

ОБЗОРЫ

УДК 548.5. 546.02

**КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ОДНОВОДНОГО ОКСАЛАТА КАЛЬЦИЯ
В ПРИСУТСТВИИ АМИНОКИСЛОТ, ОСОБЕННОСТИ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ****О.А. Голованова¹, Ю.О. Пунин², А.Р. Изатулина², В.В. Корольков¹**¹ Омский государственный университет

E-mail: golovanova2000@mail.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет

E-mail: alina.izatulina@mail.ru

Статья поступила 4 февраля 2014 г.

В работе исследуется белковый состав органической компоненты мочевых камней и влияние основных аминокислот физиологического раствора на процесс кристаллизации оксалата кальция. С помощью комплексной методики проведен анализ белковых соединений в 40 образцах мочевых камней, полученных как путем открытого оперативного вмешательства, так и с помощью дистанционной литотрипсии. Установлена сильная и при этом избирательная концентрация аминокислот в камнях разного типа по сравнению с формирующими их физиологическими жидкостями. В работе исследованы процессы нуклеации и кинетика кристаллизации одноводного оксалата кальция в модельных растворах без примесей и с добавками 13 аминокислот. Разные аминокислоты могут как ингибировать, так и промотировать эти процессы в зависимости от строения кислоты.

Ключевые слова: камни мочевой системы, кинетика кристаллизации, нуклеация, белковая составляющая, аминокислотный состав, одноводный оксалат кальция.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы границы собственно минералогических исследований биоминерализации существенно расширились. В круг объектов минералогии в настоящее время включены неорганические биообразования, в том числе продукты нормального метаболизма (зубы, кости скелета, скорлупа птичьих яиц и т.д.) и патологического функционирования организма (желчные, зубные, почечные камни и т.д.).

Мочекаменная болезнь, которая приводит к образованию камней в почках, занимает третье место по распространенности среди всех урологических заболеваний. Около 5 % мирового населения сегодня страдают мочекаменной болезнью, и, по прогнозам специалистов, в будущем их количество будет только расти. В России насчитывается до 3 % людей, страдающих мочекаменной болезнью. Проблема камнеобразования сегодня становится более осознанной и реальной угрозой для жителей всех стран, в особенности мегаполисов. По статистике на протяжении всего XX в. различные болезни, приводящие к образованию камней в органах человека, лишь увеличивали скорость их распространения по всей планете [1–5]. Камни, увы, образуются в любом возрасте — даже у самых маленьких детей с рождения. В 7 % всех случаев мочекаменной болезни заболевание наблюдается у детей в возрасте до 16 лет. Но, по статистике, большинство заболевших находится в самом трудоспособном возрасте — от 20 до 49 лет, а пик заболеваемости приходится на людей в возрасте 35–45 лет. Причем мужчины подвергаются этому недугу в 3 раза чаще, чем женщины [4–11].

Получается, что камнеобразование — это сегодня уже серьезная проблема глобального масштаба, к которой нельзя относиться без должного внимания. Однако современная медицина все еще не полностью разобралась в причинах образования в организме человека различных камней. Рост распространенности почечнокаменной болезни именно в городах медики связывают с увеличением потребления пищи, богатой жирами и животными белками. Особенно важным негативным фактором, влияющим на уровень риска образования камней в организме человека, является экологическая обстановка в крупных городах [8—16].

Для понимания патогенеза уролитиаза трудно обойтись без изучения конечного результата процесса, т.е. состава и структуры самого камня. Точное знание химического и минерального состава камня определяет тактику лечения рецидивов, на долю которых приходится около 25 % всех случаев мочекаменной болезни. Совершенствование методов исследования состава, структуры и процессов образования мочевых камней представляется особенно актуальным. Результаты таких исследований имеют большое значение в разработке новых методов научно обоснованного лечения больных.

Мочевые камни бывают одиночными и множественными, их количество может достигать тысячи, а величина варьировать от 1 мм до 15 см и более [4—11]. При этом камни имеют сложный и неоднородный состав, в связи с чем некоторые авторы такие образования предлагают называть смешанными [4—7, 9—11]. Так, доля смешанных оксалат-фосфатных камней по данным разных исследователей колеблется от 6,9 до 59,4 %, уратных — от 5 до 50 % и т.д. Однако в целом наиболее распространенными среди мочевых камней являются оксалатные камни, сложенные минералами уэвеллитом $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и уэдделлитом $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Эти минералы могут также входить в состав зубных, желчных камней, камней слюнных желез. Кроме того, их обнаруживают в минеральных отложениях в легких, сосудах, селезенке, в предстательной и поджелудочной железах, в мышцах и суставах [8]. Отсюда понятна значимость изучения кристаллизации оксалатов кальция в условиях, приближенных к физиологическим.

Известно [17—20 и др.], что наряду с минеральной компонентой мочевые камни содержат органическую составляющую. По данным разных исследователей, ее содержание в камнях колеблется в значительных пределах, от единиц до десятков массовых процентов. В настоящее время единой теории, объясняющей природу взаимодействия минеральной и органической составляющих мочевых камней, не существует. Многие исследователи отмечают, что именно специфичность органической компоненты контролирует в значительной степени процесс патологического фазообразования в организме человека [21—35 и др.]. Поэтому проблема исследования органической составляющей патогенных агрегатов остается актуальной.

Органические вещества белковой природы, являющиеся компонентами биологической жидкости, оказывают большое влияние на характер процесса кристаллизации минералов почечных камней и, в частности, оксалатов кальция [34, 35]. На данный момент опубликовано немало работ о влиянии примесного состава раствора на фазовый состав осадков и кинетику осаждения оксалатов из водных растворов [21—41]. Несмотря на это сведений о характере кристаллизации оксалата кальция в сложных физиологических растворах недостаточно. Новые данные по изучению кристаллизации оксалата кальция из растворов в присутствии аминокислот необходимы как с медицинской точки зрения для предупреждения образования оксалатных биоминералов в организме человека, так и с точки зрения фундаментальной перспективы понимания процессов биоминерализации.

Ранее нами были проведены исследования фазообразования и кристаллизации в оксалатных растворах, содержащих аминокислоты [23, 25—27, 34, 35, 39—41]. В частности, в работе [39] изучалось воздействие широкого набора аминокислот, входящих в состав почечных камней (14 наименований), на процесс нуклеации уэвеллита, а в работе [40] — влияние этих аминокислот на процесс роста кристаллов оксалата кальция.

Целью данной работы является детальное определение белкового состава органической компоненты мочевых камней и выяснение влияния основных аминокислот физиологического раствора на процесс кристаллизации оксалата кальция.

МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследований послужила коллекция камней жителей Омского региона: мочевые камни (40 образцов), полученные как путем открытого оперативного вмешательства, так и с помощью дистанционной литотрипсии. В процессе работы была использована комплексная методика анализа белковых соединений в мочевых камнях.

При изучении срезов и шлифов во всех образцах почечных камней фиксировалось наличие органической неминеральной составляющей методом качественного анализа [18, 19]. Суммарное содержание белка определяли по методу Кельдаля [19, 20], количественное определение неминерального азота проводили для образцов, в которых отсутствуют азотсодержащие минералы (струвит и ураты). Предел обнаружения белковых соединений при использовании данной методики — 10—3 мас. %, относительное стандартное отклонение составило 0,02.

Для определения доли водорастворимой составляющей белковой фракции мочевых камней было проведено усовершенствование методики фотометрического определения белков по Бенедикту [19, 20]. Качественный и количественный аминокислотный состав почечных камней определяли методом ионообменной колоночной хроматографии (анализатор Т-339). Пороговая чувствительность метода — 10—4 мас. %, относительное стандартное отклонение 0,04.

Процесс кристаллизации моногидрата оксалата кальция — увеллита изучали при температуре 20—23 °С и трех основных значениях пересыщений растворов оксалата кальция $\gamma = C_0/C_s = 5, 7$ и 10 (C_0 — концентрация оксалата кальция в пересыщенном растворе; C_s — растворимость оксалата кальция, равная $0,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Были проведены также дополнительные опыты при $\gamma = 12, 15, 20, 25$ для получения более полной информации. Выбор основных значений γ обоснован наличием таких пересыщений в биологических средах, а именно в моче здорового взрослого среднестатистического человека [39].

