



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543:577.1:616.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12138

Хроматографический анализ аминокислотного состава желчных камней

**Екатерина Валерьевна Машина[✉],
Светлана Николаевна Шанина, Ольга Евгеньевна Амосова**

Институт геологии Федерального исследовательского центра

«Коми научный центр Уральского отделения РАН», Сыктывкар, Россия, mashina@geo.komisc.ru[✉]

Аннотация. Желчнокаменная болезнь (холелитиаз) – многофакторное заболевание, характеризующееся образованием желчных камней. Изучение состава желчных камней необходимо для установления механизма их образования и решения многих практических вопросов. На данный момент, неясно, какая белковая компонента участвует в формировании желчных камней и как она связана с их составляющими. В работе показана возможность качественного и количественного определения аминокислот в составе желчных камней мужчин и женщин разного возраста с использованием метода газовой хроматографии GC-17A (Shimadzu). Анализ аминокислотного состава желчных камней включает в себя кислотный гидролиз образцов с 6М HCl при 105°C в течение 12 часов, последующую очистку, получение производных выделенных аминокислот и их определение методом газовой хроматографии. Данная методика позволяет определять D- и L-формы аминокислот. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы Statistica 6.0. В результате проведенного исследования установлено, что желчные камни холестеринового состава, принадлежащие женщинам, возраст которых не превышал 50 лет, характеризуются самыми низкими содержаниями аминокислот. В аминокислотном составе холестеринового типа камней преобладают глицин и L-формы серина, аланина и глутаминовой кислоты. Холестериновые камни с минеральной компонентой характерны для пожилых женщин (старше 60 лет) и мужчин среднего возраста (от 37 лет), и имеют более высокие содержания аминокислот, чем холестериновые желчные камни. В данном типе камней преобладают глицин и L-формы лейцина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты. Самые высокие содержания аминокислот установлены в пигментных камнях, как у мужчин, так и у женщин старше 55 лет. В аминокислотном составе камней пигментного типа преобладают глицин и L-формы глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, лейцина, аланина. В желчных камнях холестеринового состава D-аминокислоты не обнаружены. В холестериновых камнях с минеральной компонентой и пигментных желчных камнях установлена D-аспарагиновая кислота. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод газовой хроматографии для изучения аминокислотного состава желчных камней.

Ключевые слова: аминокислотный анализ, кислотный гидролиз, газовая хроматография, аминокислоты, желчные камни.

Благодарности: работа выполнена в рамках темы НИР ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (ГР № 122040600009-2).

Для цитирования: Машина Е.В., Шанина С.Н., Амосова О.Е. Хроматографический анализ аминокислотного состава желчных камней // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 246-256. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12138>

Original article

Chromatographic analysis of the amino acid composition of gallstones

Ekaterina V. Mashina[✉], Svetlana N. Shanina, Olga E. Amosova

Institute of Geology of Federal Research Centre "Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences", Syktывkar, Russia, mashina@geo.komisc.ru[✉]



Abstract. Gallstone disease (cholelithiasis) is a multifactorial disease characterised by the formation of gallstones. Studying the composition of gallstones is necessary to understand the mechanism of their formation and to solve many practical issues. At present, it is not clear which protein component is involved in the formation of gallstones and how it is related to their components. The study showed the possibility of qualitative and quantitative determination of amino acids in the composition of gallstones of men and women of different ages using a GC-17A gas chromatograph (Shimadzu). Analysis of the amino acid composition of gallstones includes acid hydrolysis of samples with 6M HCl at 105°C for 12 hours, subsequent purification, obtaining derivatives of isolated amino acids, and their determination by gas chromatography. This technique enables the determination of D- and L-forms of amino acids. Statistical processing of the obtained data was carried out using Statistica 6.0. The study revealed that cholesterol gallstones belonging to women up to 50 years of age have the lowest amino acid content. The amino acid composition of cholesterol gallstones is dominated by glycine and L-forms of serine, alanine, and glutamic acid. Cholesterol gallstones with mineral content are typical for elderly women (over 60 years) and middle-aged men (from 37 years), and have higher amino acid content than cholesterol gallstones. Glycine and the L-forms of leucine, glutamic acid, and asparagic acid are prevalent in these types of gallstones. The highest amino acid content was recorded in pigment gallstones of both men and women over 55 years of age. The amino acid composition of pigment gallstones is dominated by glycine and L-forms of glutamic acid, asparagic acid, leucine, and alanine. In cholesterol gallstones, no D-amino acids were found. In cholesterol gallstones with mineral content and pigmented gallstones, D-aspartic acid was detected. The obtained results allow us to recommend the method of gas chromatography for studying the amino acid composition of gallstones.

