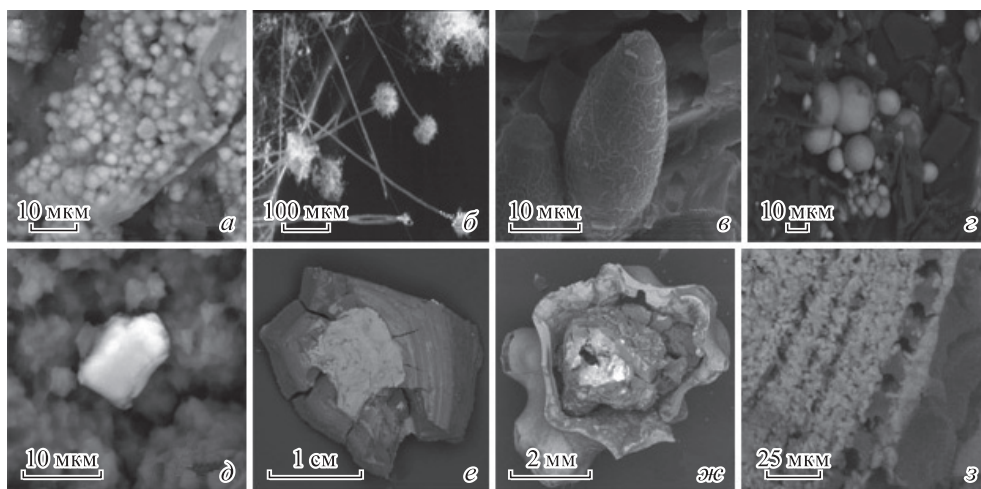


Рис. 4. СЭМ изображения сколов холелитов: *а* — фосфат кальция (обр. 33), *б* — грибковая микрофлора (обр. 43), *в* — яйца гельминтов (обр. 33), *г* — ватерит (обр. 58), *д* — микровключенение диоксида кремния (обр. 83), *е* — пигментный камень с фосфатом кальция в центре (обр. 55); *ж* — пигментный камень с карбонатом кальция (корочка) (обр. 79); *з* — увеличенный фрагмент карбоната кальция (обр. 79).

Fig. 4. SEM images of gallstone chips: *a* — calcium phosphate (sample 33), *б* — fungal microflora (sample 43), *в* — eggs of helminths (sample 33), *г* — vaterite (sample 58), *д* — microinclusion of silicon dioxide (sample 83), *е* — pigment stone with calcium phosphate in its center (sample 55); *ж* — pigment stone with calcium carbonate crust (sample 79); *з* — an enlarged fragment of calcium carbonate (sample 79).

доточен в центральной части (рис. 4, а), атомное соотношение Ca/P варьирует от 1.72 до 1.84, что больше значения соответствующего стехиометрическому апатиту. Микронзондовым анализом в частицах фосфата кальция определены различные примеси Na, Mg, Mn, S и Cl. Ватерит и арагонит располагаются по периферийной части образцов и представлены образованиями сферической и игольчатой формы (рис. 4, з, е, ж, з). В двух пигментных холелитах (обр. 68, 83) обнаружены множественные микровключения диоксида кремния разнообразной формы (рис. 4, д).

Исследования методом сканирующего электронного микроскопа фосфат-содержащих холестериновых холелитов показали, что в обр. 43 выявлены нити и конидии, которые по морфологическим признакам относятся к грибковой микрофлоре (рис. 4, б), в самом центре обр. 33 находятся яйца гельминтов (рис. 4, в). Указывается, что при гельминтозах происходит увеличение провоспалительных белков α , γ -глобулинов и уровня щелочной фосфатазы, данный фермент катализирует реакции дефосфорилирования и тем самым может повышать концентрацию фосфат ионов (Коркин, 2009). Кроме того, методом ПЦР в холелите (обр. 33) обнаружены *Propionibacterium*, которые продуцируют углекислый газ, осуществляют реакции окислительного фосфорилирования с образованием полифосфатов (Воробьева, 1995).

На основании анализа ПЦР в пигментных образцах 17 и 48 были установлены микроорганизмы *Streptococcus* и *Enterococcus*. По данным анализа ПЦР в холелите (обр. 55) найдена *Escherichia Coli*, которая, как известно, вырабатывает фосфолипазу. Под действием данного фермента может происходить гидролиз фосфолипидов, что в конечном итоге ведет к осаждению фосфата кальция в желчи (Berg et al., 1998).

Аминокислотный состав холестериновых холелитов

Содержание аминокислот в холестериновых камнях меняется от 1 до 17.2 мг/г сухой навески. В холелитах без минеральной составляющей содержание аминокислот не превышает 4 мг/г (рис. 5). В групповом составе доминируют алифатические и гидроксильные аминокислоты (рис. 6). Среди индивидуальных аминокислот преобладают глицин и серин. Ни в одном из исследованных холелитов не было установлено D-форм аминокислот.