Пересыщение по оксалату кальция создавали за счет химической реакции: $\text{Ca}^{2+} + \text{C}_2\text{O}_4^{2-} \rightarrow \text{CaC}_2\text{O}_4$, которая реализовывалась при смешении исходных растворов стехиометрического состава легко растворимых соединений — хлорида кальция и оксалата аммония. Для каждой серии экспериментов были приготовлены растворы, содержащие катионы и анионы, при совместном присутствии которых в данных условиях не образуются малорастворимые соединения. Затем растворы смешивали в эквивалентных объемах. Готовый раствор сливали в коническую колбу, перемешивали в течение 5—10 с.

Как известно, процесс кристаллизации осуществляется в несколько этапов. Первый этап — возникновение зародышей кристаллической фазы (нуклеация), второй этап — дальнейший рост зародышей, третий этап — агрегация кристаллов [42].

Для определения параметров нуклеации использовали метод, основанный на измерении периодов индукции. В основе метода лежит зависимость величины индукционных периодов от

исходной концентрации пересыщенных растворов: $N \sim J_S \sim \exp\left[-\frac{B}{(\ln \gamma)^2}\right] \sim \frac{1}{\tau_{\text{инд}}}$, где J_S —

скорость зарождения, или число зародышей N , образующихся в единице объема раствора в единицу времени; B — константа. Определение времени индукции осуществляли визуальным способом по помутнению раствора. Изучение проводили *in vitro* в среде, приближенной по составу к физиологическому раствору мочи человека.

Минеральный (фазовый) состав полученных в ходе синтеза осадков был изучен посредством рентгенофазового анализа. Дифрактограммы получены методом порошка на рентгеновском аппарате ДРОН-3.

Для исследования роста кристаллов использовали кондуктометрический метод измерения концентрации растворов в ходе их кристаллизации. В его основу положен принцип определения удельной электропроводности раствора в ячейке Кольрауша; использовали кондуктометр Анион-4154 [40, 41]. По данным кондуктометрического анализа определяли степень полноты протекания процесса кристаллизации α в зависимости от времени:

$$\alpha = \frac{C_0 - C_\tau}{C_0 - C_s}, \quad (1)$$

где C_0 — начальная концентрация оксалата кальция в пересыщенном растворе; C_τ — концентрация оксалата кальция в момент времени τ ; C_s — растворимость оксалата кальция.

Для определения кинетических параметров роста кристаллов оксалата кальция по зависимости $\alpha = f(\tau)$ рассчитывали скорость осаждения как функцию текущего абсолютного пересыщения по формуле (2):

$$\frac{d\alpha}{d\tau} = kA \cdot (C_\tau - C_s)^n, \quad (2)$$

где A — суммарная площадь поверхности осадка; k — константа скорости реакции; n — порядок реакции. Оценка общей площади поверхности для постоянной формы частиц дается выражением:

$$A = \beta \cdot N_\tau^{1/3} \cdot V_\tau^{2/3}, \quad (3)$$

где β — фактор формы; N_τ — общее число частиц; V_τ — объем осадка к моменту времени τ . Учитывая, что $\alpha = V_\tau/V_{\max}$, а V_{\max} — максимальный объем осадка при полном сбросе пересыщения, после преобразований получим формулу для расчета кинетических характеристик процесса кристаллизации оксалата кальция (считая постоянным количество частиц $N_\tau = N = \text{const}$):

$$\left(\frac{d\alpha}{d\tau}\right) \cdot \alpha^{-2/3} = k'(C_\tau - C_s)^n, \quad (4)$$

где k' включает в себя все константы (V_{\max} , β , N и k) и постоянно для данных начальных условий. При логарифмировании получим:

$$\lg\left(\frac{d\alpha}{d\tau}\right) - \frac{2}{3}\lg\alpha = \lg k' + n\lg(C_\tau - C_s). \quad (5)$$

Построение зависимости в координатах $\lg(d\alpha/d\tau) - 2/3\lg\alpha = f(\lg(C_\tau - C_s))$ должно дать прямую линию. Отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат, дает значение $\lg k'$, а тангенс угла наклона этой прямой соответствует порядку скорости роста n .

И нуклеация, и кинетика кристаллизации исследовались как в растворах без органических примесей, так и с добавками аминокислот в концентрации 0,004 моль/л, соответствующей их нахождению в физиологическом растворе [39—41]. Сравнительное исследование кинетики роста кристаллов уввеллита в присутствии двух аминокислот, противоположно влияющих на кристаллизацию — валина (протор) и лизина (ингибитор) — проводили при трех концентрациях аминокислот — 0,002, 0,004 и 0,008 моль/л.

С целью получения информации о взаимодействии аминокислот с кристаллами оксалата кальция были проведены эксперименты по адсорбции аминокислот на синтезированных образцах уввеллита. Адсорбцию аминокислот исследовали методом инфракрасной спектроскопии. ИК спектры получали на спектрофотометре ФТ-801. Образцы готовили методом пресования таблеток с КВг. Запись спектра исследуемых образцов проводили в области от 4000 до 470 см^{-1} . Методика этих экспериментов и полученные результаты рассмотрены в [40].

Для определения гранулометрического состава синтезированных твердых фаз оксалата кальция использовали метод дисперсионного анализа. Дисперсионный анализ продуктов кристаллизации проводили на лазерном дифракционном анализаторе размеров частиц Shimadzu SALD -2101 (Laser Diffraction Particle Size Analyzer) [34].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аминокислоты в почечных камнях

Сравнительная характеристика мочевых камней из организма человека по белковой компоненте. В работе [18] приводятся данные о трех основных типах локализации органических веществ белковой природы в мочевых камнях: ядерная (в центре агрегата), прослоечная (концентрические и лучевые прослойки), диффузная (в виде вкраплений в кристаллы минералов).

Как правило, в почечных камнях чаще всего фиксируются одновременно все типы локализации органического вещества с заметным преобладанием того или иного типа локализации.

Определение общего количества белка в оксалатных и фосфатно-оксалатных камнях жителей Омского региона показывает, что содержание водорастворимых органических веществ с пептидной связью в почечных камнях зависит от минерального состава образца. Так, в камнях оксалатного типа содержание белка почти вдвое большее, чем в камнях фосфатно-оксалатного типа. С использованием *t*-критерия Стьюдента показано, что различие в средних значениях содержаний веществ с пептидной связью между фосфатной группой камней и группами оксалатных, уратных, уратно-оксалатных камней достоверно значимо. Массовое содержание водорастворимых органических веществ с пептидной связью в почечных камнях составляет 0,8—3,8 мас. % в зависимости от принадлежности образца к определенной классификационной группе. При этом содержание вышеуказанных органических соединений колеблется в более широких пределах в образцах почечных камней смешанного типа, особенно фосфатно-оксалатных. Данный факт, по-видимому, объясняется различным по длительности периодом изменения рН среды при образовании камней смешанного типа, при котором происходит накопление органического вещества [18—20].

Водорастворимые органические соединения с пептидной связью представлены простыми белками в уратных, уратно-оксалатных, фосфатных, фосфатно-оксалатных почечных камнях; простыми белками и гликопротеинами в оксалатных камнях. Как было показано нами ранее, фосфатные камни способны накапливать микроэлементы в большей степени, чем другие типы камней [4, 7]. Наряду с изоморфизмом фосфатных минералов это, возможно, объясняется тем, что в составе белковой фракции фосфатных камней преобладают глобулярные белки. Основной функцией этих белков является транспорт в организме низкомолекулярных соединений и ионов металлов, вследствие чего они обладают высокой способностью связывать и накапливать микроэлементы.

Послойный анализ камня фосфатно-оксалатного типа с зональным строением показал, что распределение водорастворимых белковых соединений по радиусу камня немонотонно, что может быть вызвано рядом причин, в частности, прекращением воспалительных процессов, вызванных ростом камня, за счет лечения или вследствие изменения условий кристаллообразующей среды.

