

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126>

**ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ В УСЛОВИЯХ, ПРИБЛИЖЕННЫХ К ЧЕЛОВЕЧЕСКОМУ ОРГАНИЗМУ**

Научная статья

**Степанова А.А.<sup>1,\*</sup>, Панова Т.В.<sup>2</sup>**

<sup>2</sup>ORCID : 0009-0004-4725-1146;

<sup>1,2</sup> Омский государственный университет имени Ф.М. Достоевского, Омск, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (7stepanova[at]mail.ru)

**Аннотация**

Проведена кристаллизация карбоната кальция в условиях, приближенных к человеческому организму, с добавлением аминокислот – аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина и цистеина. Установлено, что при варьировании концентрации аминокислот и времени кристаллизации формируются фазы кальцита, ватерита и арагонита, причем преобладающей является фаза ватерита. Проведен анализ изменения формы, размера и количества образующихся конгломератов в зависимости от концентрации и вида аминокислоты. Методами рентгенофазового анализа, оптической и инфракрасной микроскопии исследовано влияние концентрации примесей на формирование частиц карбоната кальция. Установлено, что добавление аспарагиновой кислоты во всех концентрациях, используемых в эксперименте, приводит к резкому росту частиц ватерита различной формы.

**Ключевые слова:** аминокислоты, фазы, кристаллизация, человеческий организм, карбонат кальция.

**INFLUENCE OF AMINO ACIDS ON GALLSTONE CRYSTALLIZATION UNDER CONDITIONS CLOSE TO THE HUMAN BODY**

Research article

**Stepanova A.A.<sup>1,\*</sup>, Panova T.V.<sup>2</sup>**

<sup>2</sup>ORCID : 0009-0004-4725-1146;

<sup>1,2</sup> Dostoevsky Omsk State University, Omsk, Russian Federation

\* Corresponding author (7stepanova[at]mail.ru)

**Abstract**

Crystallization of calcium carbonate under conditions close to human body with addition of amino acids – asparagine and glutamic acids, serine and cysteine was carried out. It was found that by varying the concentration of amino acids and crystallization time, calcite, vaterite and aragonite phases are formed, with the vaterite phase being predominant. The changes in the shape, size and number of formed conglomerates depending on the concentration and type of amino acid were analysed. The influence of impurity concentration on the formation of calcium carbonate particles was studied by X-ray phase analysis, optical and infrared microscopy. It was found that the addition of asparagic acid in all concentrations used in the experiment leads to a sharp growth of variously shaped vaterite particles.

**Keywords:** amino acids, phases, crystallization, human body, calcium carbonate.

**Введение**

Карбонат кальция в виде трех его полиморфных модификаций: кальцита, арагонита и ватерита, встречается не только в составе природных систем, но и в организме человека в составе патогенных биоминеральных агрегатов, таких как холелиты [1], [2], [3]. Изучение генезиса карбоната кальция в желчных камнях представляет большой интерес не только с точки зрения медицины, но и с точки зрения минералогического изучения. Сравнение состава холелитов с природными аналогами будет осуществимо только после исследования возможного сходства, условий кристаллизации и морфологических особенностей карбоната кальция.

Независимо от своего сложного состава, большая часть желчных камней состоит преимущественно из холестерина (может достигать 70%), многих солей кальция, в том числе билирубинат и фосфолипиды, жирные кислоты и соли желчных кислот. В составе конкрементов обнаружено более 20 химических элементов, содержание которых зависит от региона, в котором проживает человек. Важнейшую роль в элементном составе занимают кислород, углерод и кальций, а наименьший вклад вносят такие элементы, как фосфор, азот, сера, хлор, натрий и магний [4], [5], [7], [8].

Существуют три полиморфные модификации карбоната кальция (CaCO<sub>3</sub>) – стабильный кальцит, нестабильные арагонит и ватерит, которые различаются свойствами (плотностью, растворимостью в воде, пористость и др.) и кристаллической структурой. Формирования определенного полиморфа зависит от способа получения частиц и обусловлено сочетанием многих условий реакции (концентрации исходных реагентов, температуры растворов, значения их pH и т. д.).

Целью настоящей работы являлось исследование особенностей кристаллизации и морфологии карбоната кальция, синтезированного в условиях, приближенных к человеческому организму с примесями различных аминокислот.