В холестериновых камнях с присутствием минеральной компоненты содержание аминокислот увеличивается (рис. 5), появляется D-аспарагиновая аминокислота. Групповой состав аминокислот представлен на рис. 6.

В холелитах, содержащих фосфат кальция среди индивидуальных аминокислот, доминируют глицин, глутаминовая аминокислота, лейцин, аланин. С целью установления особенности распределения аминокислот в структуре холелитов нами был проведен послойный анализ обр. 33. Исследования показали, что в периферийной части, не содержащей минеральной компоненты, концентрация аминокислот составляет 1 мг/г, тогда как в центральной части, где сосредоточен фосфат кальция, содержания аминокислот возрастают до 6 мг/г (рис. 7, а). По аминокислотному составу в центральной части доминируют глицин, глутаминовая кислота, аланин, аспарагиновая кислота, а также отмечается присутствие D-аспарагиновой кислоты. В периферийной части преобладают глицин, глутаминовая кислота, аланин, лейцин, отсутствуют фенилаланин, тирозин, изолейцин, лизин.

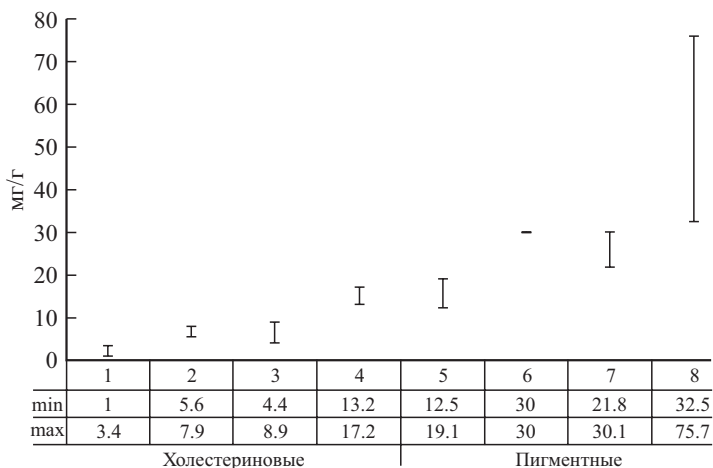


Рис. 5. Изменение содержания аминокислот в холелитах: 1—4 — холестеринные холелиты, 1 — без минеральной составляющей, 2 — содержащие фосфат кальция, 3 — содержащие ватерит, 4 — содержащие арагонит; 5—8 — пигментные холелиты, 5 — без минеральной составляющей, 6 — содержащий фосфат кальция, 7 — содержащие карбонат кальция, 8 — содержащие диоксид кремния. Обозначения: max — максимальные концентрации аминокислот, min — минимальные концентрации аминокислот.

Fig. 5. Changing content of amino acids in cholesterol (1—4) and pigment (5—8) gallstones: 1 — without mineral component, 2 — containing calcium phosphate, 3 — with vaterite, 4 — with aragonite; 5 — without mineral component, 6 — with calcium phosphate, 7 — with calcium carbonate, 8 — with silicon dioxide. max — maximum and min — minimum concentrations of amino acids.

В холелитах с фазами карбоната кальция концентрации аминокислот варьируют (рис. 5). В групповом составе доминируют алифатические и кислые аминокислоты (рис. 6). В образцах (содержащих ватерит) преобладают глутаминовая кислота, глицин, лейцин, аспарагиновая кислота. Послойный анализ обр. 58 показал, что в центральной части холестеринного холелита без минеральной компоненты содержание аминокислот составляет 1 мг/г, тогда как в периферийной части с ватеритом концентрация аминокислот резко возрастает (8 мг/г) (рис. 7, б). По аминокислотному составу в центральной части доминируют глицин, аланин, лейцин, серин; отмечается отсутствие лизина, тирозина, изолейцина. В периферийной части преобладают глицин, глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, лейцин; отмечается присутствие D-аспарагиновой кислоты.

Содержание аминокислот в холелитах с арагонитом заметно выше, чем в образцах с ватеритом (рис. 5). В желчных камнях с арагонитом доминируют глицин, глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, лейцин. Послойное исследование обр. 76 показало, что в центральной части, не содержащей минеральной компоненты, доминируют аланин и глицин (рис. 7, в). В периферийной части, в зоне сосредоточения арагонита совместно с билирубинатом кальция, отмечается возрастание концентраций аминокислот, здесь доминируют глицин, лизин, глутаминовая кислота, аланин, лейцин, а также появляются D-изомеры аланина и аспарагиновой кислоты. Известно, что D-изомеры аланина содержатся в клеточных стенках грибов (Березов, Коровкин, 1998).