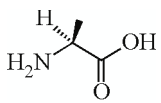
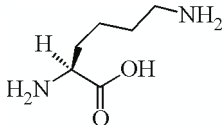
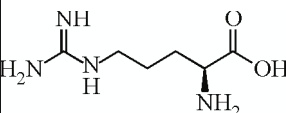
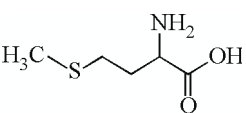
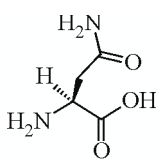
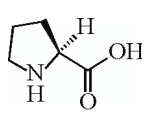
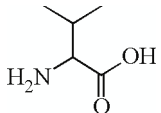
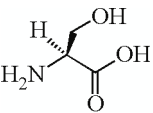
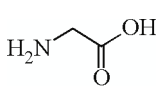
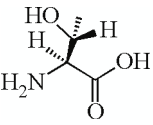
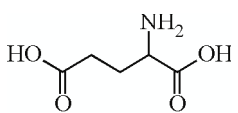
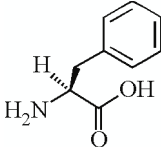
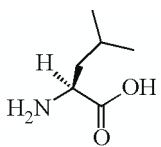
Аминокислотный состав белковой составляющей почечных камней. Исследование коллекции почечных камней позволило установить в них наличие 13 аминокислот (табл. 1) и определить их количественное содержание в составе органической неминеральной составляющей оксалатных, фосфатных, уратных, уратно-оксалатных и фосфатно-оксалатных камней [19, 20].

Суммарное содержание аминокислот в исследуемых образцах варьирует в пределах 0,6101—2,228 мас. % и зависит от минерального состава камня. Качественный состав аминокислот (их число варьирует от 14 до 10) также зависит от фазового состава камней. Результаты кластерного анализа подтвердили наличие значимых связей между аминокислотным и минеральным составом почечных камней. Отчетливо выделяются три группы конкрементов: первая представлена оксалатными, вторая — фосфатными и третья — уратными камнями. Средние значения содержания аминокислот в камнях, принадлежащих к различным кластерам, сформированным по методу *k*-средних, приведены на рис. 1.

Анализ полученных результатов приводит к выводу, что соотношение средних концентраций аминокислот в почечных камнях (глутаминовая кислота > лизин > пролин > > аланин > треонин > валин > глицин > серин > фенилаланин > аргинин > лейцин > триптофан > метионин > изолейцин) не соответствует соотношению содержаний аминокислот в моче человека [2]: глицин > глутаминовая кислота > лизин > пролин, серин, аланин, треонин > > аргинин, триптофан > фенилаланин, лейцин > Валин > изолейцин > метионин). Содержание глутаминовой кислоты и лизина в почечных камнях существенно выше, чем других аминокислот, и превышает их содержание в моче. Это позволяет предположить наиболее активное участие как этих аминокислот, так и белков с их высоким содержанием в процессе

Т а б л и ц а 1

Аминокислоты, использовавшиеся в качестве примесей, и их характеристики [47]

Аминокислота	Строение	Изоэлектри- ческая точка pI	pK _a	Аминокислота	Строение	Изоэлектри- ческая точка pI	pK _a
L-Аланин		6,00	2,33 9,71	L-Лизин		9,74	2,15 9,16 10,67
L-Аргинин		10,76	2,03 9,00 12,10	DL-Метионин		5,74	2,16 9,08
L-Аспарагин		5,41	2,16 5,41 8,72	L-Пролин		6,30	1,95 10,47
DL-Валин		5,96	2,27 9,52	L-Серин		5,68	2,13 5,68 9,05
Глицин		5,97	2,34 9,58	L-Треонин		5,60	2,20 5,53 8,96
DL-Глутами- новая кислота		3,22	2,16 4,15 9,58	L-Фенила- ланин		5,48	2,18 9,09
L-Лейцин		5,98	2,32 9,58				

образования почечных камней. Причиной этого может быть наличие в составе лизина дополнительной аминогруппы, а в глутаминовой кислоте дополнительного карбоксильного остатка.

Влияние аминокислот на кристаллизацию увэллита

Скорость зародышеобразования. Исследование с помощью рентгенофазового анализа твердых фаз, образующихся при кристаллизации из модельного раствора, показало, что полученный осадок во всех случаях является одноводным оксалатом кальция [39, 40], причем наличие других фаз в качестве примесей не обнаружено. Вместе с тем в ряде работ [43, 44] сообщается об образовании в аналогичных экспериментах дву- и трехводных оксалатов кальция.

На первом этапе было изучено влияние пересыщения на значения периодов индукции моногидрата оксалата кальция в отсутствие посторонних добавок [39]. Была получена

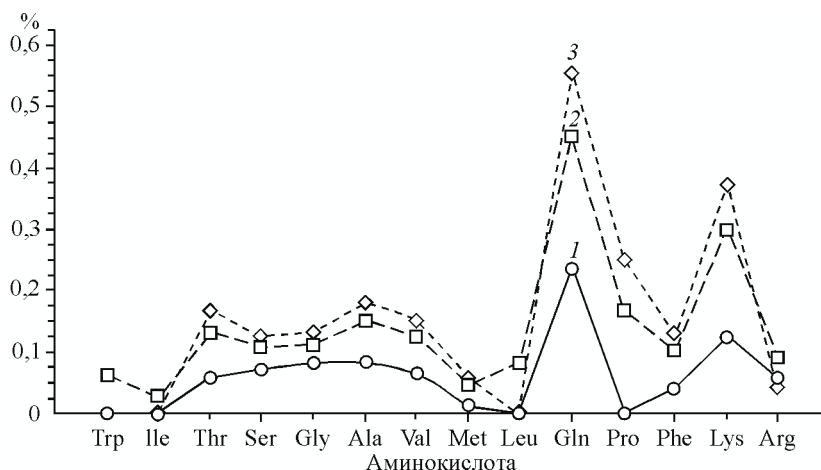


Рис. 1. Средние значения содержания аминокислот в мочевых камнях, принадлежащих к различным кластерам: оксалаты (1), фосфаты (2), ураты (3)

линейная зависимость $\ln \tau_{\text{инд}}$ от $\frac{1}{\ln \gamma^2}$. Эта нестандартная зависимость, как было показано, является композицией двух экспоненциальных зависимостей с разными показателями экспоненты. Определение поверхностной энергии (входящей в константу B) для двух участков кинетической кривой дает значения 15,3 и 36,0 мДж/м², что отвечает гетерогенному и гомогенному зарождению соответственно. Эти значения близки к полученным нами ранее [34], но значительно отличаются от литературных [43]. Мы связываем это с отсутствием примесей в нашей системе в отличие от [43].

Влияние органических добавок различных аминокислот на период индукции одноводного оксалата кальция оказалось весьма разнообразным и зависящим от типа кислоты. Полученные данные представлены на диаграмме (рис. 2), иллюстрирующей значения периодов индукции моногидрата оксалата кальция в присутствии исследованных аминокислот.