Keywords: amino acid analysis, acid hydrolysis, gas chromatography, amino acids, gallstones.

Acknowledgements: the work was carried out within the framework of research project of the Institute of Geology of Federal Research Centre "Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences" No. 122040600009-2.

For citation: Mashina E.V., Shanina S.N., Amosova O.E. Chromatographic analysis of the amino acid composition of gallstones. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 246-256. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12138>

Введение

Желчнокаменная болезнь (холелитиаз) относится к дисметаболическому заболеванию, обусловленному образованием желчных камней в гепатобилиарной системе человека. Холелитиаз занимает одно из ведущих мест среди заболеваний органов пищеварения, необходимость его исследований очевидна, поскольку в мире постоянно увеличивается число пациентов, связанных с патогенным камнеобразованием в организме человека. Знание тонкостей патогенеза холелитиаза является ключом для разработки эффективных мер профилактики и осуществления успешного лечения данного заболевания. Выделяют холестериновый и пигментный холелитиаз. Данное разделение обусловлено основными камнеобразующими компонентами. В холестериновых камнях таким компонентом является холестерин, в пигментных камнях – билирубинат кальция. Холестериновый холелитиаз характерен в большей степени для

стран с западным стилем жизни и составляет до 80% случаев, тогда как пигментный – для стран востока [1, 2]. Желчнокаменная болезнь встречается значительно чаще у женщин, чем у мужчин [3, 4]. С возрастом частота образования желчных камней возрастает [5, 6]. В процессах формирования желчных камней помимо холестерина и билирубината кальция принимают участие и другие составляющие – минеральная компонента (фосфат кальция, карбонат кальция), белки, смеси различных металлов, в том числе железо, медь и другие. На сегодняшний день белковая компонента в патогенезе желчнокаменной болезни наименее изучена. В литературе есть лишь отдельные данные о муцинах, которые взаимодействуют с холестерином [7-10], а также о присутствии в желчи плазменных белков [11, 12]. Получить информацию о составе белковых веществ, принимающих участие в образовании желчных камней, может исследование их аминокислотного

состава. Большинство публикаций касаются аминокислот для патогенных образований посвящены мочекаменной болезни и их исследованию в моче [13 – 16]. Отмечается важность подобных исследований, так как они могут дать представления о роли белково-аминокислотного метаболизма в образовании камней. Анализ аминокислотного состава желчных камней посвящены единичные работы, с кратким описанием методики и исследованием их методом жидкостной хроматографии [17]. В связи с этим, основной целью данного исследования было изучение аминокислотного состава желчных камней методом газовой хроматографии в образцах разного состава с привязкой к пациентам (пол, возраст).

Экспериментальная часть

Исследования аминокислотного состава проведено для двадцати образцов желчных камней сформированных в желчном пузыре мужчин и женщин разного возраста. Среди них 16 образцов принадлежали женщинам и 4 образца – мужчинам. Пациенты были проинформированы о целях проведения исследований. Полная характеристика образцов с данными по фазовому составу, а также возрасту мужчин и женщин представлена в таблице 1. Для анализа аминокислотного состава использовали 100 мг навески тщательно растертых образцов желчных камней.