Отличительной особенностью холестеринных холелитов с минеральной составляющей от образцов без таковой является присутствие гидроксипроли-

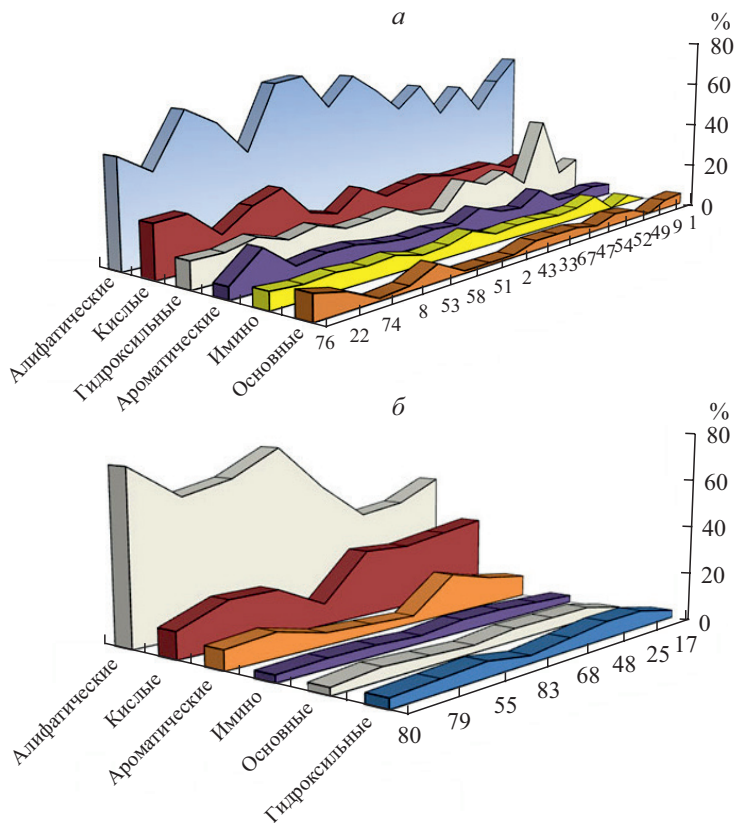


Рис. 6. Групповое распределение аминокислот в холестериновых (а) и пигментных (б) холелитах.

Fig. 6. Group distribution of amino acids in cholesterol (a) and pigment (b) gallstones.

на. В холестериновых образцах с фосфатом кальция содержание гидроксипролина колеблется от 0.02 до 0.1 мг/г, а в желчных камнях с карбонатом кальция — от 0.01 до 0.09 мг/г. Послойное исследование аминокислот (обр. 33, 58, 76) показало, что гидроксипролин сосредоточен в участках, содержащих минеральную компоненту (рис. 7).

Аминокислотный состав пигментных холелитов

Содержания аминокислот в пигментных камнях значительно выше, чем в холестериновых (рис. 5). В групповом составе пигментных образцов доминируют алифатические, кислые и ароматические аминокислоты (рис. 6, б).

В холелитах без минеральной составляющей, среди индивидуальных аминокислот преобладают глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, лейцин, глицин, аланин, фенилаланин. Обнаружены D-формы для трех аминокислот: аспарагиновой, глутаминовой, аланина, а также присутствие β-аланина.

В двух образцах с максимальным содержанием аминокислот 32.5 мг/г (обр. 83) и 75.7 мг/г (обр. 68) лидируют глицин (свыше 40 %), глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, лейцин, присутствует D-аспарагиновая кислота. Интересная особенность этих образцов — многочисленные микровключения

