

ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
“ПОВЕРХНОСТНЫЕ ЯВЛЕНИЯ В ДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМАХ”

УДК: 544-971,544-1,544-7

СВОЙСТВА КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ, СИНТЕЗИРОВАННОГО ИЗ
РАСТВОРА ЖЕЛЧИ В ПРИСУТСТВИИ АМИНОКИСЛОТ¹

© 2024 г. О. А. Голованова

Омский государственный университет имени Ф. М. Достоевского, Омск, Россия

e-mail: golovanoa2000@mail.ru

Поступила в редакцию 11.10. 2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 29.12.2023 г.

Данное исследование направлено на поиск зависимостей между составом и свойствами CaCO_3 в желчи и концентрациями аминокислот в ней. В работе синтезировано 22 образца карбоната кальция в желчи при варьировании концентраций аминокислот Гистидин (His), Метионин (Met), Аргинин (Arg) и Триптофан (Trp). Термодинамическим моделированием установлено, что введение аминокислот приводит к повышению стабильности желчи за счет снижения мольной доли свободных ионов Ca^{2+} . Установлено содержание CaCO_3 в составе твердой фазы синтезированных образцов, при этом максимальный выход по CaCO_3 имеют образцы, полученные с Arg, минимальный выход – с Met. Результаты рентгенофазового анализа (РФА) и ИК-фурье-спектроскопии показали, что основа всех полученных порошков представлена ватеритом. Для аминокислот Met и Arg доказан их стабилизирующий эффект по отношению к метастабильному арагониту. Оптическая микроскопия доказала присутствие сферолитов ватерита во всех полученных порошках. Методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) установлено, что микрочастицы карбоната кальция радиусом менее 10 мкм представлены тремя фракциями. Все исследованные аминокислоты имеют потенциальную возможность использования их в качестве медицинских препаратов для лечения и профилактики микрохолелитиаза.

Ключевые слова: карбонат кальция, желчные камни, термодинамика, комплексообразование, желчь, аминокислоты, радиус, ватерит

DOI: 10.31857/S0044453724070064, EDN: PVRYUM

В настоящее время образование желчных камней (холелитов), приводящее к желчнокаменной болезни (ЖКБ) представляет собой общемировую проблему, ей страдает порядка 15% населения планеты, а единственным наиболее эффективным и практикуемым методом лечения является оперативное вмешательство [1–5]. При этом истинные причины желчнокаменной болезни до сих пор остаются неустановленными, несмотря на уже известные факторы риска развития данного заболевания [4, 5]. Поиск решения данной проблемы проводится на стыке физической химии, бионеорганической, коллоидной и биохимии, а найденные ответы в перспективе помогут разработать новые неинвазивные методы профилактики и лечения холелитиаза.

Важно отметить, что в состав х желчных камней входят органические и неорганические соли кальция, которые заслуживают особого внимания

в рассмотрении вопроса физико-химических причин возникновения ЖКБ [6–8]. Особое значение в процессе формирования желчных камней имеет процесс образования микрокристаллов карбоната кальция, свойства которых (фазовый состав, морфология, размер частиц) тесно связаны с кристаллизацией холестерина из желчи и, как следствие, с ростом холелитов. Соли кальция тесно связаны с процессами нуклеации, кристаллизации и агрегации холестерина в желчи, что является главным фактором в определении механизма образования желчных камней, по мнению ряда авторов [9–11].

Становится ясным то, что в отсутствие неорганических солей кальция (в частности, карбоната кальция как преобладающей неорганической фазы в составе желчных камней), самопроизвольная нуклеация холестерина невозможна физиологически, поэтому нуклеация холестерина происходит в результате гетерогенной кристаллизации с участием карбоната и билирубината кальция [4,12,13]. При этом важную роль играет состав желчи и концентрация ее компонентов [5].

¹ Доклад на конференции, посвященной 125-летию со дня рождения академика АН СССР П. А. Ребиндера (Москва, ИФХЭ РАН, 2–6 октября 2023 года)

В настоящее время изучено протекание холелитиаза от стадии уже образовавшихся микрохолелитов (последняя стадия микрохолелитиаза) до стадии крупных холелитов, растущих в процессе развития ЖКБ [5, 8]. При этом основным неорганическим компонентом микролитов (как и желчных камней, впоследствии) является карбонат кальция [5,12]. Изучение особенностей его кристаллизации, определение зависимости размеров образующихся микрочастиц CaCO_3 от концентрации и природы компонентов желчи может выявить условия и факторы, способствующие возникновению микрохолелитиаза и желчнокаменной болезни в целом.

Полный механизм, физико-химические и биохимические причины формирования желчных камней до сих пор до конца не установлены, однако существуют теории, описывающие этапы образования холелитов, описанные на основе информации об их составе и структуре.

В данной работе внимание будет уделено аминокислотам в составе желчи, которые присутствуют в ней в свободном виде, как и во многих других биологических жидкостях человека, причем концентрация данных органических веществ может варьироваться как естественным, так и искусственным образом [14–16]. Известно, что аминокислоты могут оказывать влияние на состав и свойства карбоната кальция при осаждении его из водных растворов, а также ингибировать его кристаллизацию. Характер влияния аминокислот на образование CaCO_3 позволит определить потенциальную возможность использования данных соединений в качестве медицинских препаратов для профилактики и лечения холелитиаза на ранних стадиях.

Известно, что карбонату кальция свойственен полиморфизм. Данное соединение характеризуется наличием шести различных полиморфных модификаций: кристаллические – кальцит (стабилен), арагонит и ватерит (метастабильны); гидраты – моногидрокарбонат и икаит (гексагидрат); а также аморфный кальцит (моногидрат) [17]. Все эти модификации отличаются не только особенностями своего строения (кристаллохимическими параметрами), но и растворимостью в воде.

Особого внимания заслуживает тот факт, что в неорганической составляющей желчных камней преобладающей фазой является именно метастабильная модификация карбоната кальция – ватерит, а арагонит и кальцит содержатся в холелитах в примесных количествах, что непосредственно связано с условиями протекания процесса кристаллизации CaCO_3 [4,13,17–19]. Такая особенность фазового состава CaCO_3 , образованного в организме человека в естественных условиях, представляет интерес, так как может помочь открыть истинные механизмы и причины зарождения желчных

камней и разработать новые неинвазивные способы лечения и профилактики ЖКБ.

Целью работы является термодинамическое и экспериментальное моделирование влияния аминокислот гистидина (His), аргинина (Arg), метионина (Met) и триптофана (Trp) при варьировании их концентраций на состав и свойства карбоната кальция, осаждаемого из желчи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

Концентрации свободных аминокислот (АК) в желчи человека зависят от их концентраций в плазме крови и, как правило, имеют схожие значения. Таким образом, в качестве концентраций АК в пузырной желчи человека в работе будут использованы концентрации из [18].