Анализ аминокислотного состава желчных камней включает в себя гидролиз образцов, последующую очистку, получение производных аминокислот, их разделение и идентификацию методом газовой хроматографии. За основу методики взяты методы определения энантиомеров аминокислот, изложенные в работах [18-21]. Все реагенты, используемые в работе, имеют высокую степень чистоты (осч), для приготовления растворов используется бидистиллированная и деионизированная вода.

Гидролиз. Для извлечения связанных аминокислот применялся кислотный гидролиз образцов в 6М HCl при температуре 105°C в течение 12 часов. Данные температура и время были выбраны исходя из рекомендаций по анализу энантиомеров аминокислот, чтобы исключить риск их рацемизации в ходе гидролиза [21].

Очистка образцов и выделение аминокислот. Полученные гидролизаты, кроме аминокислот, также содержат различные органические и неорганические соединения, поскольку исходные образцы характеризуются сложным фазовым составом. Исследования [21-25], показали, что для выделения аминокислот из подобных гидролизатов необходима их предварительная очистка, а наилучшие результаты получаются при применении для этих целей ионообменной смолы Dowex 50W X8. Она относится к группе сильнокислотных гелеобразных катионитов на основе сополимеров стирола-дивинилбензола. В нашей работе мы пользовались исключительно этими рекомендациями, своих исследований в данном направлении не проводилось.

Полученные гидролизаты отфильтровывали от остатков исходной пробы через мембранные стеклянные фильтры (GF6) в круглодонные колбы и добавляли внутренний стандарт (L-норвалин). Затем на роторном испарителе в вакууме отгоняли соляную кислоту при температуре 40°C, для того чтобы исключить возможность рацемизации аминокислот при высоких температурах. Полученные сухие остатки перерастворяли в 4 см³ 0.05М HCl и переносили в полипропиленовые колонки (25 см³), заполненные 3 г катионообменной смолы Dowex 50W X8 (фракция зерен 100-200 меш, общая пропускная способность 1.7 экв/дм³). В круглодонные колбы добавляли 4 мл 0.01М HCl и содержимое колб вновь переносили на колонки. Для удаления ионов металлов (Fe, Al и др.) и некоторых органических соединений (небольшие ароматические

Таблица 1. Характеристика образцов

Table 1. Characteristics of samples

№ образца	Фазовый состав	Возраст	Пол	ΣАК, мг/г
1	холестерин	35	ж	2.1
8	– // –	44	ж	1.9
5	– // –	46	ж	1.4
2	– // –	47	ж	1.0
3	– // –	49	ж	2.1
7	– // –	49	ж	1.2
4	– // –	50	ж	2.7
6	– // –	50	ж	3.4
13	холестерин, карбонат кальция	60	ж	8.3
16	холестерин, карбонат кальция	61	ж	4.4
12	холестерин, фосфат кальция	65	ж	7.8
9	холестерин, фосфат кальция	72	ж	5.6
11	холестерин, фосфат кальция	76	ж	7.2
15	холестерин, карбонат кальция	37	м	8.9
14	холестерин, карбонат кальция	38	м	4.8
10	холестерин, фосфат кальция	57	м	7.9
21	билирубинат кальция, карбонат кальция	55	ж	21.8
19	билирубинат кальция, фосфат кальция	60	ж	30.0
23	билирубинат кальция	67	ж	32.5
22	билирубинат кальция, карбонат кальция	58	м	30.1

Примечание: ж – женщина, м – мужчина, ΣАК – общее содержание аминокислот.

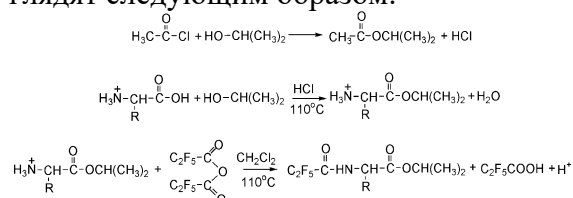
Notes: w – female, m – male, ΣАК – total amino acid content.