В качестве аминокислот были выбраны аспарагиновая и глутаминовая кислоты, цистеин и серин. Аспарагиновая кислота встречается во всех организмах в свободном виде и в составе белков и выполняет роль нейромедиатора в ЦНС. Глутаминовая кислота входит в состав белков всех известных живых организмов. Серин участвует в построении

практически всех природных белков. Цистеин играет важную роль в формировании тканей кожи, имеет значение для дезинтоксикационных процессов. Для проведения синтеза аминокислоты были взяты в концентрациях 0,5, 2 и 10 частей от общей концентрации каждого конкретного вещества, содержащегося в плазме крови человека в норме.

### Методика синтеза

Синтез производили в условиях, приближенных к человеческому организму [9]. Для этого сухую желчь растворяли в дистиллированной воде в концентрации 105 г/л. В полученном модельном растворе проводили синтез  $\text{CaCO}_3$ . Раствор был разделен на две части, в которые были добавлены  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , соответственно. Во второй раствор добавлялись аминокислоты в концентрациях 0,5, 2 и 10 частей от общей концентрации каждого конкретного вещества, содержащегося в плазме крови человека в норме. Смешивание этих растворов проводилось со скоростью 0,2 мл/с. Кислотность раствора доводили до  $\text{pH}=7.0$  после 10 минут смешивания, затем в раствор добавили формалин, чтобы получить формальдегид для консервации желчи. Полученный осадок фильтровался и просушивался. Далее проводили линейку синтезов карбоната кальция в желчи, добавляя в него аминокислоты разной концентрации. Морфологию кристаллов исследовали на оптическом микроскопе Neophot-2, рентгенофазовый анализ проводили на дифрактометре ДРОН-3М на медном  $K_\alpha$ -излучении, ИК-спектры снимали на спектрометре ФСН-2202.

### Экспериментальная часть

На начальном этапе эксперимента был проведен подбор концентрации солей, при которой наблюдался устойчивый рост кристаллов при варьировании времени кристаллизации. Обнаружено формирование кристаллов сферической формы (ватерит) и кубической формы (кальцит), количество и размеры которых сильно отличаются в зависимости от концентрации солей (рисунок 1). Картина кристаллизации, которая наиболее точно соответствует кристаллизации холелитов в организме человека соответствовала концентрации растворов используемых солей в растворе желчи в объеме 500 мл.

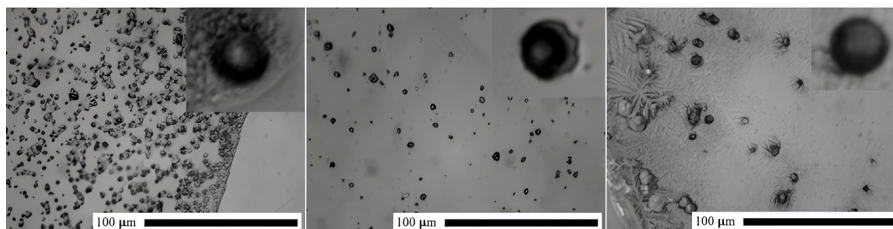


Рисунок 1 - Морфология кристаллов в зависимости от концентрации раствора:

а – 250 мл; б – 500 мл; в – 1000 мл

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.1>

На рисунках 2, 3 представлена фотография полученных кристаллов при синтезе с аспарагиновой кислотой. Обнаружено, что – при малой концентрации образуются преимущественно сферы (ватерит) с размерами 27 мкм, в меньшем количестве растут кристаллы кубической формы (кальцит) с размерами от 2 до 36 мкм. С увеличением времени кристаллизации наблюдается рост дендритов (арагонит).