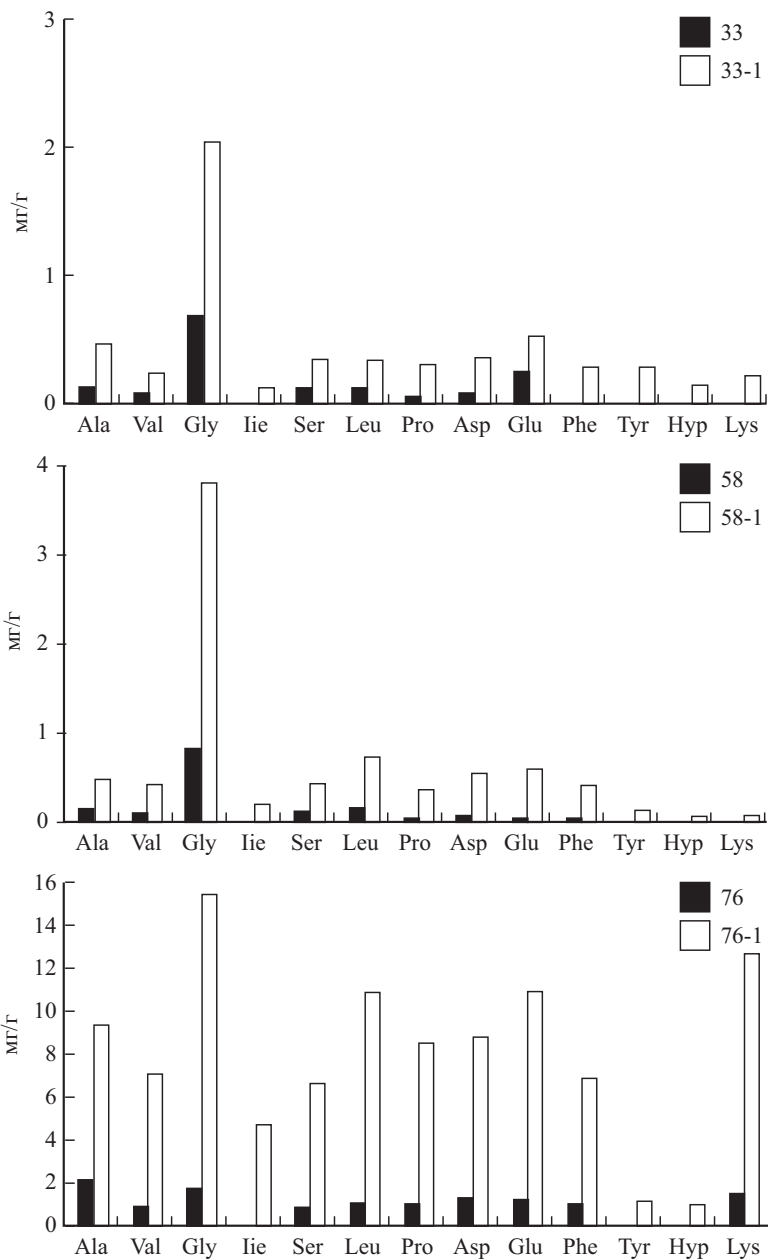


Рис. 7. Индивидуальное распределение аминокислот при послойном изучении холестериновых холелитов: *a* — 33 — периферийная часть, 33-1 — центральная часть, содержащая фосфат кальция; *б* — 58 — центральная часть; 58-1 — периферийная часть, соержжающая ватерит; *в* — 76 — центральная часть; 76-1 — периферийная часть, содержащая арагонит. Буквенные обозначения: Ala — аланин, Val — валин, Gly — глицин, Ile — изолейцин, Ser — серин, Leu — лейцин, Pro — пролин, Asp — аспарагиновая кислота, Glu — глутаминовая кислота, Phe — фенилаланин, Tyr — тирозин, Hyp — гидроксипролин, Lys — лизин.

Fig. 7. Individual distribution of amino acids in layers study of cholesterol gallstones: *a* — 33 — outer part, 33-1 — central part with calcium phosphate; *б* — 58 — central part; 58-1 — outer part with vaterite; *в* — 76 — central part; 76-1 — outer part with aragonite. Ala — alanine, Val — valine, Gly — glycine, Ile — isoleucine, Ser — serine, Leu — leucine, Pro — proline, Asp — aspartic acid, Glu — glutamic acid, Phe — phenylalanine, Tyr — tyrosine, Hyp — hydroxyproline, Lys — lysine.

диоксида кремния (рис. 4, *д*). Известно, что диоксид кремния может сорбировать различные аминокислоты, при этом наиболее прочные связи он образует с глицином (Carter, 1978).

В холелите с наличием фазы фосфата кальция, концентрация аминокислот составляет 30 мг/г. Отмечается доминирование глицина, глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, лейцина. Обнаружена D-аспарагиновая аминокислота.

В пигментных камнях, содержащих карбонатные минералы, концентрации аминокислот варьируют 21.8—30.1 мг/г, среди индивидуальных аминокислот преобладают глицин, глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, лейцин, аланин. Установлено также присутствие D-аспарагиновой аминокислоты.