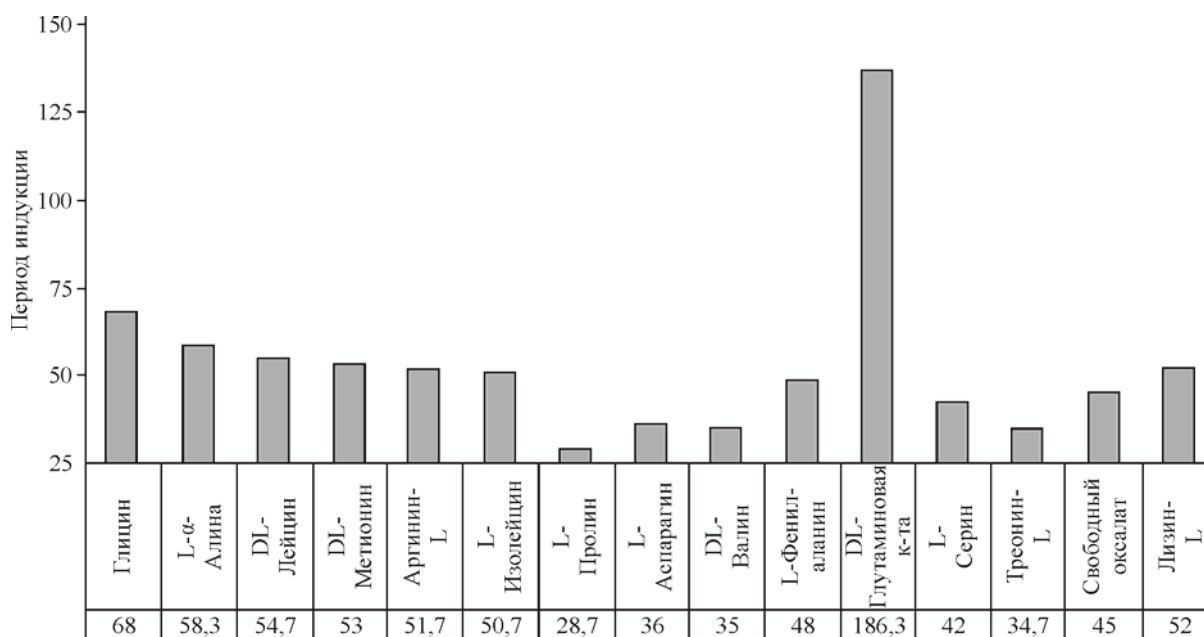


Рис. 2. Влияние аминокислот на период индукции моногидрата оксалата кальция

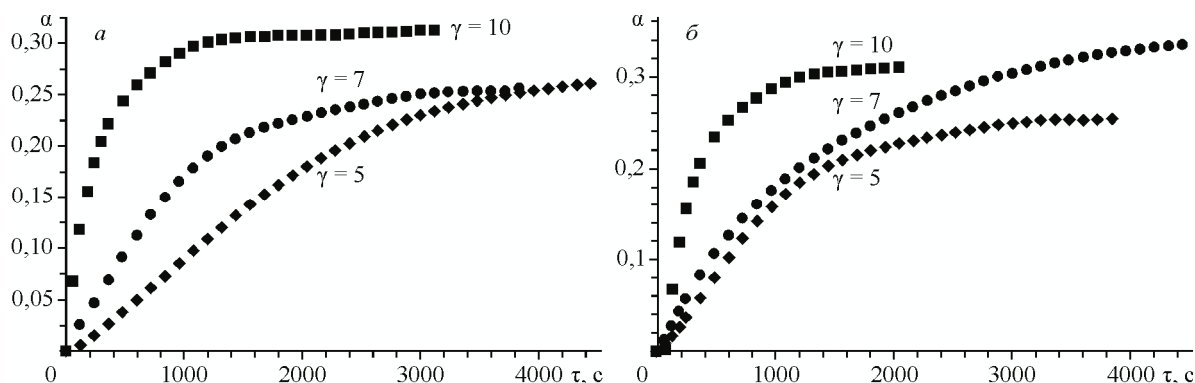


Рис. 3. Кинетические кривые кристаллизации оксалата кальция при разных пересыщениях без добавок аминокислот (а), в присутствии L-пролина (б)

Из диаграммы видно, что аминокислоты могут как ингибировать процесс кристаллизации одноводного оксалата кальция, так и промотировать его, при этом некоторые аминокислоты оказывают незначительное действие на кристаллизацию.

Предполагается, что ингибирующее действие аминокислот связано с их адсорбцией на активных центрах поверхности образующихся кристаллов. Адсорбция осуществляется за счет взаимодействия между положительно заряженной поверхностью кристаллов оксалата кальция и аминокислотой, которая находится в наиболее вероятной в данных условиях конформации. В этом случае можно ожидать, что с ростом ингибирующего действия будет увеличиваться содержание аминокислоты в почечных камнях. Действительно, по крайней мере, для основных аминокислот это справедливо [36].

Сравнительный анализ действия изученных нами аминокислот на период индукции показывает, что этот эффект не связан с основными характеристиками аминокислот, определяющими их адсорбцию на поверхности кристаллов оксалата кальция [45]: а) с кислотностью — основностью, т.е. pI (среди ингибиторов имеются кислые, нейтральные и основные аминокислоты); б) с константами диссоциации кислот (диапазон pK_1 для ингибиторов и промоторов один и тот же, порядка 2,0—2,3); в) с константами устойчивости комплексов с кальцием (диапазон pK ингибиторов 1,2—2,2, промоторы по pK попадают в этот интервал: 1,4—1,6); с числом карбоксильных групп (и среди ингибиторов, и среди промоторов имеются как моно-, так и двухосновные аминокислоты). Выявить какую-либо общую характеристику аминокислоты, определяющую ее действие на нуклеацию моногидрата оксалата кальция, пока не удастся.

Наибольшее удивление вызывает противоположное поведение аспарагиновой и глутаминовой кислот. Разница между этими аминокислотами как по их строению, так и по свойствам сравнительно невелика. Противоположное действие этих кислот на зарождение оксалата кальция можно объяснить лишь тем, что и ингибирование, и промотирование нуклеации реализуется за счет одного механизма — прочного связывания аминокислоты с ионами кальция, — на поверхности зародыша (ингибирование) или в растворе (промотирование). Благодаря меньшему значению второй константы диссоциации аспарагиновая кислота при $pH \sim 6$ сильнее ионизирована, что должно ослаблять ее адсорбцию на поверхности оксалата кальция [38]. С другой стороны, это должно усиливать образование в растворе карбоксилатных комплексов кальция, которые могут служить центрами нуклеации оксалата кальция.

Кинетика кристаллизации. Анализ полученных кинетических кривых (рис. 3, 4) показал, что степень превращения α монотонно увеличивается со временем. При этом процесс постепенно замедляется, вплоть до полного торможения кристаллизации. Характерно, что процесс практически прекращается уже при небольших значениях α , т.е. при существенных остаточных пересыщениях. Это замедление не может быть вызвано только сбросом пересыщения и, соответственно, уменьшением движущей силы в ходе кристаллизации. Аналогичный ход

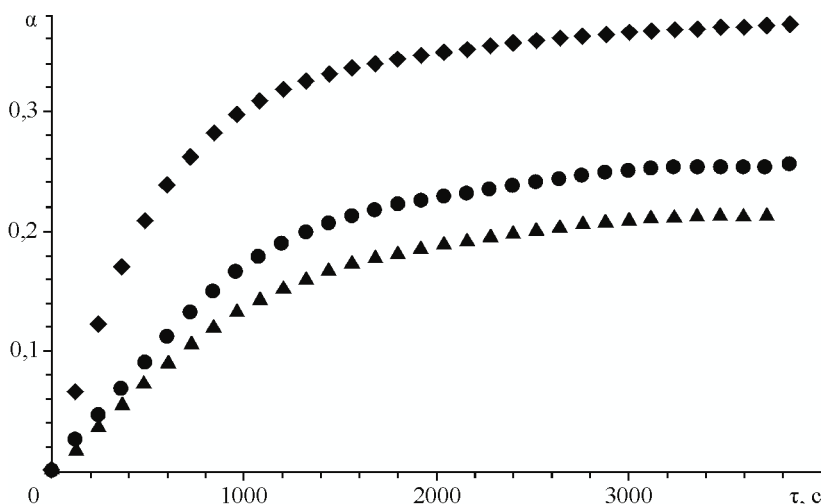


Рис. 4. Кинетические кривые кристаллизации оксалата кальция ($\gamma = 7$) в присутствии аминокислот: без добавок (●), L-лизин (▲), DL-метионин (◆)