В работе для изучения стабилизирующей активности АК по отношению к образованию ватерита выбирались концентрации АК в диапазоне от 10 до 50 ммоль/л, что на 1–2 порядка больше концентраций АК в плазме крови человека (табл. 1). При этом отношения концентраций АК к Ca^{2+} , вводимых в реакционную смесь, составляли 2:1, 1:1 и 1:10.

Для повышения точности и воспроизводимости результатов экспериментального моделирования, в работе при синтезе CaCO_3 решено использовать модельные концентрации ионов Ca^{2+} и HCO_3^- и аминокислот, в 10 раз превышающие средние концентрации этих же веществ в желчи человека. Такое пропорциональное увеличение сохраняет соотношения между концентрациями исследуемых веществ, не превышая при этом суммарную ионную силу (включая ионы Na^+ и Cl^-) раствора желчи, содержащего в норме и другие ионы, и позволяет проводить синтезы CaCO_3 в малых объемах.

Как уже было указано ранее, в исследовании будут рассмотрены 4 аминокислоты (табл. 1), которые представляют интерес с точки зрения их влияния на кристаллизацию и фазообразование CaCO_3 , основная информация об этих АК представлена в табл. 1.

Для синтеза карбоната кальция использовали гидрокарбонат натрия и дигидрат хлорида кальция, данные об их концентрациях в соответствии с пересчетом на модельные условия представлены в табл. 2.

Непосредственно перед проведением синтеза готовился модельный раствор желчи (желчь КРС сухая, очищенная, ТУ 10.02.01.112-89, ОМСКРЕ-АКТИВ).

Синтез образцов CaCO_3 осуществляется в соответствии с уравнениями:

Таблица 1. Аминокислоты, исследуемые в работе [18]

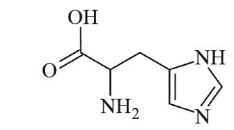
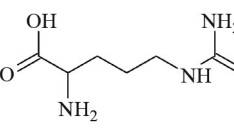
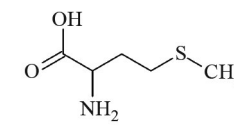
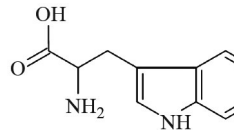
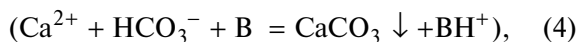
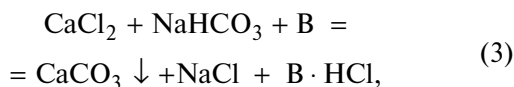
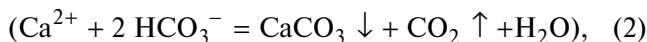
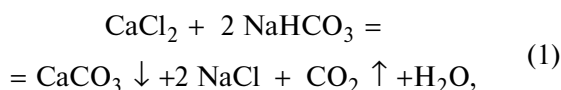
Название, сокращение	Структурная формула	M , г/моль	$C_{\text{средняя}}$, мкмоль/л	$C_{\text{модельная}}$, ммоль/л
Гистидин, His (H)		155.16	123	1.23
Аргинин, Arg (R)		174.20	132	1.32
Метионин, Met (M)		149.21	27	0.27
Триптофан, Trp (W)		204.23	60	0.60

Таблица 2. Характеристика реагентов

Реагент (формула)	Вводимый ион	M , г/моль	$C_{\text{средняя}}$ (иона), ммоль/л	$C_{\text{модельная}}$ (иона), ммоль/л
NaHCO_3	HCO_3^-	84.01	10	0.10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Ca^{2+}	147.01	12	0.12



(где В – органическое основание в составе желчи; например, желчная соль или лецитин), причем выход осадков указывает на то, что преимущественно протекает процесс по уравнениям (3),(4), а уравнения (1),(2) описывают побочный процесс.

Полученный раствор помещается в шкаф-термостат БИОТРОН-4 и выдерживается в нем 7 суток при температуре 310 ± 1 К. После выдержки раствор фильтровали, осадок на фильтре промывали и высушивали 24 ч в шкафу-термостате БИОТРОН-4

при 310 ± 1 К, затем 24 ч в эксикаторе при комнатной температуре до постоянной массы.

Методы анализа

Рентгенофазовый анализ (РФА). РФА полученных образцов проводился на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3М (Россия), излучения $\text{CuK}\alpha$. Первичная обработка спектров производилась в программе DifWin 1 (Россия). Качественный и количественный анализ фазового состава образцов осуществлялся в программе Match! 3 (Crystal Impact, Германия) на основе открытой кристаллографической базы данных (COD, 2020). Для интерпретации получаемых данных также использовалась литература [19].

ИК-фурье-спектроскопия (ИКФС). ИКФС порошков проводилась на спектрофотометре ФСМ-2202 (Инфраспек, Россия). Для исследования образец в виде порошка массой 0.5 мг смешивали с 50 мг КВг и прессовали в таблетку диаметром 3 мм, анализ проводился при комнатной температуре. Разрешение получаемых спектров – 4 см^{-1} ,

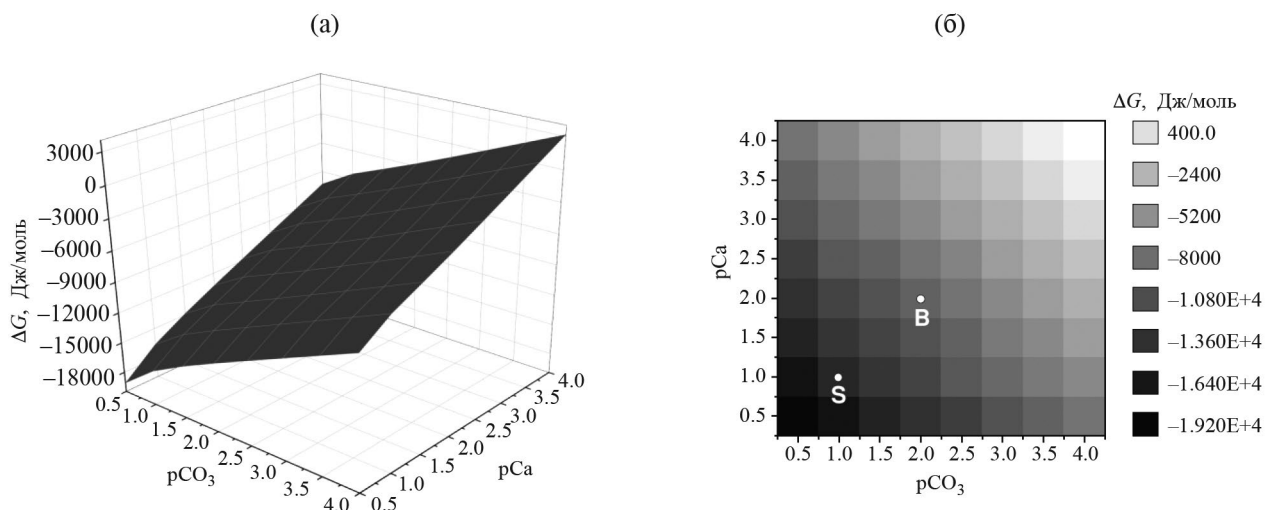


Рис. 1. Зависимости $\Delta G = f(pCa, pCO_3)$, представленные в а) объеме, б) проекции.