В целом отметим, что содержание глицина во всех пигментных камнях намного выше, чем в холестериновых холелитах. Глицин — простейшая аминокислота, входит не только в состав белков, но и гликохолевой кислоты (продукт конъюгации холевой кислоты и глицина). Избыточные ее концентрации часто обнаруживают при холелитиазе. По мнению Е. Ю. Родионовой (2014), на агрегацию билирубина влияет не только рН, но и различные вещества, находящиеся в физиологической жидкости, в том числе и аминокислоты. Агрегация билирубина ведет к образованию желчных камней. В слабощелочной среде желчи растворимость билирубина повышается за счет образования дианиона, а в кислой среде молекулы билирубина коагулируют. Проведенные исследования показали, что увеличение концентрации глицина приводит к смещению изоэлектрической точки билирубина в сторону уменьшения рН (Родионова, 2014). Таким образом, повышенные содержания глицина в пигментных камнях, по-видимому, обусловлены высокими концентрациями в них гликохолевой кислоты.

Все изученные пигментные камни, за исключением образцов с диоксидом кремния, содержат в своем составе гидроксипролин от 0.1 до 0.4 мг/г, что несколько выше, чем в холестериновых камнях.

Связь аминокислотного состава с минеральной компонентой холелитов

Проведенные нами исследования холелитов показали, что в холестериновых камнях преимущественно преобладают алифатические, гидроксильные и кислые аминокислоты, в пигментных образованиях отмечается доминирование алифатических, кислых и ароматических аминокислот. Послойный анализ в структуре холестериновых холелитов, содержащих минеральную компоненту, позволил выявить различия качественного и количественного состава аминокислот. Отмечается, что очень низкие концентрации аминокислот характерны для свободных от минеральных фаз зон, с преобладанием преимущественно нейтральных аминокислот (глицина, аланина, лейцина, серина) и отсутствием тирозина, изолейцина, лизина. Вероятно, низкие содержания аминокислот здесь обусловлены присутствием белков или пептидов, состоящих из небольшого количества аминокислотных остатков. В зонах, содержащих минеральную компоненту, присутствуют все протеиногенные аминокислоты с заметным ростом кислых (глутаминовой, аспарагиновой) аминокислот, а также глицина и лизина. Установленные отличия аминокислотного состава

ва минеральной и неминеральной составляющей холестериновых холелитов, скорее всего, обусловлены различной белковой компонентой.

Обнаружение D-форм аминокислот в холелитах, по-видимому, является следствием жизнедеятельности различных микроорганизмов, что подтверждается данными анализа ПЦР и сканирующей электронной микроскопии. Микроорганизмы могут попадать в желчный пузырь, где образуются холелиты, гематогенным, лимфогенным или энтерогенным путем. Желчь обладает выраженными цитолитическими свойствами и способна разрушать любые клеточные элементы, включая вирусы, бактерии и простейшие (Ильченко, 2004). Попадая в желчный пузырь, микроорганизмы вызывают его воспаление, в результате чего организм запускает комплекс защитных реакций, происходит образование защитного экссудата, состоящего из различных антител белковой природы и ферментов. За счет этого в желчи может повышаться содержание белка. Не исключено, что под влиянием микроорганизмов создаются такие условия, при которых происходит осаждение минеральных фаз.

В целом установлено, что как в холестериновых, так и в пигментных холелитах присутствие минеральных фаз приводит к росту содержания аминокислот. Это происходит в основном за счет аминокислот, обладающих высокой гидрофильностью (глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин). Хорошо известно, что гидрофильные протеины, благодаря большому количеству входящих в них различных групп ($C=O$, HO^- , $N-H$, $C-N$), играют важную роль в процессах минерализации в природе. В организме человека высокой гидрофильностью обладают глобулярные белки, в том числе выполняющие ферментативные, иммунологические или транспортные функции, например высокогидрофильный белок альбумин, содержащий много кислых аминокислот, и лизин, связывающий самые разные молекулы и атомы, такие как кальций, неконъюгированный билирубин, соли желчных кислот, трансферрин и др. (Гончаров и др., 2015). Исследования показали, что альбумин способствует образованию сферического ватерита (Wen-Kun et al., 2012; Feng et al., 2016; Трушина, 2016), также данный белок хорошо адсорбируется на апатите (Swain, Sarkar, 2013). Установлено (Ohta et al., 2002), что белки кислотной природы (альбумин, γ -глобулин, фибриноген) легко и прочно адсорбируются на положительно заряженных активных центрах поверхности гидроксил-апатита, тогда как основные белки (цитохром C, лизоцим), богатые лизином, адсорбируются на участках поверхности, несущих отрицательный заряд.