амины, аминсахара и др.) колонки промывали последовательно 5 раз по 5 см³ 0.1 М щавелевой кислоты (рН 1.6-1.8), 5 см³ 0.01М HCl и 5 см³ деионизированной воды. Затем в круглодонные колбы выделяли аминокислоты пропусканием через колонку 5 раз по 5 см³ 2.5М NH₄OH. Полученные растворы вновь отгонялись досуха на роторном испарителе и содержимое колб перерастворяли в 4 см³ 0.1М HCl. При наличии помутнения раствора или осадка содержимое переносили в микропробирки типа эппендорф и центрифугировали в течение 15 мин при

8000 об/мин. Затем жидкость декантировали в вials на 5 см³, выдерживали в течение 24 часов при -18°C и высушивали в замороженном состоянии.

Получение производных аминокислот.
 Для разделения оптических изомеров аминокислот методом газовой хроматографии широко применяются хиральные капиллярные колонки (например: CP-Chirasil Val, CP-Cyclodextrin-β-2,3,6-M-19, CP-Chirasil-DEX CB, CHIRALDEX G-TA). Для получения хорошо разделяемых пиков на подобных хиральных фазах аминокислоты необходимо перевести в их N(O)-трифторацетил (TFA)- или

N(O)-пентафторпропионил (PFP) изопрпиловые эфиры [18-20]. В нашей работе мы остановились на получении PFP-производных аминокислот, поскольку они являются более стабильными, по сравнению с TFA-производными [26, 27]. Уравнения реакций дериватизации выглядят следующим образом:



В высушенные образцы добавляли 800 мкл 4 М HCl в изопропанол, приготовленный смешиванием ацетилхлорида с изопрпиловым спиртом в соотношении 1:2.5 при 0°C. Вials плотно закрывали, нагревали при 110°C в течение 30 мин и охлаждали до комнатной температуры. Надсадочную жидкость переносили в вials на 1 см³ и остатки реагента удаляли под струей азота. Затем добавляли 260 мкл дихлорметана и 260 мкл пентафторпропионового ангидрида и вновь нагревали при 110°C в течении 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое вials вновь высушивали под азотом, а полученные производные N(O)-пентафторпропионил изопрпиловые эфиры аминокислот растворяли в 1 см³ дихлорметана и переносили в вials для хроматографии.

Газохроматографический анализ. Анализы полученных дериватов аминокислот выполнялись на газовом хроматографе GC-17A (Shimadzu) с пламенно-ионизационным детектором и автоматическим дозатором ввода проб. Для разделения аминокислот использовали капиллярную колонку CP-Chirasil L-Val, (длина 25 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина пленки 0.12 мкм, Varian Inc). Данная колонка содержит химически связанный с полисилоксанами L-валин-трет-бутиламид и была специально разработана для разделения энантиомеров аминокислот. Выбор условий анализа подбирался

экспериментально. В качестве газа-носителя использовали гелий. Скорость газа-носителя – 1 см³/мин. Ввод проб в колонку осуществлялся с делением потока (1:40). Температура испарителя составляла 250°C, пламенно-ионизационного детектора – 275°C. Анализ проводили при программировании температуры термостата колонок: 4 мин в изотермическом режиме при температуре 80°C, затем подъем температуры до 110°C со скоростью 4°C/мин, выдержка в течение 10 мин, подъем температуры до 160°C со скоростью 4°C/мин, подъем температуры до 190°C со скоростью 10°C/мин и изотермический режим в течение 7 мин. Обработка и запись хроматограмм осуществлялись программой GS Solution. Идентификация аминокислот на хроматограммах проводилась путем сравнения времени выхода пиков анализируемых соединений с временами удерживания эталонных аминокислот. Время удерживания – это время от момента ввода пробы в испаритель до момента, соответствующего максимальному значению сигнала для данного компонента на хроматограмме. Количественный анализ аминокислот проводится с использованием метода внутреннего стандарта [28]. Суть данного метода заключается в том, что к пробе с анализируемыми веществами добавляется известное количество стандарта. В качестве такого стандарта обычно подбирается такое вещество, которое отсутствует в анализируемой смеси и не реагирует с её компонентами. Основное достоинство метода внутреннего стандарта состоит в том, что он не требует воспроизводимого ввода пробы по величине. Количество стандарта подбирают так, чтобы площадь его пика была соизмерима с площадью пиков компонентов анализируемой смеси. Концентрация определяемого компонента (C_x) в анализируемом веществе рассчитывается по формуле:

$$C_x = (S_x \cdot m_{\text{ст}} / S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{см}}) \cdot K_x,$$