общее число сканирований – 32, область сканирования – от 400 до 4000 см^{-1} . Обработка ИК-спектров осуществлялась на основе литературных источников ИК-спектров неорганических соединений [20].

Оптическая микроскопия. Оптическая микроскопия синтезированных образцов проводилась с помощью микроскопа XSZ-107 (Армед, Россия) и оборудования TourCam (TourTek, Китай) с фотоматрицей 3,1 Мп. Микрофотографии получали с помощью программы TourView (TourTek, Китай). Данным методом исследовали морфология полученных частиц.

Фотонная корреляционная спектроскопия (ФКС). Определение гидродинамического радиуса частиц синтезированных порошков проводили методом ФКС на анализаторе размера частиц Photocor Compact (Фотокор, Россия) с применением оригинального пакета программ: Photocor-FC и DynaLS [21, 22].

Комплексонометрическое титрование. Определение содержания CaCO_3 в синтезированных образцах проводили методом КТ. Методика анализа разработана на основе ГОСТ 21138.5–78 [23] и ГОСТ 23268.5–78 [24] и адаптирована под исследуемый объект.

Термодинамическое моделирование. Теоретическая модель процесса формирования твердой фазы в системе $\text{Ca}^{2+} - \text{CO}_3^{2-}$ в желчи человека представляет собой гипотетический раствор, имитирующий содержание неорганических веществ, ионную силу, pH и температуру желчи взрослого среднестатистического человека [4, 18, 25, 26], учитывая средние значения данных показателей. Влияние органических макрокомпонентов желчи на кристаллизацию не учитывается.

Термодинамическое моделирование процесса кристаллизации карбоната кальция проводится с целью определения устойчивости раствора желчи как коллоидной системы, способной к зарождению новой фазы при изменении условий, полный алгоритм аналогичных расчетов приведен в [27].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты термодинамического моделирования

По рассчитанным значениям условных произведений растворимости для CaCO_3 была построена трехмерная зависимость $\Delta G = f(pCa, pCO_3)$ процесса кристаллизации без учета влияния комплексобразования с аминокислотами. На рис. 1а данная зависимость показана в объеме, на рис. 1б – в проекции (вид сверху). На рис. 1б отмечено две точки: точка В описывает нормальное состояние желчи; точка S – состояние системы, создаваемое при синтезах образцов CaCO_3 в работе.

Из построенных диаграмм видно, что обе рассматриваемые точки лежат в области $\Delta G < 0$, что свидетельствует о склонности системы $\text{Ca}^{2+} - \text{CO}_3^{2-}$ к образованию твердой фазы CaCO_3 в модельном растворе желчи человека, как в условиях синтеза, так и в норме. Рассчитанные значения ΔG (в норме) = -8.57 кДж/моль, ΔG (в синтезе) = -14.4 кДж/моль отличаются незначительно, но при этом в норме в желчи не происходит образования осадка, а в условиях синтеза образуется твердая фаза со средним выходом порядка 70%. В данном случае можно сделать вывод о том, что в реальных условиях в желчи наблюдается один из двух путей реализации устойчивого состояния: или какие-то из органических макрокомпонентов желчи (к примеру, лецитин) непосредственно

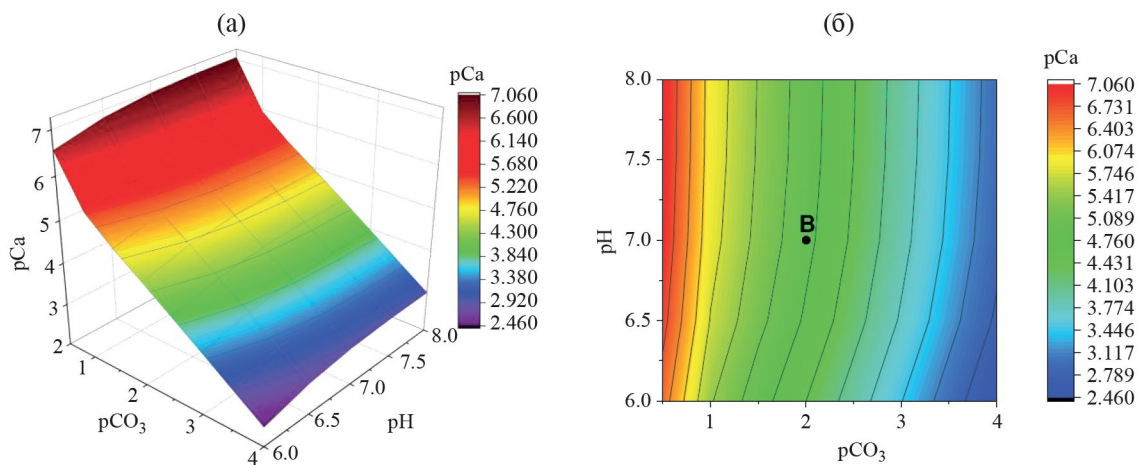


Рис. 2. Поле устойчивости ватерита без учета комплексообразования, представленное в а) объеме; б) проекции.

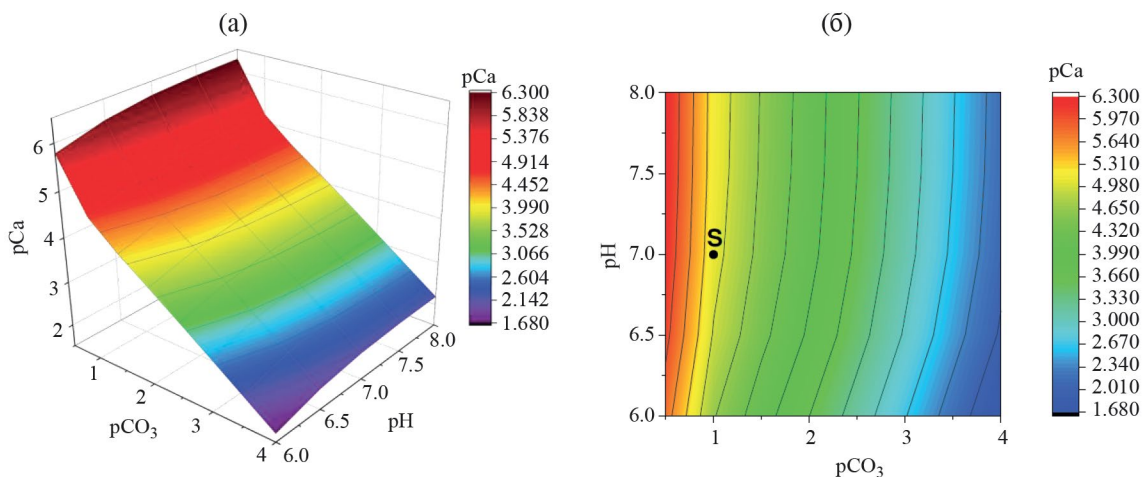


Рис. 3. Поле устойчивости ватерита с учетом комплексообразования с NiS, представленное в а) объеме; б) проекции.