По данным атомно-эмиссионного анализа установлена зависимость между содержанием кислых аминокислот и количеством кальция в холелитах (рис. 8). В холестериновых камнях рост содержания кальция и кислых аминокислот наблюдается в образцах с минеральной составляющей. В пигментных камнях аналогичная тенденция связана не только с минеральной компонентой, но и с присутствием билирубината кальция. То же отмечено и для обр. 76 холестеринового камня, где содержание кальция заметно повышено не только за счет присутствия арагонита, но и за счет наличия билирубината кальция. Вероятно, адсорбируя ионы кальция из раствора желчи, белки могут служить центрами нуклеации образования кальциевых минералов. Глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, в составе которых присутствуют карбоксильные группировки с большим отрицательным зарядом, легко и прочно взаимодействуют с ионами кальция, имеющими положительный заряд. В свою очередь молекула лизина обладает положительным зарядом, поэтому ввиду одноименного заряда с кальцием между ними возникает электростатическое

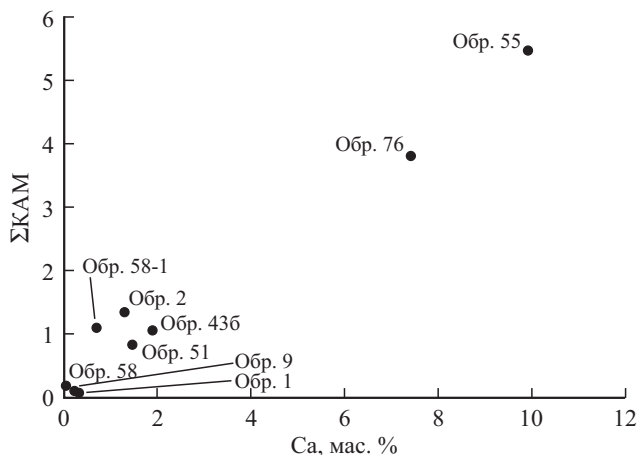


Рис. 8. Отношение суммы кислых аминокислот (Σ КАМ) к содержанию кальция (Ca). Обр. 1, 9 — холестериновые без минеральной составляющей; обр. 58 — центральная часть холестеринового камня без минеральной составляющей; обр. 58-1 — периферийная область холестеринового образца, содержащая ватерит; обр. 2, 436, 51 — холестериновые, содержащие фосфат кальция; обр. 76 — холестериновый, содержащий арагонит; обр. 55 — пигментный, содержащий фосфат кальция.

Fig. 8. Ratio of the sum of acid amino acids (Σ КАМ) to the calcium content (Ca) in cholesterol stones. Samples 1, 9 — stones without mineral component; Sample 58 — central part without a mineral component; Sample 58-1 — outer part of a stone containing vaterite; Samples 2, 436, 51 — stones with calcium phosphate; Sample 76 — stone with aragonite. Sample 55 — pigment stone containing calcium phosphate.

отталкивание. Это введет к тому, что адсорбция или взаимодействие происходит только на отрицательно заряженных участках — фосфатных или карбонатных группах.

В природных биообъектах (карбонатных, фосфатных) за регуляцию процессов минерализации отвечает определенная белковая матрица (Дроздова, 1977). Например, в раковинах моллюсков, состоящих из карбоната кальция, в составе белка обнаружены высокие содержания кислых аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой), которые выполняют функцию фиксации кальция. Вероятно, в холелитах прослеживается та же закономерность, когда белковая основа холелита определяет его химический состав.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования аминокислотного состава холестериновых и пигментных камней жителей Республики Коми позволили выявить ряд особенностей количественного и качественного распределения аминокислот в холелитах, а также их связь с минеральной составляющей.

Изученные холелиты по содержанию аминокислот можно выстроить в следующий ряд (в порядке увеличения): холестериновые > холестериновые с минеральной составляющей > пигментные > пигментные с минеральной составляющей. В образцах с минеральной составляющей содержание аминокислот выше за счет аминокислот, обладающих высокой гидрофильностью.

Холестириновые холелиты без минеральной составляющей характеризуются минимальными содержаниями аминокислот, с доминированием алифатиче-

ских и гидроксильных аминокислот. В холестериновых камнях с минеральной компонентой содержание аминокислот выше, доминируют алифатические и кислые аминокислоты, появляются D-изомеры аланина и аспарагиновой кислоты. Установлено, что содержание аминокислот неоднородно по разрезу холестериновых холелитов с минеральной составляющей. В зонах, содержащих минеральную компоненту, концентрации аминокислот выше, присутствуют все протеиногенные аминокислоты (аминокислоты, которые биосинтетически включаются в белки). В свою очередь, в неминеральной части концентрации ниже, и отмечается отсутствие ряда аминокислот.

В пигментных образцах без минеральной компоненты доминируют кислые, алифатические и ароматические аминокислоты, установлено присутствие β-аланина, а также D-формы трех аминокислот: аспарагиновой, глутаминовой, аланина. В пигментных холелитах, содержащих минеральные фазы, установлены максимальные концентрации аминокислот с преобладанием алифатических и кислых аминокислот, а также присутствием D-аспарагиновой кислоты. Появление D-аминокислот в пигментных и холестериновых желчных камнях является следствием жизнедеятельности различных микроорганизмов.