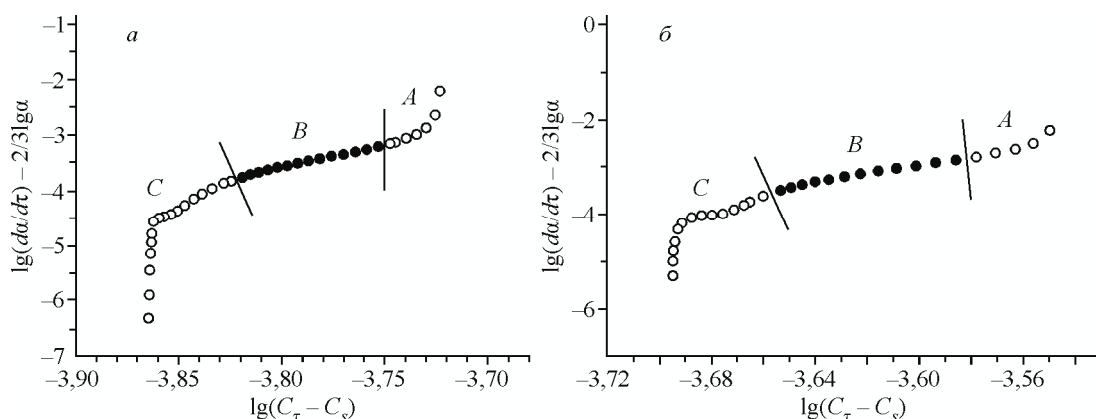


Рис. 5. Определение кинетических параметров кристаллизации оксалата кальция ($\gamma = 7$) в присутствии аминокислот: без добавок (а), в присутствии L-пролина (б)

кинетики кристаллизации уэвеллита установлен и другими авторами и объясняется ими как результат агрегации кристаллов [44]. Между тем нами показано, что уменьшение суммарной площади поверхности осадка за счет агрегации слишком невелико, чтобы привести к таким последствиям [49]. Более реальная причина — наличие неконтролируемых примесей в исходных реактивах, тормозящих рост кристаллов по механизму Кабреры [50]. Это подтверждается связью между остаточным и начальным пересыщениями именно по уравнению Кабреры.

По полученным кинетическим данным были построены зависимости $\lg(da/dt) - 2/3 lga = f(\lg C_\tau - C_s)$. На графиках этих зависимостей можно выделить несколько линейных участков с разными наклонами (рис. 5).

Участок *A* соответствует увеличению общего числа частиц за счет образования зародышей кристаллизации; участок *B* — росту образовавшихся частиц без увеличения их общего количества; участок *C* соответствует вторичным процессам — уменьшению общего числа образующихся частиц за счет агрегации кристаллов [3]. Для выявления кинетических закономерностей наибольший интерес представляет участок *B*, поэтому именно он используется для расчета основных кинетических характеристик кристаллизации оксалата кальция. Пересечение этого отрезка с осью ординат дает константу скорости реакции осаждения, а наклон отрезка определяет порядок реакции.

Т а б л и ц а 2

Кинетические характеристики процесса кристаллизации оксалата кальция в присутствии аминокислот

Добавка	$\gamma = 5$		$\gamma = 7$		$\gamma = 10$	
	n	$\lg k'$	n	$\lg k'$	n	$\lg k'$
Без добавки	7,9	26,5	10,1	33,1	12,0	38,6
L-Аланин	8,0	26,9	10,1	33,2	10,7	33,4
L-Аргинин	5,7	17,2	7,6	23,9	9,0	28,1
L-Аспарагин	8,0	27,3	10,0	32,9	10,9	34,3
DL-Валин	8,0	27,0	10,2	34,1	11,6	36,9
Глицин	7,1	23,5	10,0	32,8	9,9	31,0
DL-Глутаминовая кислота	5,4	16,3	7,5	23,9	9,1	28,6
L-Лейцин	7,9	26,7	10,1	33,6	10,5	33,4
L-Лизин	5,3	16,9	7,5	23,6	9,3	28,4
DL-Метионин	7,9	26,9	10,1	33,6	11,2	35,6
L-Пролин	9,1	31,4	10,6	35,0	11,8	37,1
L-Серин	8,1	27,0	10,1	33,5	10,9	34,5
L-Треонин	8,0	26,5	10,0	33,2	12,1	38,5
L-Фенилаланин	8,0	26,8	10,2	33,5	10,6	33,3

Найденные в результате обработки экспериментальных данных константы приведены в табл. 2. Прежде всего обращаем внимание на большие значения порядка реакции n . По-видимому, это является следствием приближения степенной зависимостью экспоненциального закона, описывающего кинетику роста кристаллов по механизму двумерного зарождения. Для использовавшихся высоких пересыщений такой механизм роста вполне реален. Далее, видно, что с увеличением исходного пересыщения скорость кристаллизации возрастает. Это можно объяснить как увеличением общего числа центров кристаллизации, так и увеличением средней скорости роста кристаллов.

Присутствие в растворе аминокислот оказывает, как и в случае зародышеобразования, различное действие на процесс кристаллизации оксалата кальция. В зависимости от типа кислоты это может быть ингибирование, промотирование или нейтральное действие. Наиболее сильным ингибирующим эффектом обладают глутаминовая кислота, лизин, аргинин и глицин. Из всех аминокислот ярко выраженным промотирующим действием обладают метионин и валин; остальные аминокислоты оказывают незначительное влияние на кинетику кристаллизации оксалата кальция.

Ингибирующее действие аминокислот наиболее естественно объясняется их адсорбцией на растущих кристаллах одноводного оксалата кальция. Анализируя строение аминокислот и их состояние в растворе (см. табл. 1), можно сделать выводы, что торможение роста кристаллов уэвеллита усиливается с увеличением длины углеводородного радикала, ростом числа карбоксильных групп в аминокислоте и нахождением в растворе при физиологических значениях pH в виде заряженных ионов.

С другой стороны, аминокислоты могут служить новыми центрами нуклеации уэвеллита, увеличивающими число кристаллов, так как способны связывать ионы кальция [44]. Кроме того, адсорбируясь на поверхности кристаллов оксалата кальция, аминокислоты могут стимулировать двумерное зарождение, увеличивая, таким образом, скорость роста кристаллов. Эти эффекты объясняют промотирующее действие аминокислот на кристаллизацию уэвеллита.

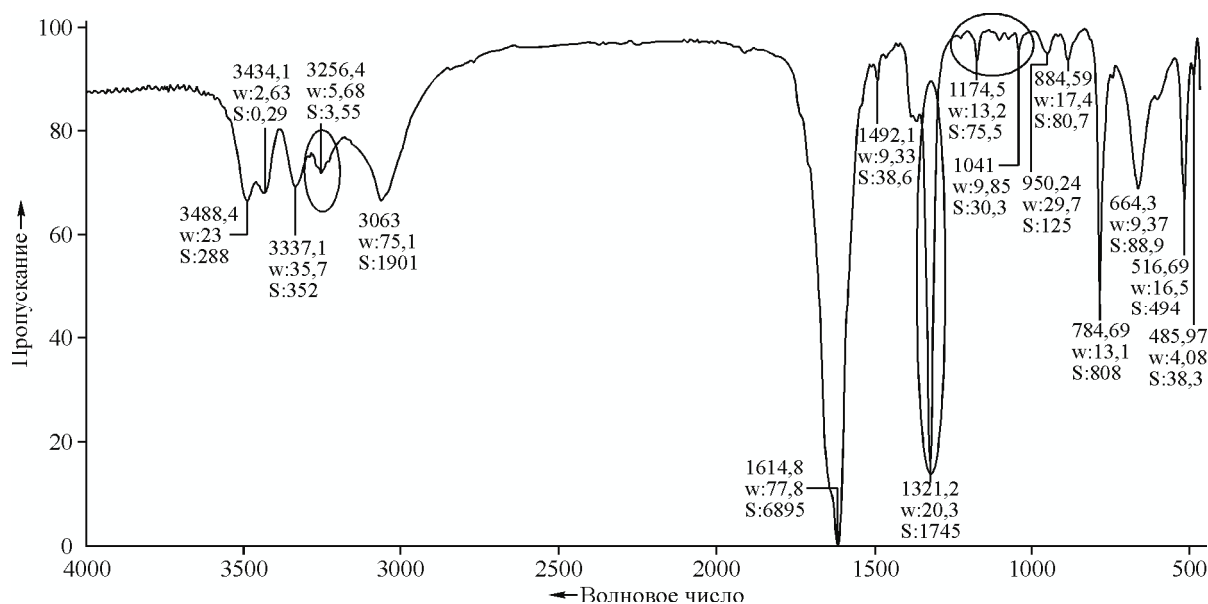


Рис. 6. ИК спектр синтезированного порошка уэвеллита после адсорбционного эксперимента с глутаминовой кислотой. Отмечены полосы поглощения аминокислоты

Отсюда ясно, что одна и та же аминокислота может влиять на кристаллизацию и как ингибитор, и как промотор. Преобладание того или иного воздействия и определяет подразделение аминокислот на промоторы и ингибиторы. Этот двойной эффект объясняет наблюдающиеся в литературе противоречия во взглядах разных авторов на роль аминокислот в процессах кристаллизации оксалатов кальция.