ингибируют формирование CaCO_3 , повышая величину ΔG (в норме), или же величина изменения энергии Гиббса возрастает опосредованно, за счет связывания части осадкообразующих ионов в мицеллы и везикулы. Для более полного понимания данного явления были построены поля устойчивости CaCO_3 .

Поле устойчивости CaCO_3 – это трехмерная диаграмма (поверхность) функции $p\text{Ca} = f(p\text{CO}_3, \text{pH})$ при $SI = 0$. Выше данной поверхности на графике система существует в виде идеального раствора, твердая фаза не образуется ($SI < 0, \Delta G > 0$). Ниже данной поверхности фигуративные точки системы описывают двухфазное состояние, образуется осадок ($SI > 0, \Delta G < 0$). На рис. 2а, б изображено поле устойчивости карбоната кальция (ватерита) для модельного раствора желчи без учета комплексообразования.

Точка В, изображенная на рис. 2б, описывает состояние желчи в норме и лежит ниже поля устойчивости. Рассчитанное значение SI (в норме) = 1.48 для $p\text{Ca} = 1.9$ и $p\text{CO}_3 = 2.0$ при $\text{pH} = 7$ соответственно (с учетом условного произведения растворимости $K_{\text{sp},310}^{\text{cond}} = 1.29 \times 10^{-7}$). Таким образом, желчь в норме пересыщена осадкообразующими ионами ($SI > 0$) и склонна к образованию новой фазы ($\Delta G < 0$). Ее устойчивость обуславливается тем, что в реальности желчь существует в виде дисперсной системы, где лецитин и желчные кислоты способны связывать часть ионов Ca^{2+} в мицеллы и везикулы [4], поэтому в норме образования осадка не наблюдается, несмотря на $SI > 0$ и $\Delta G < 0$.

На рис. 3а, б изображено поле устойчивости карбоната кальция (ватерита) для модельного раствора желчи с учетом комплексообразования с гистицином при его концентрации, равной $10C_{\text{мод}}$.

Сравнивая данное поле устойчивости с тем, которое представлено на рис. 1 и 2 для случая отсутствия комплексообразования, видно, что поле сдвинуто вниз по оси pCa примерно на единицу (в пересчете на концентрацию смещение на порядок). Это доказывает, что процесс комплексообразования увеличивает область с $SI < 0$ на диаграмме, таким образом, введение аминокислоты в достаточной концентрации приводит к повышению стабильности рассматриваемой системы. При этом качественных изменений в вид поля устойчивости образование комплексного соединения не вносит.

Фигуративная точка S на рис. 3б описывает состояние системы в условиях синтеза образца H5 карбоната кальция. Данная точка расположена ниже поля устойчивости, и при $pCa = 0.9$, $pCO_3 = 1.0$, $pH = 7$, $K_{sp,310}^{cond} = 8.31 \times 10^{-7}$ значение индекса пересыщения SI (в синтезе) = 2.10 ($SI > 0$, $\Delta G < 0$). Несмотря на влияние на процесс образования комплексного соединения ионов кальция с гистицином, индекс пересыщения имеет достаточно высокое значение и показывает теоретическую возможность образования твердой фазы в рассматриваемой системе, хоть и с меньшим выходом, чем в отсутствие данной аминокислоты. Однако следует отметить, что в синтезах с более низкими концентрациями гистицина закомплексованность ионов кальция будет снижаться, и мольная доля свободных ионов Ca^{2+} будет возрастать, что в теории должно привести к увеличению выхода данных образцов.

Результаты экспериментального моделирования

Ранее нами был осуществлен синтез карбоната кальция из содержащих желчь растворов [28]. Выявлено, что образцы, синтезированные в отсутствие желчи и при ее концентрации в растворе 1 мас. %, состоят из кальцита. Увеличение концентрации желчи в исходном растворе синтеза от 5 до 100 мас.% способствует кристаллизации ватерита. При исследовании влияния желчи на массу твердой фазы установлено, что масса осадка возрастает пропорционально росту концентрации желчи в исходном растворе.

Выход образцов $CaCO_3$, синтезированных в данном исследовании, усреднен и представлен в табл. 3. Видно, что в синтезе с $10C(His)_{mod}$ выход карбоната кальция меньше, чем в синтезе без аминокислот ($0C_{mod}$). Стоит отметить, что наблюдается снижение величины выхода продукта с увеличением концентраций His и Met, что коррелирует с результатами термодинамического моделирования. Однако следует учитывать тот факт, что выход $CaCO_3$ в синтезах с аргинином и триптофаном увеличивается с ростом концентрации данных аминокислот.

Таблица 3. Выход образцов $CaCO_3$, полученных в работе

C(AK)	Выход образцов $CaCO_3$, %			
	His	Met	Arg	Trp
$0C_{mod}$	72.6			
$0.5C_{mod}$	77.0	67.4	68.7	75.5
$1C_{mod}$	75.8	69.2	75.6	67.5
$2C_{mod}$	70.1	67.9	87.7	85.8
$10C_{mod}$	61.4	64.7	93.8	93.7

Для более полного и корректного объяснения зависимостей выхода твердой фазы в синтезах от различных факторов необходимо определить содержание $CaCO_3$ в составе полученных порошков, это установлено с помощью комплексонометрического титрования. В среднем примерно половина от всего осадка в полученных образцах представлена органической составляющей. Содержание карбоната кальция варьируется. В синтезах с His и Arg наблюдается рост содержания $CaCO_3$ в твердой фазе при увеличении концентрации этих аминокислот в желчи. Это может быть связано с тем, что данные аминокислоты имеют основной характер. Аминокислоты Met и Trp не имеют каких-либо сходств в своем строении и кислотно-основных свойствах, однако проявляют схожий эффект по отношению к карбонату кальция: содержание последнего в образцах уменьшается при увеличении концентрации аминокислот, то есть данные аминокислоты проявляют ингибирующее действие на кристаллизацию $CaCO_3$.

Для синтезов с Met и Arg зависимости на рис. 4а, б соответственно имеют экспоненциальный вид, что видно из коэффициентов корреляции при наложении такой зависимости на имеющиеся точки (рис. 4в, г).

Можно заметить, что в отличие от среднего общего выхода (порядка 70%) средний выход образцов в пересчете на карбонат кальция составляет всего порядка 30%. При этом в синтезе с Met наблюдается небольшое уменьшение, а в синтезе Arg – небольшое увеличение выхода чистого $CaCO_3$ с ростом концентрации данных аминокислот в желчи. Можно отметить общее индуцирующее действие Arg и ингибирующее действие Met на процесс образования осадка в желчи.