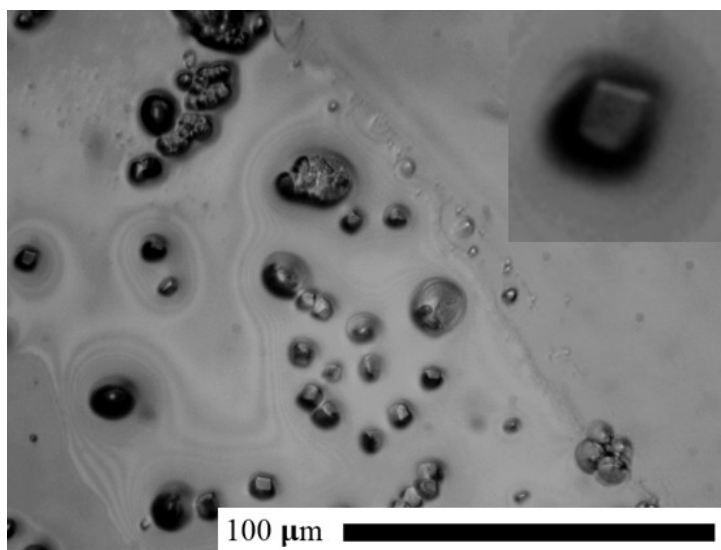


Рисунок 2 - Кристаллы, образовавшиеся в растворе с добавлением аспарагиновой кислоты

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.2>

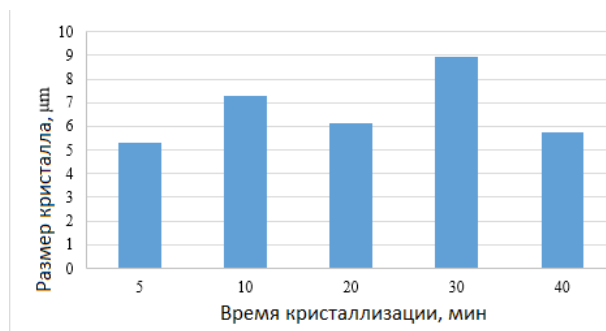


Рисунок 3 - Гистограмма роста кристаллов при концентрации аспарагиновой кислоты 10 частей  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.3>

В образцах с концентрацией 2 части от общей концентрации аспарагиновой кислоты в плазме крови человека преобладающей является фаза ватерита, размеры кристаллов которой варьируются в пределах 1-59 мкм, формируются кристаллы кальцита размерами 5-126 мкм и присутствует фаза арагонита. Наибольшая концентрация, которая составляет 10 частей от общей концентрации аспарагиновой кислоты в плазме крови человека, ускоряет образование кристаллов сферической формы, имеющих размеры 2-24 мкм и уменьшает формирование кубической формы кристаллов с размерами 3-22 мкм. Также в небольшом количестве образуются дендриты. По гистограмме видно, что максимальный размер образовавшихся кристаллов наблюдается при 30 минутах смешивания растворов.

На рисунках 4, 5 представлена фотография полученных кристаллов при добавлении глутаминовой кислоты. Здесь при всех концентрациях наблюдается преимущественная кристаллизация фазы ватерита, присутствует фаза кальцита и арагонита. Стоит обратить внимание, что фаза ватерита кристаллизуется не только в форме шарообразных кристаллов, но и может иметь вид различных слоистых, розеткообразных, шестиугольных, линзообразных и таблеткообразных кристаллов, а также их комбинаций.

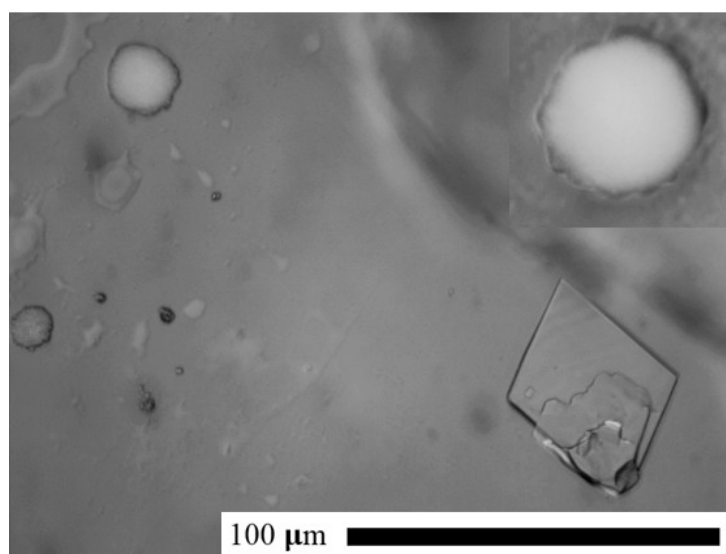


Рисунок 4 - Кристаллы, образовавшиеся в растворе с добавлением глутаминовой кислоты  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.4>