Таким образом, в ходе исследования установлены значимые отличия аминокислотного состава холестериновых и пигментных холелитов, что свидетельствует о разном механизме их образования. Значительные вариации в суммарном содержании аминокислот в холелитах могут объясняться различным составом белковой компоненты. При формировании минеральной составляющей (фосфатной или карбонатной) в холелитах важное значение имеет специфичность белковой матрицы, а именно — присутствие белков, обладающих кислотными свойствами.

Исследования выполнены на аналитическом оборудовании ЦКП «Геонаука» в ИГ Коми НЦ УрО РАН. Работа выполнена в рамках темы НИР ИГ Коми НЦ УрО РАН на 2018—2020 гг. ГР №АААА-А17-117121270036-7.

Список литературы

- Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф.* Биологическая химия. М.: Медицина, **1998**. 704 с.
- Воробьева Л. И.* Пропионовокислые бактерии. М.: Изд-во МГУ, **1995**. 288 с.
- Голованова О. А.* Патогенные минералы в организме человека. Омск: Изд-во ОмГУ, **2006**. 400 с.
- Гончаров Н. В., Белинская Д. А., Разыграев А. В., Уколов А. И.* О ферментативной активности альбумина // Биоорганическая химия. **2015**. Т. 41. № 2. С. 131—144.
- Дроздова Т. В.* Геохимия аминокислот. М.: Наука, **1977**. 199 с.
- Екимова Н. В., Лифшиц В. Б., Субботина В. Г.* К этиопатогенезу желчнокаменной болезни и холестероза желчного пузыря // Саратовский научный журнал. **2009**. Т. 5. № 3. С. 337—341.
- Ефимова Ю. А., Кузьмичева Г. М., Никитина Е. А., Орлова С. В.* Рентгенография желчных камней // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. **2005**. № 2. С. 36—49.
- Ильченко А. А.* Желчнокаменная болезнь. М.: Анахарсис, **2004**. 200 с.
- Каткова В. И.* Биоминералогия стоматолитов. Екатеринбург: УрО РАН, **2006**. 112 с.
- Каткова В. И., Шанина С. Н., Боровкова Е. В.* Аминокислоты: структурообразующие компоненты биоминералов и маркеры процессов биосинтеза // ЗРМО. **2008**. № 5. С. 80—85.
- Кораго А. А.* Введение в биоминералогию. СПб.: Недра, **1992**. 279 с.
- Коркин А. Л.* Общие закономерности, особенности развития и течения желчнокаменной болезни на фоне описторхоза: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Тюмень, **2009**. 44 с.

Машина Е. В. Фосфаты кальция в холелитах / Матер. минерал. семинара с междунар. участием «Юшкинские чтения». Сыктывкар, **2014**. С. 204.

Машина Е. В., Makeev B. A., Филиппов В. Н. Карбонаты кальция в холелитах // Известия Томского политехнического университета. Издательство ТПУ. Томск. **2015**. Т. 326. № 1. С. 34—39.

Пятанова П. А. Физико-химическое исследование почечных камней, формальный генезис: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Омск, **2004**. 20 с.

Родионова Е. Ю. Коллоидные свойства водных дисперсий гемоглобина, хлорофилла и билирубина / Дис. ... канд. хим. наук. Санкт-Петербург, **2014**. 229 с.

Трушина Д. Б. Структура и свойства частиц ватерита с регулируемым размером и их применение в качестве основы носителей для доставки лекарственных веществ / Дис. ... канд. физ.-мат. наук. Москва, **2016**. 131 с.

Шанина С. Н., Голубев Е. А. Аминокислоты в шунгитах Карелии // Геохимия, **2010**. Т. 48. № 9. С. 972—987.

References

Berezov T. T., Korovkin B. F. Biological Chemistry. Moscow: Medicina, **1998**. 704 p. (in Russian).

Berg A. A., Buul J. D., Tytgat G. N., Groen, A. K., Ostrow J. D. Mucins and calcium phosphate precipitates additively stimulate cholesterol crystallization. *Lipid Res.* **1998**. Vol. 39. P. 1744—1751.

Carter P. W. Adsorption of amino acid-containing organic matter by calcite and quartz. *Geochim. Cosmohim. Acta.* **1978**. Vol. 42. P. 1239—1242.

Chikvaidze E. N., Gogoladze T. V., Kirikashvili I. N., Mamniashvili G. I. Ternary complexes of albumin-Mn(II)-bilirubin and electron spin resonance studies of gallstones. *Georgian Med. News.* **2009**. Vol. 168. P. 5—11.