С увеличением исходного пересыщения торможение роста аминокислотами усиливается, а нейтральные аминокислоты могут стать ингибиторами (см. табл. 2). Такое поведение является нестандартным — обычно увеличение пересыщения ослабляет торможение кристаллизации примесями [50]. Мы связываем двойное действие аминокислот с конкуренцией эффектов ингибирования и промотирования кристаллизации. Если предлагаемый механизм ускорения роста кристаллов справедлив, то для данной аминокислоты с возрастанием пересыщения промотирующий эффект должен ослабляться (скорость двумерного зарождения резко увеличивается). Соответственно, усиливается ингибирование кристаллизации уэвеллита аминокислотой.

Для подтверждения возможности адсорбционного воздействия аминокислот на кристаллизацию уэвеллита была изучена адсорбция глутаминовой кислоты и лизина на синтезированном моногидрате оксалата кальция. Методом ИК спектроскопии показано, что эти аминокислоты действительно адсорбируются на порошках уэвеллита — на спектрах адсорбента присутствуют характерные для аминокислот полосы при 1200—1000 см^{-1} , 3300—3200 и 1400—1300 см^{-1} (рис. 6). Определение количества аминокислоты, связываемой адсорбентом, показало, что адсорбция удовлетворительно описывается в рамках модели Ленгмюра.

Влияние лизина и валина на кинетику кристаллизации уэвеллита. Для более детальных исследований были выбраны две аминокислоты, обладающие противоположным воздействием на кристаллизацию моногидрата оксалата кальция — лизин и валин. Как показано выше, лизин является ингибитором кристаллизации, а валин — промотором (см. табл. 2). Известно, что лизин и валин незаменимые аминокислоты для организма человека, входящие в состав практически любых белков [46]. Различное действие валина и лизина на кристаллизацию уэвеллита очевидно связано с различным химическим строением и свойствами этих аминокислот (см. табл. 1). Валин проявляет амфотерные свойства, тогда как лизин обладает ярко выраженными основными свойствами, что обусловлено наличием в молекуле добавочной NH_2 -группы. Анализ значений констант ионизации и изоэлектрической точки показывает, что при значениях pH, термодинамически оптимальных для образования одноводного оксалата

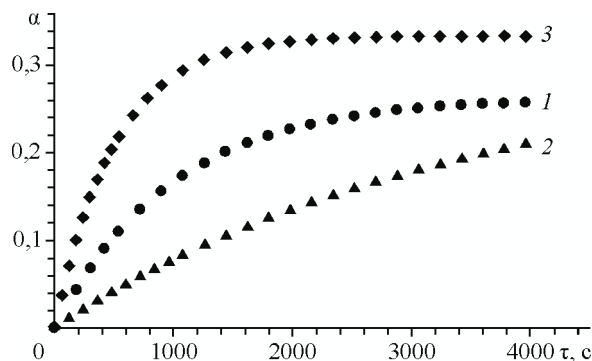


Рис. 7. Кинетические кривые кристаллизации оксалата кальция в присутствии аминокислот ($C = 0,004$ моль/л): без добавок (1), L-лизин (2), DL-валин (3)

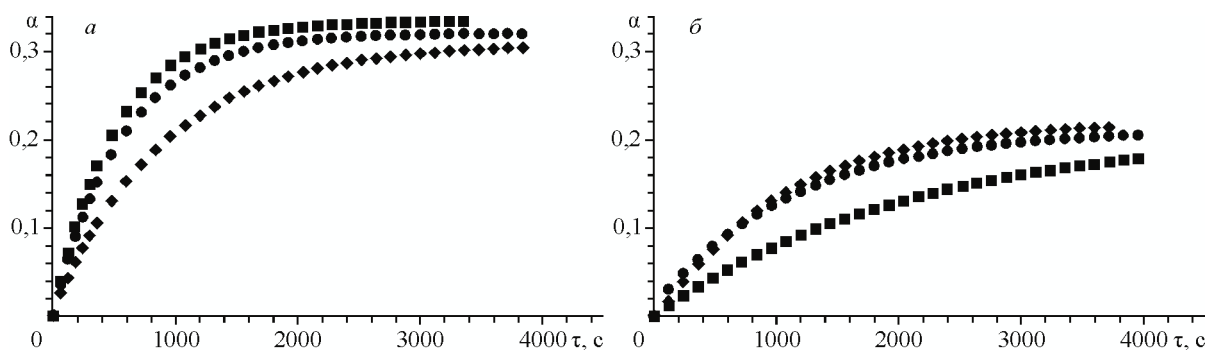


Рис. 8. Влияние концентрации аминокислот на кинетику кристаллизации оксалата кальция (\diamond — 0,002, \bullet — 0,004, \blacksquare — 0,008 моль/л): DL-валин (а), L-лизин (б)

кальция ($\text{pH} = 5,0\text{—}7,0$) [9], лизин находится в растворе в виде положительно заряженного иона, а валин — в виде нейтральных молекул (цвиттер-ионов). Как следствие, данные аминокислоты должны по-разному адсорбироваться на кристаллах моногидрата оксалата кальция и по-разному менять кинетику кристаллизации моногидрата оксалата кальция. Это демонстрируют кинетические кривые, приведенные на рис. 7 и 8. На рис. 7 хорошо видно различие в кинетических эффектах, вызываемых исследуемыми аминокислотами — валин является промотором, а лизин — ингибитором кристаллизации уэвеллита. Рис. 8 показывает, что в обоих случаях эффект усиливается с увеличением концентрации примеси в растворе.

Кинетические характеристики кристаллизации оксалата кальция рассчитывали, как и раньше, по участку *B* преобразованных к соответствующим координатам зависимостей (рис. 9). Определенные в результате обработки экспериментальных данных константы $\lg k'$ и n приведены в табл. 2 и 3.

Высокие значения показателя n мы связываем, как уже говорилось, с ростом кристаллов по механизму двумерного зарождения [39]. Величина константы скорости отражает влияние примесей аминокислот на кристаллизацию уэвеллита. Данные табл. 3 показывают, что с увеличением концентрации L-лизина константа скорости уменьшается. Аминокислота, адсорбируясь на растущей грани кристалла, препятствует ее росту. Увеличение концентрации добавки аминокислоты приводит к блокировке большего количества активных центров, что способствует дальнейшему замедлению роста кристалла. Однако при концентрации более 0,004 моль/л уменьшение менее значительное, чем в диапазоне концентраций от 0,002 до 0,004 моль/л. По нашему мнению, в данном диапазоне концентраций происходит полное покрытие аминокислотой поверхности растущего кристалла, и дальнейшее повышение концентрации примеси не приводит к существенному снижению константы скорости кристаллизации. Такое поведение соответствует адсорбции по изотерме Лэнгмюра. Выше мы показали, что аминокислоты дейст-