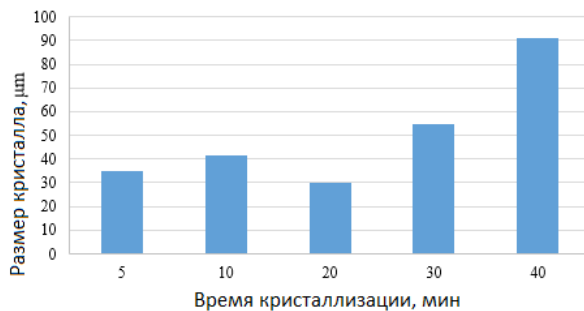


Рисунок 5 - Гистограмма роста кристаллов при концентрации глутаминовой кислоты 10 частей  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.5>

На гистограмме прослеживается резкий рост размеров кристаллов ватерита при увеличении времени кристаллизации. Аналогичные результаты наблюдались при кристаллизации с серином, однако размеры образующихся кристаллов практически в три раза меньше чем при добавке глутаминовой кислоты.

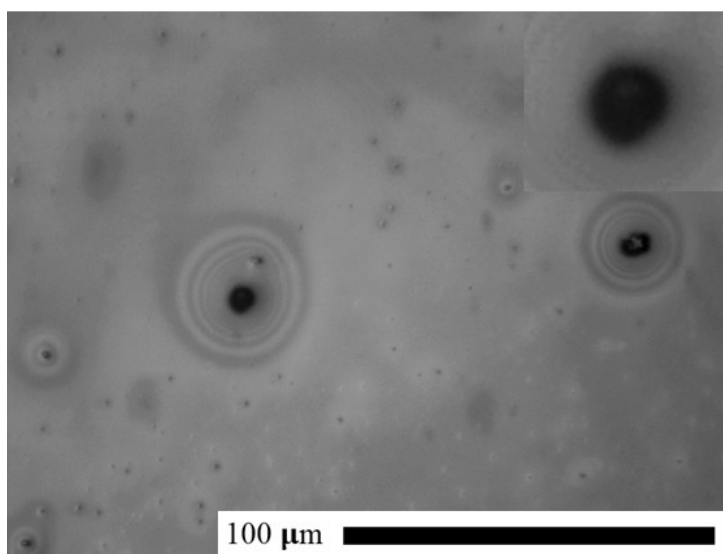


Рисунок 6 - Кристаллы, образовавшиеся в растворе с добавлением серина  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.6>

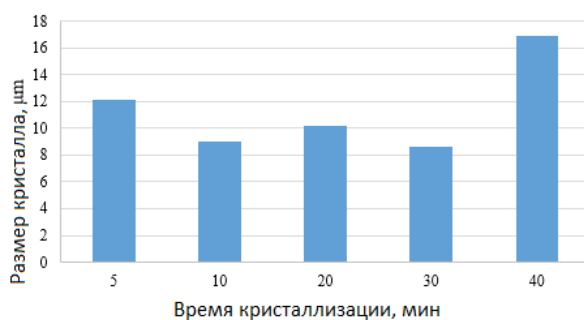


Рисунок 7 - Гистограмма роста кристаллов при концентрации серина 0,5 частей  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.7>

При кристаллизации с добавкой цистеина также наблюдалась преимущественная кристаллизация фазы ватерита с небольшим содержанием фаз кальцита и арагонита, при этом фаза ватерита, формируется в виде пластин.

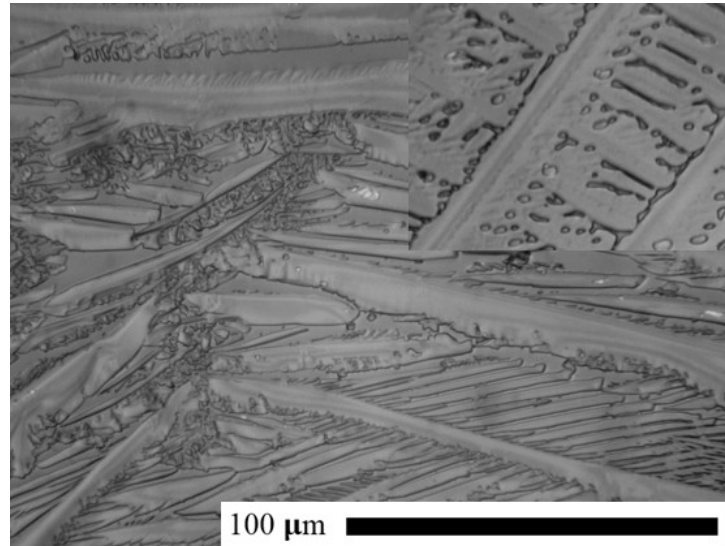


Рисунок 8 - Кристаллы, образовавшиеся в растворе с добавлением цистеина  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.8>