Drozdova T. V. Geochemistry of amino acids. Moscow: Nauka, **1977**. 199 p. (in Russian).

Efimova Y. A., Kuzmicheva G. M., Nikitina E. A., Orlova S. V. Radiography of gallstones. *Questions of biological medical and pharmaceutical chemistry.* **2005**. N 2. P. 36—49 (in Russian).

Ekimova N. V., Lifshits V. B., Subbotina V. G. To the etiopathogenesis of cholelithiasis and gallbladder cholesterosis. *Saratov Journal of Science.* **2009**. Vol. 5. N 3. P. 337—341 (in Russian).

Feng J., Wu G., Qing C. Biomimetic synthesis of hollow calcium carbonate with the existence of the agar matrix and bovine serum albumin. *Materials Science and Engineering C.* **2016**. Vol. 58. P. 409—411.

Golovanova O. A. Pathogenic minerals in the human body. Omsk: Omsk State University, **2006**. 400 p. (in Russian).

Goncharov N. V., Belinskaya D. A., Razygraev A. V., Ukolov A. I. About the enzymatic activity of albumin. *Bioorganic chemistry.* **2015**. Vol. 41. N 2. P. 131—144 (in Russian).

Ichenko A. A. Gallstone disease. Moscow: Anaharsis, **2004**. 200 p. (in Russian).

Imano M., Satou T., Itoh T., Takeyama Y., Yasuda A., Peng Y. F. An immunohistochemical study of osteopontin in pigment gallstone formation. *Am. Surg.* **2010**. P. 91—95.

Katkova V. I. Biomineralogy of dentites. Ekaterinburg: UB RAS, **2006**. 112 p. (in Russian).

Katkova V. I., Shanina S. N., Borovkova E. V. Amino acids: the structure-forming components of biominerals and markers of biosynthetic processes. *Zapiski RMO (Proc. Russian Miner. Soc.).* **2008**. N 5. P. 80—85 (in Russian).

Korago A. A. Introduction to biomineralogy. Saint Petersburg: Nedra, **1992**. 279 p. (in Russian).

Korkin A. L. General regularities, features of development and course of cholelithiasis on the background of opisthorchiasis. *Doct. thesis syn.* Tyumen. **2009**. 44 p. (in Russian).

Li W. H., Shen G. R., Soloway R. D., Yang Z. L., Tong X. B., Wu E., Xu D. F., Wu J. G., Xu C. X. Copper bilirubinate and black pigment gallstone. *Biospectroscopy.* **1995**. P. 149—156.

Mashina E. V. Phosphates of calcium carbonate in gallstone. *Proc. miner. seminar «Yushkin Readings».* Syktvykar, **2014**. P. 204 (in Russian).

Mashina E. V., Makeev B. A., Filippov V. N. Calcium carbonates in gallstone. *Izvestiya of Tomsk Polytechnic University.* Tomsk: TPU, **2015**. Vol. 326. N 1. P. 34—39 (in Russian).

Ohta K., Monma H., Tanaka J., Eda H. Interaction between hydroxyapatite and proteins by liquid chromatography using simulated body fluids as eluents. *Materials Science: Materials in Medicine.* **2002**. Vol. 13. P. 633—637.

Pyatanova P. A. Physico-chemical study of kidney stones, formal genesis: authors abstract. *PhD thesis syn.* Omsk, **2004**. 20 p. (in Russian).

Rawson J. Human bile proteins. *Clinical Chemistry*. **1962**. Vol. 8. N 3. P. 310—317.

Rodionova E. Yu. Colloidal properties of aqueous dispersions of hemoglobin, chlorophyll and bilirubin. *PhD thesis*. Saint Petersburg, **2014**. 229 p. (in Russian).

Shanina S. N., Golubev E. A. Amino acids in the Karelian shungites. *Geochemistry Int.* **2010**. Vol. 48. N 9. P. 917—931.

Swain S. K., Sarkar D. Cryogenically cured hydroxyapatite—gelatin nanobiocomposite for bovine serum albumin proteinadsorption and release. *RSC Advances*. **2013**. N 34. P. 14 622—14 633.

Trushina D. B. Structure and properties of particles of the vaterite with a controlled size and their use as the basis of carriers for the delivery of drug substances. *PhD thesis*. Moscow, **2016**. 131 p. (in Russian).

Vorobeva L. I. Propionic acid bacteria. Moscow: MSU, **1995**. 288 p. (in Russian).

Wen-Kun Z., Xue-Gang L., Chi Z., Tao D., Jian Z. Regulation of microstructure of calcium carbonate crystals by egg white protein. *Chem. Res. Chinese Univ.* **2012**. Vol. 28. P. 180—185.

Поступила в редакцию
20 июня 2018 г.