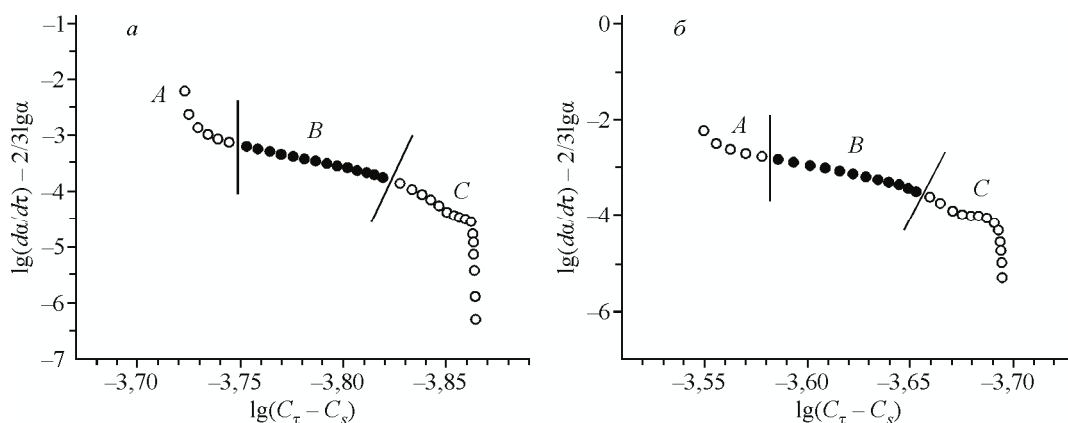


Рис. 9. Определение кинетических параметров кристаллизации оксалата кальция в присутствии аминокислот ($C = 0,008$ моль/л): DL-валин (а), L-лизин (б)

Т а б л и ц а 3

Влияние концентрации аминокислот на кинетические характеристики кристаллизации оксалата кальция

Концентрация C , моль/л	DL-Валин		L-Лизин	
	n	$\lg k'$	n	$\lg k'$
0,002	9,5	31,3	8,1	25,3
0,004	10,2	34,1	7,5	23,6
0,008	10,4	34,5	7,4	23,0

вительно адсорбируются на кристаллах увезлита в соответствии с изотермой Лэнгмюра.

Значительное ингибирующее влияние лизина и его высокую адсорбционную способность можно объяснить химическим строением аминокислоты на основе правила Дюкло—Траубе. Согласно данному правилу коллоидные ПАВ проявляют высокую адсорбционную активность, которая зависит главным образом от длины углеводородного радикала. Увеличение длины радикала на одну группу $-\text{CH}_2-$ приводит к возрастанию поверхностной активности примерно в 2 раза [48].

При добавлении DL-валина наблюдается иная картина: с увеличением концентрации аминокислоты константа скорости возрастает (но то же с замедлением). Промотирующий эффект валина и усиление промотирования с увеличением концентрации примеси можно объяснить созданием на поверхности кристаллов адсорбирующейся аминокислотой добавочных центров двумерного зарождения, поскольку адсорбированные молекулы способны связывать ионы кальция.

Оба эффекта — и промотирование кристаллизации валином, и ингибирование лизином — существенно ослабляются при больших пересыщениях $\gamma > 15$. Это вполне совместимо с адсорбционным механизмом действия аминокислот. С одной стороны, увеличение пересыщения всегда снижает примесное торможение роста кристаллов. С другой стороны, возрастание интенсивности двумерного зарождения при больших пересыщениях естественно снижает вклад добавочных адсорбционных центров зарождения.

Агрегация кристаллов. Наряду с зарождением и ростом кристаллов существенное значение в общем ходе кристаллизации имеет агрегация образующихся кристаллов. Агрегация, конечно, происходит в течение всего времени осаждения увезлита, но в наибольшей степени она проявляется к концу процесса. На преобразованных кинетических кривых рис. 5 и 9 этой стадии соответствует в основном участок C. Подробно стадия агрегации рассмотрена нами в другой статье, помещенной в этом же выпуске [49]. Поэтому здесь мы охарактеризуем агрегацию кратко.

Агрегацию изучали методом дисперсионного анализа, по изменению среднего размера

кристаллов продукта и поведению кривых распределения кристаллов по размерам. Совместное использование данных по кинетике исчерпания пересыщения и средним размерам кристаллов позволяет оценить изменение числа кристаллов в единице объема раствора. Эта величина монотонно падает по мере развития процесса кристаллизации, что и доказывает агрегацию кристаллов в ходе осаждения вещества и позволяет охарактеризовать ее количественно [49]. Установлено, что процесс агрегации вполне удовлетворительно описывается с использованием теории коагуляции Смолуховского [27].

В ходе кристаллизации кривые распределения зерна продукта по размерам расплываются (дисперсия увеличивается), а максимум смещается по оси размеров вправо. Кроме того, распределение зачастую становится полимодальным. Такое поведение хорошо объясняется известным механизмом захвата мелких частиц крупными [50] на фоне неоднородного распределения плотности частиц в кристаллизационном пространстве.

Примеси аминокислот, тормозя рост кристаллов, вызывают сжатие распределений и смещение максимумов кривых влево, в область меньших размеров частиц. Средние размеры кристаллов продукта, таким образом, уменьшаются. Совершенно очевидно, что это вызвано торможением роста кристаллов увеллита примесями аминокислот [51].

С увеличением пересыщения агрегация кристаллов усиливается. Это приводит к внешне парадоксальному эффекту уменьшения числа частиц в единице объема раствора при больших пересыщениях. Влияние пересыщения на агрегацию кристаллов соответствует предложенному Поллаком механизму агрегации — срастанию сталкивающихся кристаллов за счет образования между ними мостиков-зародышей [52]. При этом вследствие упомянутого уже захвата мелких частиц крупными процесс агрегации следует автокаталитической кинетике. В результате скорость агрегации возрастает по мере кристаллизации, от начала к концу процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена сильная и при этом избирательная концентрация аминокислот в камнях разного типа по сравнению с формирующими их физиологическими жидкостями.

1. Сделан вывод об активном участии белковой компоненты в процессах кристаллизации патогенных фаз в организме человека, что подтверждается и результатами модельных экспериментов по кристаллизации основных фаз мочевых камней в присутствии аминокислот и белков в условиях, близких к физиологическим.

2. При исследовании процессов нуклеации одноводного оксалата кальция в модельных растворах без примесей и с добавками аминокислот в концентрациях, близких к физиологическим, получены следующие результаты:

— в растворах без добавок примесей наблюдается переход от гетерогенного к гомогенному зарождению при увеличении пересыщения сверх $\gamma = 12$, причем эффективная поверхностная энергия возрастает более чем вдвое;

— различные аминокислоты оказывают на нуклеацию моногидрата оксалата кальция как ингибирующее, так и промотирующее действие;

— возрастание ингибирующих свойств аминокислот коррелирует с увеличением их содержания в оксалатных почечных камнях.

3. Исследования кинетики кристаллизации одноводного оксалата кальция в присутствии добавок 13 аминокислот в концентрациях, близких к физиологическим, дали следующие результаты:

— рост кристаллов увеллита происходит по механизму двумерного зарождения;

— различные аминокислоты оказывают на кристаллизацию увеллита как ингибирующее, так и промотирующее действие;

— влияние аминокислот на рост кристаллов увеллита в основном совпадает с их действием на времена индукции зародышеобразования увеллита;

— ингибирующие свойства аминокислот возрастают, а промотирующие — падают с увеличением пересыщения, что связано с конкуренцией этих эффектов;

— оба эффекта находят объяснение в адсорбции аминокислот на кристаллах уэвеллита: ингибирование – за счет блокировки точек роста, промотирование — за счет создания на поверхности кристаллов центров двумерного зарождения.

4. Исследование кинетики кристаллизации одноводного оксалата кальция в присутствии добавок DL-валина и L-лизина в концентрациях, близких к физиологическим, дало следующие результаты:

— DL-валин оказывает промотирующее действие на кинетику кристаллизации уэвеллита; с увеличением концентрации DL-валина константа скорости роста увеличивается;

— эффект промотирования может быть объяснен увеличением на поверхности растущего кристалла центров двумерного зарождения;

— L-лизин ингибирует кристаллизацию уэвеллита; с увеличением концентрации L-лизина константа скорости уменьшается;

— наибольшее влияние аминокислот проявляется в диапазоне концентраций от 0,002 до 0,004 моль/л, при дальнейшем увеличении концентраций оба эффекта ослабевают; это может быть связано с адсорбцией аминокислоты по изотерме Лэнгмюра и полным покрытием поверхности растущего кристалла при больших концентрациях примесей.