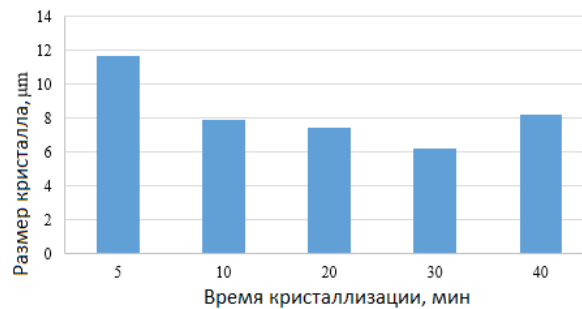


Рисунок 9 - Гистограмма роста кристаллов при концентрации цистеина 0,5 частей  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.9>

Дифрактограммы полученных осадков образцов с используемыми в эксперименте аминокислотами представлены на рисунках 10, 11, 12 и 13. Фазовый анализ показал, что при кристаллизации с добавкой аспарагиновой кислоты преобладающей является фаза ватерита со структурными элементами арагонита и кальцита. Аналогичные результаты получены и для других аминокислот (рисунки 11, 12 и 13). Исключением является образец с двойной концентрацией серина, у которого преобладает фаза арагонита. При этом наблюдались свои особенности, связанные с уменьшением либо увеличением содержания фазы арагонита при варьировании концентрации аминокислот. Так, при добавках серина и цистеина в максимальной концентрации содержание фазы арагонита возрастает, тогда как увеличение концентрации глутаминовой кислоты приводит к уменьшению содержания фазы арагонита.

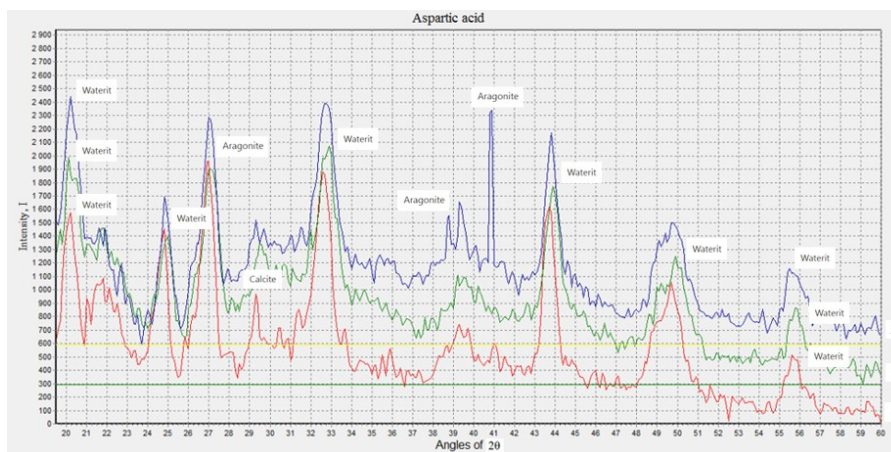


Рисунок 10 - Диффрактограммы образцов с примесями аспарагиновой кислоты  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.10>