Таким образом, достоверного прямого комплексообразования между вводимыми аминокислотами и ионами кальция, описанного термодинамическим моделированием, в реальности не наблюдается. Влияние аминокислот на выход продукта носит опосредованный характер и связано, вероятно, с органическими макрокомпонентами

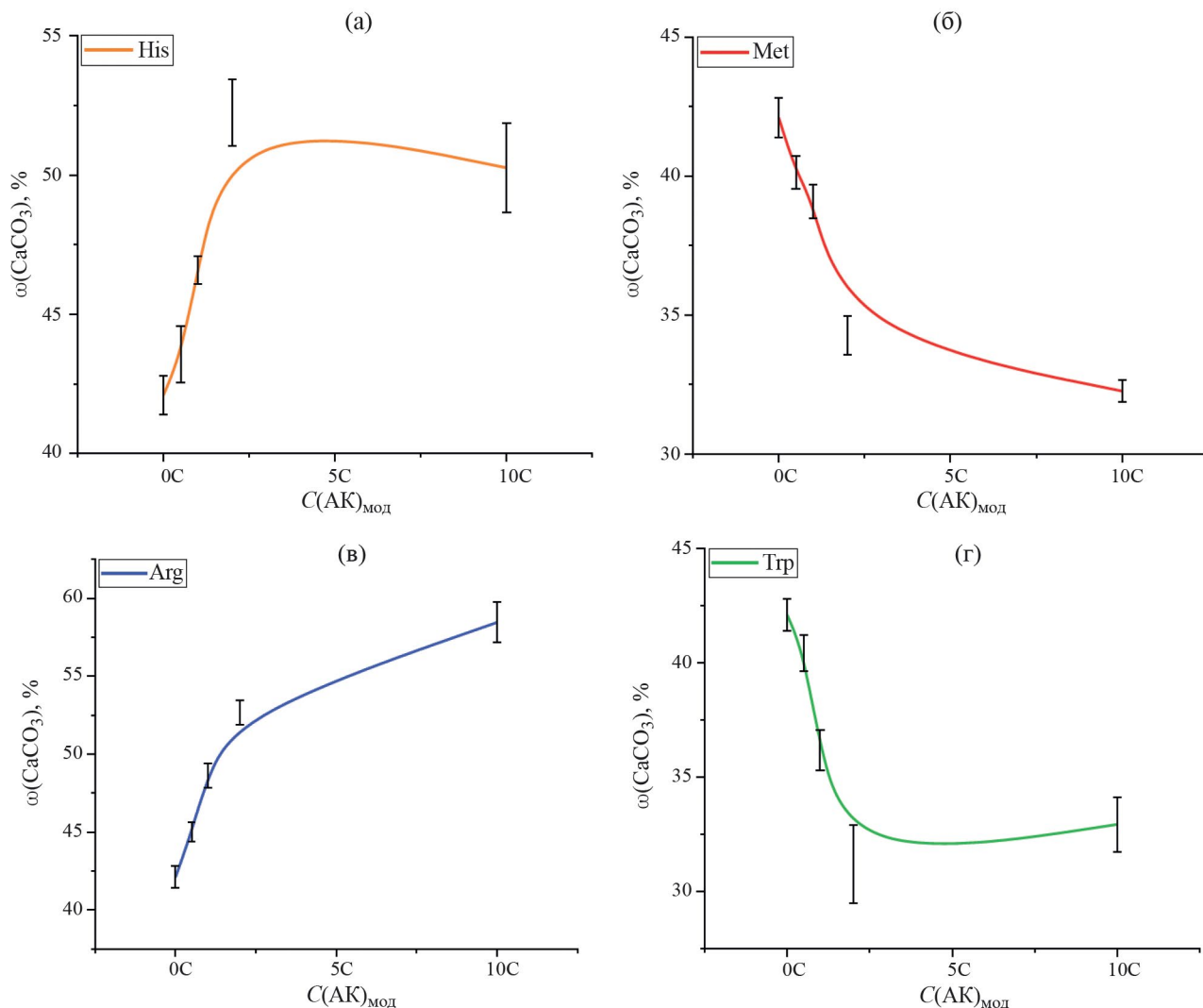


Рис. 4. Зависимость содержания CaCO_3 в синтезированных образцах от концентрации АК в желчи: а) His, б) Met, в) Arg, г) Trp.

желчи. Это объяснимо тем, что вводимые концентрации аминокислот в синтезах малы относительно концентраций макрокомпонентов желчи, способных к связыванию данных аминокислот в мицеллы и везикулы (лецитин, билирубин, желчные кислоты).

Исследование образцов методом РФА показало присутствие ватерита в качестве основной фазы в составе всех образцов, пики при углах 2θ : 24.9, 27.0, 32.7, 44.5, 50.0 $^\circ$ являются наиболее интенсивными и визуально различимы. Арагонит (2θ : 26.3, 27.3, 38.5, 33.2, 36.2, 43.0, 46.0 $^\circ$) и кальцит (2θ : 29.4, 39.5, 43.1, 48.5 $^\circ$ и др.) также обнаружены во всех образцах, однако в значительно меньшем количестве. Дифрактограммы всех синтезированных образцов CaCO_3 имеют почти идентичный вид, отличаясь лишь небольшим набором пиков

и их относительной интенсивностью (рис. 5). Для всех синтезов можно отметить смещение характеристических углов рассеяния в область меньших 2θ (максимальный сдвиг порядка 1.0 $^\circ$) без изменения общего вида спектра при повышении концентраций аминокислот в желчи. Более подробный количественный РФА установил содержание ватерита, арагонита и кальцита в составе CaCO_3 в твердой фазе.

На ИК-спектрах полученных образцов (рис. 6, пример с His) наблюдается наличие всех характеристических колебаний для тетраэдрического CO_3^{2-} аниона: невырожденное полностью симметричное изменение длин валентных связей ν_1 (ν_s) при 1040–1110 cm^{-1} ; дважды вырожденное состояние симметричной деформации противоположащих углов между связями ν_2 (δ_s) при 856–875 cm^{-1} ; трижды