5. Агрегация кристаллов усиливается с увеличением начального пересыщения растворов и тормозится примесями аминокислот.

6. Кинетика агрегации является автокаталитической и определяется эффектом захвата мелких кристаллов крупными, а также механизмом срастания кристаллов за счет мостиков-зародышей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ларина Т.А., Кузнецова Т.А., Королева Л.Ю. В кн.: Ученые записки Орлов. гос. ун-та. Научные труды научно-исследовательского центра педагогики и психологии. – 2006. – 7. – С. 135.
2. Тиктинский О.Л., Александров В.П. Мочекаменная болезнь. – СПб.: Литер, 2000.
3. Кораго А.А. Введение в биоминералогию. – СПб.: Наука, 1992.
4. Голованова О.А., Пятанова П.А., Пальчик Н.А. и др. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2003. – № 4. – С. 593.
5. Голованова О.А., Пятанова П.А. // Изв. вузов. Сер. Химия и химическая технология. – 2002. – 45, № 2. – С. 136.
6. Севостьянова О.А., Полиенко А.К. // Изв. Томск. политехн. ун-та. – 2004. – 307, №2. – С. 62.
7. Пальчик Н.А., Мороз Т.Н., Максимова Н.В. и др. // Журн. неорган. химии. – 2006. – 51, № 7. – С. 1177.
8. Поспехова Г.П., Шайлиева Л.О., Федосеева Г.Б. и др. // Врачу общей практики. – 2001. – № 1. – С. 174.
9. Голованова О.А. Патогенные минералы в организме человека. – Омск: Изд-во ОмГУ, 2007.
10. Голованова О.А. Биоминералогия мочевых, желчных, зубных и слунных камней из организма человека. Автореф. ... дис. докт. геол.-мин. наук. – СПб.: Санкт-Петербургский государственный университет, 2008.
11. Зузук Ф.В. Минералогія уролітів: Автореф. дис. ... докт. геол. наук. – Л.: Львів. нац. ун-т ім. І. Франка, 2005.
12. Al Zahrani H., Norman R.W., Thompson C. et al. // Brit. J. Urol. Int. – 2000. – 85, N 6. – P. 616.
13. Arias Funez F., Garcia Cuerpo E., Lovaco Castellanos F. et al. // Arch. Esp. Urol. – 2000. – 53, N 4. – P. 343.
14. Assimos D.G., Holmes R.P. // Urol. Clin. North. Amer. – 2000. – 27, N 2. – P. 255.
15. Bailly G.G., Norman R.W., Thompson C // Urology. – 2000. – 56, N 1. – P. 40.
16. Bak M., Thomsen J.K., Jakobsen H.J., et al. // J. Urol. – 2000. – 164. – P. 856.
17. Каткова В.И., Симаков А.Ф. // Сыктывкар. минералог. сб. – 1998. – № 27. – С. 58.
18. Голованова О.А., Пятанова П.А., Россеева Е.В. // Докл. АН. – 2004. – 395, № 5. – С. 1.
19. Голованова О.А., Россеева Е.В., Франк-Каменецкая О.В. // Вестн. СПбГУ. – 2006. – 4, № 2. – С. 123.
20. Голованова О. А., Пунин Ю. О., Бельская Л. В. и др. // Бутлеров. сообщ. – 2010. – 22, № 11. – С.53.
21. Сокол Э.В., Нигматуллина Е.Н., Максимова Н.В. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2003. – № 11. – С. 547.
22. Рашкович Л.Н., Петрова Е.В. // Химия и жизнь. – 2006. – № 1. – С. 158.
23. Изатулина А.Р., Голованова О.А., Пунин Ю.О. и др. // Вестн. Омск. ун-та. – 2006. – № 3. – С. 45.
24. Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Барина К.В. и др. // Биоминералогия. – Луцьк, Украина. – 2008.

25. Голованова О.А., Ачкасова Е.Ю., Козут В.В. и др. // Математические структуры и моделирование. – 2004. – № 13. – С. 144.
26. Голованова О.А., Козут В.В., Желяев Е.В. // Математические структуры и моделирование. – 2003. – № 11. – С. 42.
27. Голованова О.А., Козут В.В., Желяев Е.В. // Обзорение прикладной и промышленной математики. – 2003. – **10**, № 2. – С. 458.
28. *Batinic D., Milosevic D., Blau N. et al.* // J. Chem. Inf. Comp. Sci. – 2000. – **40**, N 3. – P. 607.
29. *Brown S.A., Munver R., Delvecchio F.C. et al.* // Urology. – 2000. – **56**, N 3. – P. 364.
30. *Carini M., Aldini G., Piccone M. et al.* // Farmaco. – 2000. – **55**, N 8. – P. 526.
31. *Holmes R.P., Goodman H.O., Assimos D.G.* // Kidney Int. – 2001. – **59**, N 1. – P. 270.
32. *Ozgurtas T., Yakut G., Gulec M. et al.* // Urol Int. – 2004. – **72**, N 3. – P. 233.
33. *Shad M. A., Ansari T. M., Afzal U. et al.* // OnLine J. Biolog. Sci. – 2001. – **1**, N 11. – P. 1063.
34. Голованова О.А., Ачкасова Е.Ю., Пунин Ю.О. и др. // Кристаллография. – 2006. – **51**, № 2. – С. 376.
35. Голованова О.А., Высоцкий А.С. // Бутлеров. сообщ. – 2011. – **26**, № 12. – С. 45.
36. *Khan S.R., Maslamani S.A., Atmani F. et al.* // Calcif. Tissue Int. – 2000. – **66**, N 2. – P. 90.
37. *Massey L.K., Kynast Gales S.A.* // J. Amer. Diet. Assoc. – 2001. – **101**, N 3. – P. 326.
38. *Maslamani S., Glenton P.A., Khan S.R.* // J. Urol. – 2000. – **164**. – P. 230 – 236.
39. Голованова О.А., Пунин Ю.О., Высоцкий А.С. и др. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – № 19. – С. 501.
40. Голованова О.А., Корольков В.В., Пунин Ю.О. и др. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2013. – **21**, № 4. – С. 401.
41. Голованова О.А., Корольков В.В., Пунин Ю.О. и др. // Вестн. Омск. ун-та. – 2013. – № 2. – С. 34.
42. Кидяров Б.И. Кинетика образования кристаллов из жидкой фазы. – Новосибирск: Наука, 1979.
43. *Brown Ch. M., Ackerman D. K., Purich D.L. et al.* // J. Cryst. Growth. – 1991. – **108**. – P. 455.
44. *Marcovic M., Komunjer Lj., Furedi-Milhofer H., Skrtic D.* // J. Cryst. Growth. – 1987. – **80**, N 1. – P. 118.
45. *Fleming D.E., Bronswijk W., Ryall R. L.* // J. Clinical Science. – 2001. – **101**. – P. 15.
46. Марри Р., Греннер Д., Мейс П., Родуэлл В. Биохимия человека. – М.: Мир, 1993. – Т. 1.
47. *Lide D.R.* CRC Handbook of Chemistry and Physics. 90th ed. – CRC Press: Boca Raton, FL, 2010.
48. Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии. – М.: Химия, 1982.
49. Изатулина А.Р., Пунин Ю.О., Голованова О.А. // Журн. структур. химии. – 2014. – **55**, Прилож. 1. – С. S41 – S47.
50. Левич В.Г. Физико-химическая гидродинамика. – М.: Физматгиз, 1959.
51. Современная кристаллография. – Т. 3. – М.: Наука, 1980.
52. Линников О.Д. Закономерности кристаллизации неорганических солей из водных растворов. Автореф. ... докт. дис. – Екатеринбург, 2011.