Примечание: 1 – 0,5 части; 2 – 2 части; 3 – 10 частей

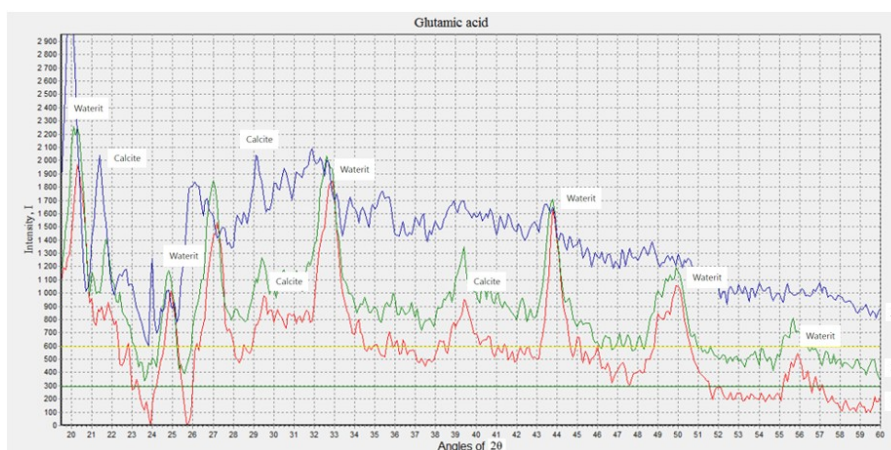


Рисунок 11 - Диффрактограммы образцов с примесями глутаминовой кислоты  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.11>

Примечание: 1 – 0,5 части; 2 – 2 части; 3 – 10 частей

Анализ ИК - спектров подтвердил присутствие фаз ватерита (1070 см<sup>-1</sup>, 745 см<sup>-1</sup>), кальцита (1471 см<sup>-1</sup>, 880 см<sup>-1</sup>) и арагонита (1080 см<sup>-1</sup>) для всех используемых в эксперименте аминокислот (рисунок 14). Обнаружены изменения интенсивности полос поглощения при варьировании типа и концентрации аминокислоты. Так, с увеличением концентрации серина, наблюдается уменьшение интенсивности пиков поглощения, соответствующих кальциту и ватериту. Увеличение концентрации аспарагиновой кислоты приводит сначала к уменьшению, а затем к увеличению интенсивности полос поглощения кальцита, при двойной концентрации наблюдается появление фазы арагонита и увеличение интенсивности полос поглощения фазы ватерита. При увеличении концентрации глутаминовой кислоты получены результаты аналогичные кристаллизации с добавками аспарагиновой кислотой. На спектрах с примесями цистеина при двойной концентрации наблюдалось сначала уменьшение, и затем небольшой рост содержания кальцита и ватерита при увеличении концентрации в растворе. Поскольку кристаллизация проводилась в присутствии желчи, то на ИК-спектрах обнаруживались полосы поглощения характерные холестерину (1462 см<sup>-1</sup>) и билирубину (989 см<sup>-1</sup>) [10]. Известно, что в состав желчи входит 95-97% воды и 3-5% сухого остатка. Кроме желчных кислот, в составе присутствуют и другие липиды (холестерин и фосфолипиды), также присутствуют желчные пигменты, такие как билирубин и продукты его преобразования, белки и микроэлементы.



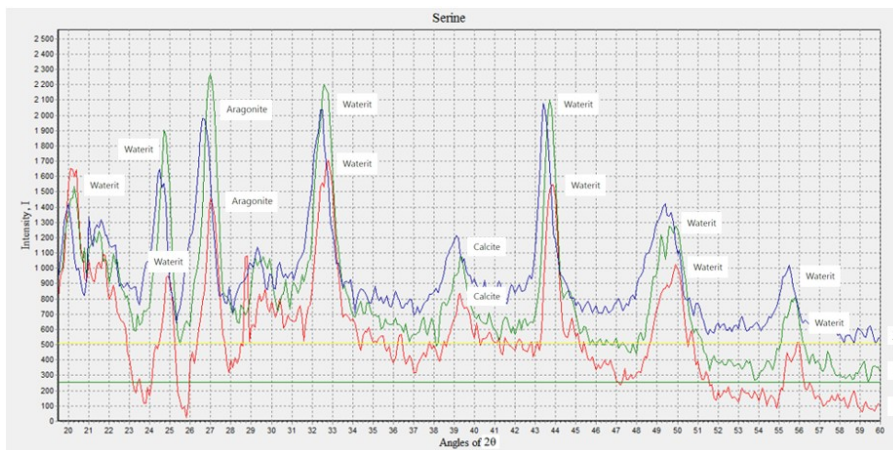


Рисунок 12 - Дифрактограммы образцов с примесями серина  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.12>