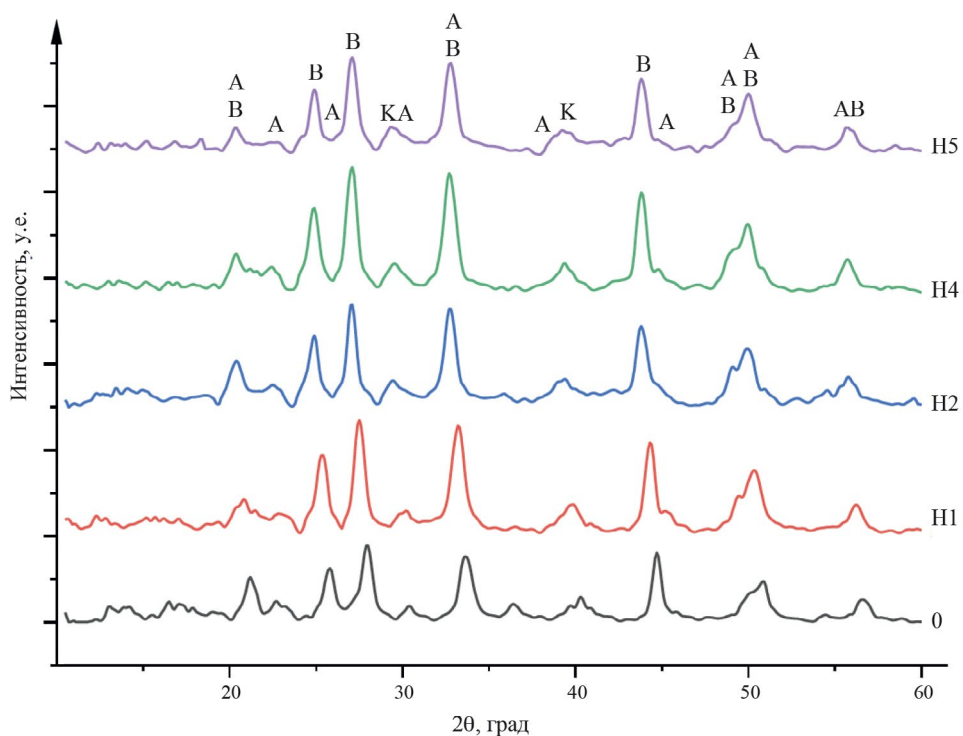


Рис. 5. Дифрактограммы образцов CaCO_3 , полученных в присутствии NiS в желчи (А – арагонит, В – ватерит, К – кальцит).

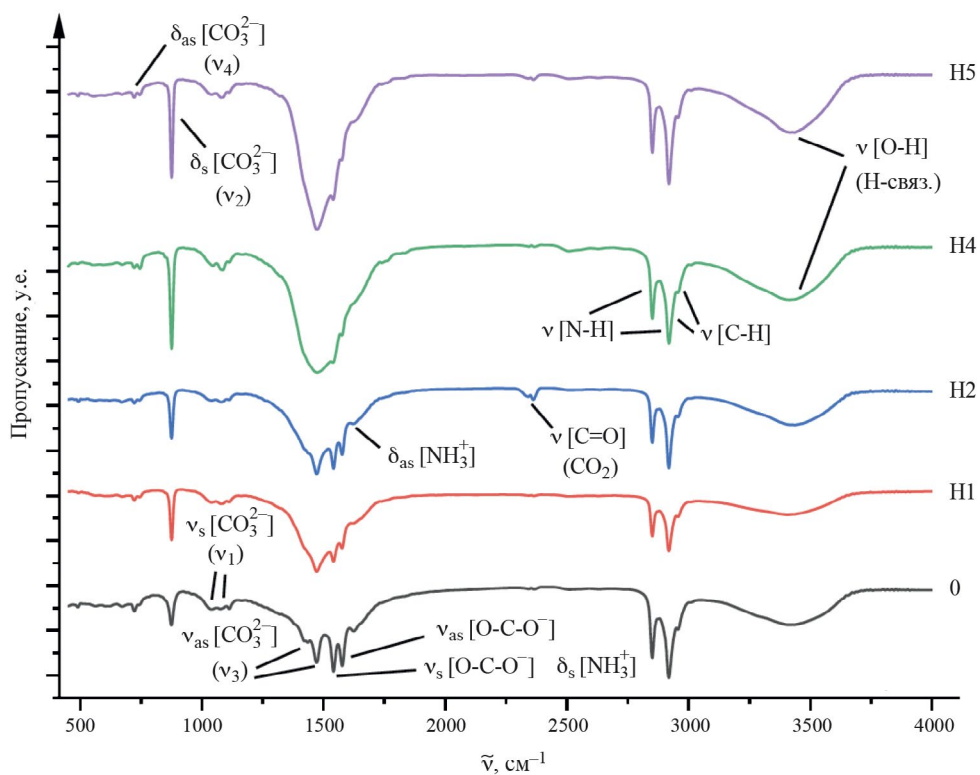


Рис. 6. ИК-спектры образцов CaCO_3 , полученных в присутствии NiS в желчи.

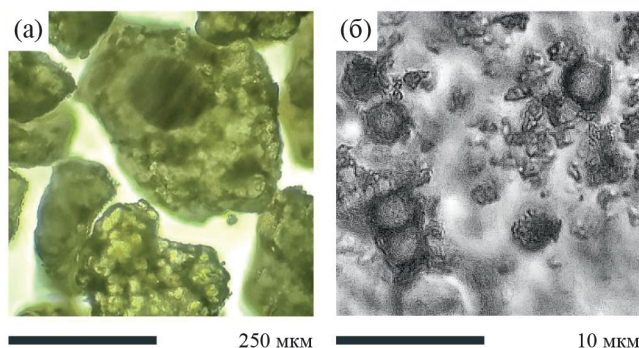


Рис. 7. Микрофотографии образца CaCO_3 , синтезированного в желчи без АК (а – неизмельченные агломераты, б – сферолиты ватерита в измельченном порошке).

вырожденные антисимметричные изменения длин валентных связей ν_3 (ν_{as}) при $1408\text{--}1490\text{ см}^{-1}$; трижды вырожденные изменения длины одной из связей, приводящее к изменению валентных углов ν_4 (δ_{as}) при $700\text{--}745\text{ см}^{-1}$.

Все остальные полосы в ИК-спектрах характеризуют функционально-групповой состав органической составляющей полученных порошков. Все образцы характеризуются наличием пиков у $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, включающих в себя валентные колебания связей [C–H], перекрывающиеся валентными колебаниями связи [N–H], характерными для билирубина, лецитина и аминокислот. Во всех спектрах при $3200\text{--}3700\text{ см}^{-1}$ наблюдается широкая полоса колебаний связи [O–H], включенной в водородную связь, характерная для холестерина и лецитина. При 2350 см^{-1} наблюдаются паразитные пики валентных колебаний [C=O] CO_2 воздуха, не относящиеся к исследуемым образцам. В области $1500\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ наблюдается набор пиков, характеризующих наличие валентных колебаний карбоксилат-аниона [O–C–O⁻] и деформационных колебаний связи [N–H] в билирубине и группы [NH₃⁺] в аминокислотах.

С ростом концентраций аминокислот становятся более интенсивными пики деформационных колебаний группы [NH₃⁺] и валентных колебаний группы [O–C–O⁻] при $1540\text{--}1640\text{ см}^{-1}$, что может говорить о повышении содержания данных аминокислот в составе синтезированных порошков, где они могут присутствовать как в свободном виде в смеси с аморфной органической фазой, так и в адсорбированном состоянии на поверхности кристаллических фаз карбоната кальция.