Примечание: 1 – 0,5 части; 2 – 2 части; 3 – 10 частей

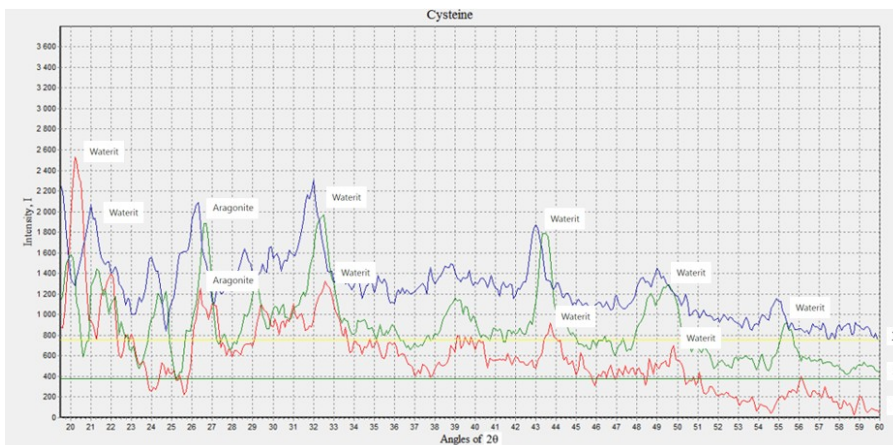


Рисунок 13 - Дифрактограммы образцов с примесями цистеин  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.13>

Примечание: 1 – 0,5 части; 2 – 2 части; 3 – 10 частей

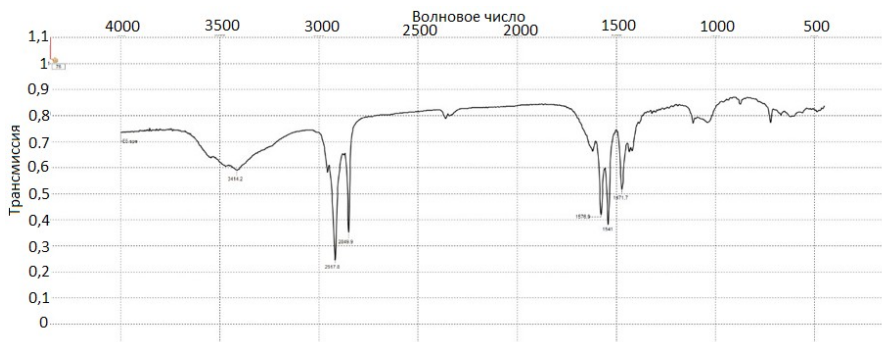


Рисунок 14 - ИК-спектр образца с примесями аспарагиновой кислоты при концентрации 0,5 частей  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.126.14>

Результаты ИК- спектроскопии подтвердили данные рентгенофазового анализа и показали зависимость формирующихся фаз карбоната кальция от типа и концентрации добавок используемых в эксперименте аминокислот.

### Заключение

Таким образом, проведенные исследования по влиянию аминокислот – аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина и цистеина на кристаллизацию желчных камней в условиях, приближенных к человеческому организму показали, что при всех используемых в эксперименте концентрациях и временах кристаллизации происходит формирование кристаллов ватерита, кальцита и арагонита, количество и размеры которых сильно отличаются в зависимости от концентрации и времени кристаллизации. При этом независимо от типа аминокислоты преобладающей фазой является фаза ватерита. Установлено, что добавки глутаминовой кислоты при одинаковых условиях кристаллизации приводят к резкому росту формирующихся кристаллов ватерита и кальцита.

### Конфликт интересов

Не указан.

### Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

### Conflict of Interest

None declared.

### Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

### Список литературы / References

1. Трушина Д. Б. Структура и свойства частиц ватерита с регулируемым размером и их применение в качестве основы носителей для доставки лекарственных веществ : дис. ...канд. : 01.04.07 : защищена 2016-12-15 : утв. 2016-12-16 / Д. Б. Трушина — Москва: 2016.— 131 с.
2. Столповская В.Н. Состав желчных камней, взаимосвязь и структурные преобразования из компонентов / В. Н. Столповская, Н. А. Пальчин, Л. М. Тимофеева // Химия в интересах устойчивого развития. — 1999. — Т. 7, № 5. — С. 547 – 552.
3. Lowenstam H. A. Vaterite: a mineralization product of the hard tissues of a marine organism (Ascidacea) / H. A. Lowenstam, D. P. Abbott // Science. — 1975. — Vol. 188, № 4186. — P. 363 – 365.
4. Голованова О. А. Фазовый и химический состав желчных камней в организме человека / О. А. Голованова // Вестник СПбГУ. — 2006. — № 4. — С. 76-82.
5. Голованова О.А. Желчные камни / О. А. Голованова. — Омск: Наука, 2012. — 126 с.
6. Тихонов Д.Г. Патогенез желчнокаменной болезни / Д.Г. Тихонов // Якутский медицинский журнал. — 2015. — № 4. — С. 91 – 96.
7. Njeze G. E. Gallstones / G. E. Njeze // Nigerian journal of surgery. — 2013. — Vol. 19, no. 2. — P. 49 – 55.
8. Циммерман Я.С. Гастроэнтерология: руководство / Я.С. Циммерман. — Москва: ГЭОТАР – Медиа, 2013. — 800 с.
9. Голованова О. А. Синтез карбоната кальция в присутствии желчи, альбумина и аминокислот / О. А. Голованова, С. С. Леончук // Журнал неорганической химии. — 2020. — № 4. — С. 449-457.
10. Азатян К.А. Исследование состава желчных камней и способов их растворения / К. А. Азатян, А. В. Алексеев, Г. М. Зубарева // Успехи современного естествознания. — 2013. — № 9. — С. 12-17.

### Список литературы на английском языке / References in English

1. Trushina D. B. Struktura i svoystva chastits vaterita s reguliruemyim razmerom i ih primeneniye v kachestve osnovy nositelej dlja dostavki lekarstvennyh veschestv [The structure and properties of waterite particles with adjustable size and their use as the basis of carriers for drug delivery] : dis....of PhD in Engineering : 01.04.07 : defense of the thesis 2016-12-15 : approved 2016-12-16 / D. B. Trushina — Moskva: 2016.— 131 p. [in Russian]
2. Stolpovskaya V.N. Sostav zhelchnykh kamnej, vzaimosvjaz' i strukturnye preobrazovanija iz komponentov [Composition of gallstones, interrelation and structural transformations from components] / V. N. Stolpovskaya, N. A. Palchin, L. M. Timofeeva // Himija v interesah ustojchivogo razvitija [Chemistry in the interests of sustainable development]. — 1999. — Vol. 7, No. 5. — pp. 547-552. [in Russian]
3. Lowenstam H. A. Vaterite: a mineralization product of the hard tissues of a marine organism (Ascidacea) / H. A. Lowenstam, D. P. Abbott // Science. — 1975. — Vol. 188, № 4186. — P. 363 – 365.
4. Golovanova O. A. Fazovyy i himicheskij sostav zhelchnykh kamnej v organizme cheloveka [Phase and chemical composition of gallstones in the human body] / O. A. Golovanova // Vestnik SPbGU [Bulletin of St. Petersburg State University]. — 2006. — No. 4. — pp. 76-82. [in Russian]
5. Golovanova O.A. Zhelchnye kamni [Gallstones] / O. A. Golovanova. — Omsk: Nauka, 2012. — 126 p. [in Russian]
6. Tikhonov D.G. Patogenez zhelchnokamennoj bolezni [Pathogenesis of cholelithiasis] / D.G. Tikhonov // Yakutskij medicinskij zhurnal [Yakut Medical Journal]. — 2015. — No. 4. — pp. 91-96. [in Russian]
7. Njeze G. E. Gallstones / G. E. Njeze // Nigerian journal of surgery. — 2013. — Vol. 19, no. 2. — P. 49 – 55.
8. Zimmerman Ya.S. Gastrojenterologija: rukovodstvo [Gastroenterology: a guide] / Ya.S. Zimmerman. — Moscow: GEOTAR – Media, 2013. — 800 p. [in Russian]



9. Golovanova O. A. Sintez karbonata kal'cija v prisutstvii zhelchi, al'bamina i aminokislot [Synthesis of calcium carbonate in the presence of bile, albumin and amino acids] / O. A. Golovanova, S. S. Leonchuk // Zhurnal neorganicheskoy himii [Journal of Inorganic Chemistry]. — 2020. — No. 4. — pp. 449-457. [in Russian]
10. Azatyan K.A. Issledovanie sostava zhelchnyh kamnej i sposobov ih rastvorenija [Investigation of the composition of gallstones and methods of their dissolution] / K. A. Azatyan, A.V. Alekseev, G. M. Zubareva // Uspehi sovremennogo estestvoznaniya [Successes of modern natural science]. — 2013. — No. 9. — pp. 12-17. [in Russian]