Все образцы карбоната кальция, синтезированные в работе, представляют собой тонкодисперсные порошки (пудровая текстура) с включениями чуть более крупных частиц агломератов (рис. 7а, б). Данные агломераты представляют собой частицы,

сформированные сросшимися фрагментами сферических кристаллов ватерита, кристаллов моногидрата холестерина и аморфных органических частиц.

На рис. 7а заметно наличие непрозрачной сферической сердцевины в сформированной частице агломерата. Можно предположить, что центр такого микролита сформирован сферолитом ватерита (рис. 7б), а внешняя часть представлена кристаллами смешанной природы (в том числе холестерина).

Анализ результатов оптической микроскопии показал, что основу всех образцов составляют сферолитические микрочастицы ватерита (визуально различимы микрокристаллы от 0.5 до 10 мкм), что согласуется с проведенными исследованиями [4, 27]. В синтезах с His и Met наблюдается большое количество агломерированных частиц, аморфных включений органической природы. При этом число сферолитов ватерита уменьшается с увеличением концентрации данных аминокислот в желчи. Для образцов, синтезированных с Arg и Trp, наблюдается наибольшее число сферических частиц ватерита, причем с ростом концентрации аминокислот в желчи происходит увеличение числа таких частиц и уменьшение их среднего размера.

Методом ФКС были установлены размеры и доли частиц во фракциях порошка размером менее 10 мкм для всех исследуемых образцов. Для большинства образцов наблюдается тримодальное распределение частиц по размерам, таким образом, порошки характеризуются наличием трех фракций: I фракция – частицы радиусом порядка сотых микрометра; II фракция – частицы радиусом порядка десятых микрометра; III фракция – частицы радиусом порядка единиц микрометра (рис. 8а–г).

В ряде образцов распределение микрочастиц по размерам носит бимодальный характер, а первая фракция отсутствует полностью. Рассматривая фракционный состав полученных образцов CaCO_3 , методом однофакторного дисперсионного анализа (STATIC2) можно определить наличие зависимостей между концентрацией аминокислот в желчи, размером частиц каждой из фракций и их долей в составе общей фракции с радиусами менее 10 мкм . В синтезе с His при увеличении концентрации аминокислоты в желчи происходит рост размера частиц II и III фракций, понижение их содержания и увеличение доли I фракции (ее появление в составе осадков наблюдается при увеличении $C_{\text{мод}}$ гистидина до $2C_{\text{мод}}$ и $10C_{\text{мод}}$).

Во всех образцах, полученных с Met, наблюдается появление I фракции только при концентрации метионина $1C_{\text{мод}}$. Размер частиц практически не изменяется (незначительно снижается после скачкообразного увеличения при $1C_{\text{мод}}$) при увеличении концентрации Met в желчи, однако содержание II

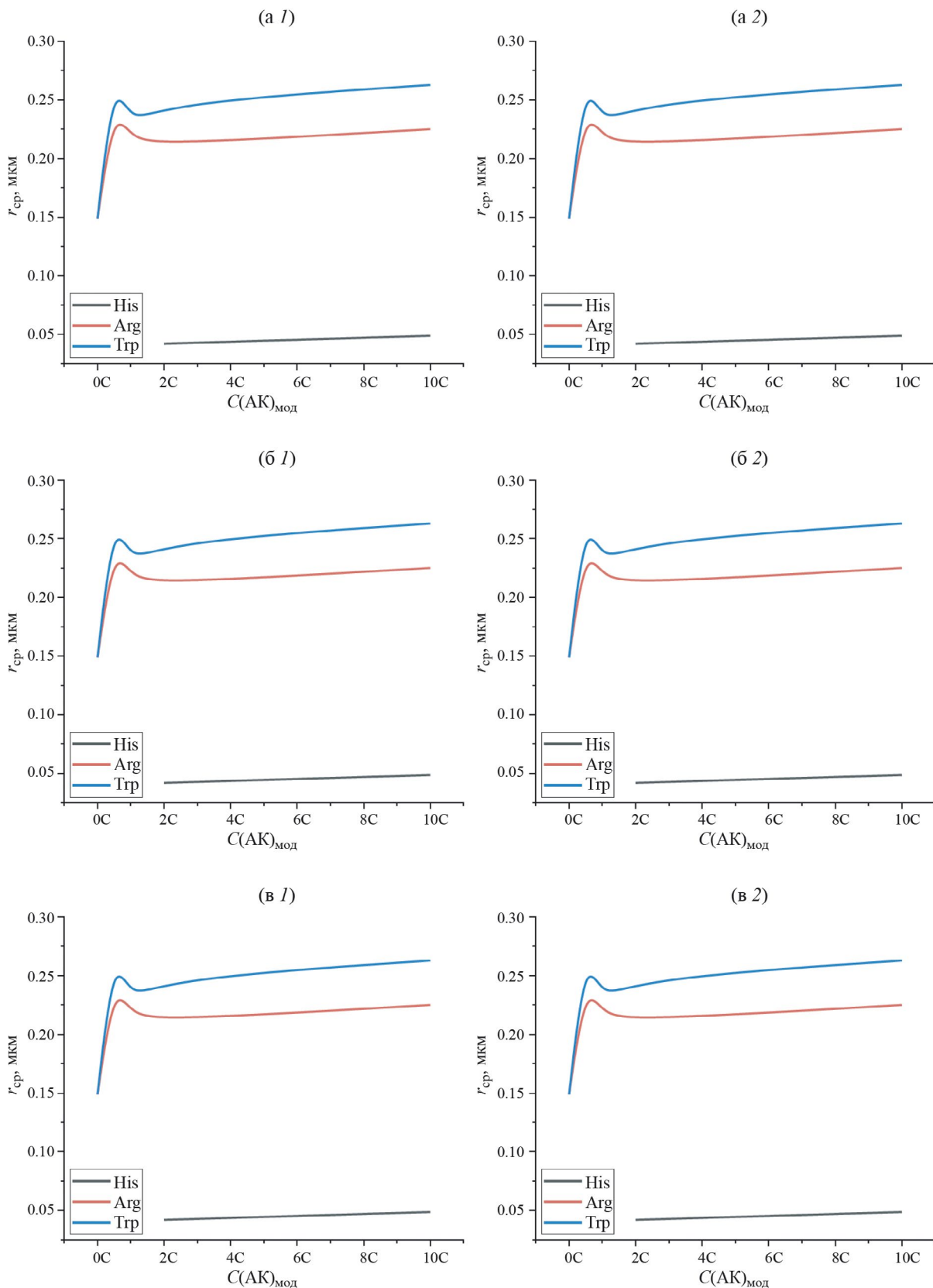


Рис. 8. Зависимости радиуса микрочастиц (1) и доли микрочастиц карбоната кальция (2) от концентрации АК: а) I фракция; б) II фракция; в) III фракция.

и III фракций варьируется, при $1C_{\text{мод}}$ происходит скачкообразное изменение их содержаний.

Образцы, полученные в присутствии Arg, характеризуются полным набором всех трех фракций. Радиусы частиц практически не изменяются при увеличении концентрации аминокислоты в желчи, однако средний размер I фракции достоверно отличается от размера частиц, полученных в отсутствие аминокислот. Для II и III фракций наблюдается скачкообразное изменение их долей при $1C_{\text{мод}}$ аргинина с повышением доли II и снижением доли III фракций при дальнейшем введении АК.

Синтезированные с Tgr осадки характеризуются I фракцией, достоверно большей по размерам, чем образцы без АК, при этом с ростом концентрации Tgr размеры I и II фракций практически не изменяются, а размер III фракции возрастает. Доля I и II фракций снижается, а III – увеличивается при повышении концентрации Tgr в желчи. Такой эффект снижения доли “крупных” частиц и повышения доли “малых” может иметь ингибирующее действие на рост и агрегацию образующихся холелитов.

ВЫВОДЫ

Термодинамическим моделированием процесса кристаллизации CaCO_3 в желчи установлено, что в норме желчь пересыщена ионами Ca^{2+} и HCO_3^- , поэтому ее стабильность обусловлена существованием данного раствора в виде коллоидной системы, самопроизвольно снижающей величины SI путем мицеллообразования. Введение аминокислот в достаточной концентрации приводит к повышению стабильности желчи за счет снижения мольной доли свободных ионов Ca^{2+} .

Установлено содержание CaCO_3 в составе твердой фазы всех синтезированных образцов. Максимальный выход по CaCO_3 имеют образцы, полученные с Arg, минимальный выход – с Met. Повышение концентрации аминокислоты приводит к росту массовой доли карбоната кальция в случае с His и Arg и к ее снижению в синтезах с Met и Tgr. Важно ингибирующее действие Met на кристаллизацию CaCO_3 и на осадкообразование в желчи в целом.

Для аминокислот Met и Arg установлен их стабилизирующий эффект по отношению к метастабильному арагониту: с ростом их концентрации в желчи происходит увеличение массовой доли арагонита в составе твердой фазы.

Оптическая микроскопия показала присутствие сферолитов ватерита во всех полученных порошках. Методом ФКС установлено, что микрочастицы карбоната кальция радиусом менее 10 мкм представлены тремя фракциями. Наибольший интерес представляют синтезы с His и Tgr, в которых с ростом концентраций аминокислот наблюдается

увеличение доли мелкогазированной фракции и снижение доли крупногазированной. Радиусы частиц всех фракций при этом возрастают. Результаты ИКФС коррелируют с данными РФА.

Таким образом, исследованные аминокислоты имеют потенциальную возможность использования их в качестве медицинских препаратов для лечения и профилактики микрохолелитиаза.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 075-03-2023.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sen T.S., Jian S., Xiao H.W., et al.* // J. of Digestive Diseases. 2020. V. 21. № 4. P. 237.
2. *Wirth J., Joshi A.D., Song M., et al.* // Am. J. Clin. Nutr. 2020. V. 112. № 3. P. 586.
3. *Littlefield A., Lenahan C.* // J. Midwifery Womens Health. 2019. V. 64. № 3. P. 289.
4. *Голованова О.А.* Желчные камни: монография. Омск: Наука, 2012. 126 с.
5. *Тихонов Д.Г.* // Якутский мед. журн. 2015. № 4. С. 91.
6. *Neubrand M.W., Carey M.C., Laue T.M.* // Biochemistry. 2015. V. 54. № 45. P. 6783.
7. *Lu J., Wu D., Chen L., et al.* // J. Chem. Eng. 2014. V. 59. № 8. P. 2614.
8. *Сайфутдинов Р.Г., Рыжкова О.В., Трифонова Э.В.* // Практическая медицина. 2011. № 50. С. 17.
9. *Atkins P., de Paula J.* New York: W.H. Freeman and Company, 2014. 1040 p.
10. *Yu J.-K., Pan H., Huang S.-M., et al.* // Asian J. of Surgery. 2013. V. 36. № 1. P. 26.
11. *Serov N., Darmoroz D., Lokteva A., et al.* // Chem. Commun. 2020. V. 56. P. 11969.
12. *Машина Е.В., Макеев Б.А., Филиппов В.Н.* // Изв. томск. политехн. ун-та. 2015. Т. 326. № 1. С. 34.
13. *Evans D., Webb P.B., Penkman K., et al.* // Cryst. Growth Des. 2019. V. 19. № 8. P. 4300.
14. *Hou W.-T., Feng Q.-L.* // Cryst. Growth Des. 2006. V. 6. № 5. P. 1086.
15. *Golovanova O.A., Tomashevsky I.A.* // Rus. J. of Phys. Chem. A. 2019. V. 93. № 1. P. 7.
16. *Golovanova O.A., Chikanova E.S.* // Crystallog. Reports. 2015. V. 60. № 6. P. 970.
17. *Du H., Steinacher M., Borca C., Huthwelker T., et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140. № 43. P. 14289.
18. *Mappu P., Греннер Д., Мейес П., и др.* Биохимия человека в 2-х томах: пер. с англ. М.: Мир; Бином, 2009. 797 с.
19. *Al Omari M.M.H., Rashid I.S., Qinna N.A., et al.* In: Brittain H.G., editor, Profiles of Drug Substances,

- Excipients and Related Methodology. V. 41. Burlington: Academic Press, 2016. P. 131.
20. *Сильверстейн Р., Вебстер Ф., Кимл Д.* Спектроскопическая идентификация органических соединений; пер. с англ. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2014. 557 с.
21. *Марахова А., Жилкина В., Блынская Е., и др.* // Наоиндустрия. 2016. № 1(63). С. 88.
22. ГОСТ Р 8.774–2011 Дисперсный состав жидких сред. Определение размеров частиц по динамическому рассеянию света. М.: Стандартинформ, 2019. 8 с.
23. ГОСТ 21138.5–78 Мел. Метод определения массовой доли углекислого кальция и углекислого магния. М.: Издательство стандартов, 1992. 5 с.
24. ГОСТ 23268.5–78 Воды минеральные питьевые лечебные, лечебно-столовые и природные столовые. Методы определения ионов кальция и магния. М.: ИПК Издательство стандартов, 2003. 34 с.
25. *Барон Н.М., Пономарева А.М., Равдель А.А., и др.* Краткий справочник физико-химических величин. СПб.: “Иван Федоров”, 2003. 240 с.
26. *Golovanova O.A.* J. of thermal analysis and calorimetry. 2018. V. 133. № 2. P. 1219.
27. *Голованова О.А., Леончук С.С.* // Вестник НовГУ. 2020. Т. 121. № 5. С. 78.
28. *Голованова О.А.* // Химия в интересах устойчивого развития. 2021. № 29. С. 27.