где $S_{ст}$ – площадь пика стандарта, S_x – площадь пика анализируемого вещества, $m_{ст}$ – масса добавленного внутреннего стандарта, $m_{см}$ – масса пробы анализируемой смеси, K_x – калибровочный коэффициент.

Калибровочный коэффициент рассчитывается для каждого отдельного вещества путем приготовления ряда искусственных смесей исследуемого вещества со стандартом при их различных соотношениях. На основании полученных данных строятся графики в координатах $S_{ст}/S_x$ и $m_{ст}/m_x$ и рассчитывается угловой коэффициент K_x , представляющий собой калибровочную константу для данного анализируемого вещества.

Метод позволяет определять D и L формы для некоторых аминокислот (аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, фенилаланин, тирозин, лизин), глицина и ряда небιοгенных аминокислот (β -аланин, δ -аминовалериановая кислота, γ -аминомасляная кислота). Данная методика не позволяет определять аргинин, гистидин, цистин, поскольку для их анализа требуются индивидуальные условия дериватизации, а также триптофан и метионин, поскольку для них требуются другие условия гидролиза.

Аналитические исследования выполнялись в ЦКП «Геонаука» в ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Математическую обработку данных по содержаниям аминокислот осуществляли с использованием программы Statistica 6.0.

Обсуждение результатов

По данным анализируемой выборки содержания аминокислот в желчных камнях широко варьировали, что указывает на различное количество в них белковой компоненты (см. табл. 1, Σ АК). Во всех изученных желчных камнях аминокислоты в основном представлены L-формами (рис. 1). Для выявления групп желчных камней схожих по аминокислотному

составу был применен метод кластерного анализа [29]. Статистический анализ хроматографических данных показал, что исследуемые образцы разделились на три основных типа – холестериновый (Обр. 1-8), холестериновый с минеральной компонентой (фосфат кальция, карбонат кальция) (Обр. 10-16), пигментный (Обр. 19, 21-23). В аминокислотном составе холестеринового типа желчных камней доминируют глицин, серин, глутаминовая кислота и аланин (рис. 2, а). Данный тип желчных камней установлен только у женщин, возраст которых не превышал 50 лет. К холестериновым с минеральной компонентой отнесены образцы желчных камней, принадлежащих как женщинам, так и мужчинам. Причем в этой выборке оказались женщины старше 60 лет, а возраст мужчин варьировал от 37 до 57 лет. В аминокислотном составе желчных камней данного типа преобладают глицин, лейцин, глутаминовая кислота и аспарагиновая аминокислота (рис. 2, б). В пигментный тип желчных камней попали четыре образца, три из которых принадлежат женщинам и один – мужчине, возраст которых варьировал от 55 до 67 лет. В этом типе желчных камней доминируют глицин, глутаминовая кислота, лейцин, аспарагиновая кислота и аланин (рис. 2, в).

В желчных камнях холестеринового состава D-аминокислоты не обнаружены. При этом, в образцах холестериновых камней с минеральной компонентой и пигментных желчных камнях установлена D-аспарагиновая кислота. Для холестериновых желчных камней с минеральной компонентой её содержания меняются от 0.01 до 0.06 мг/г, показатель D/L-Asp составляет 0.04-0.09, а для пигментных камней от 0.20 до 0.35 мг/г, и 0.13-0.17 соответственно.

На основании проведенного хроматографического анализа аминокислот в образцах выявлены очень высокие содержания глицина в желчных камнях всех изученных типов. Это объясняется тем, что

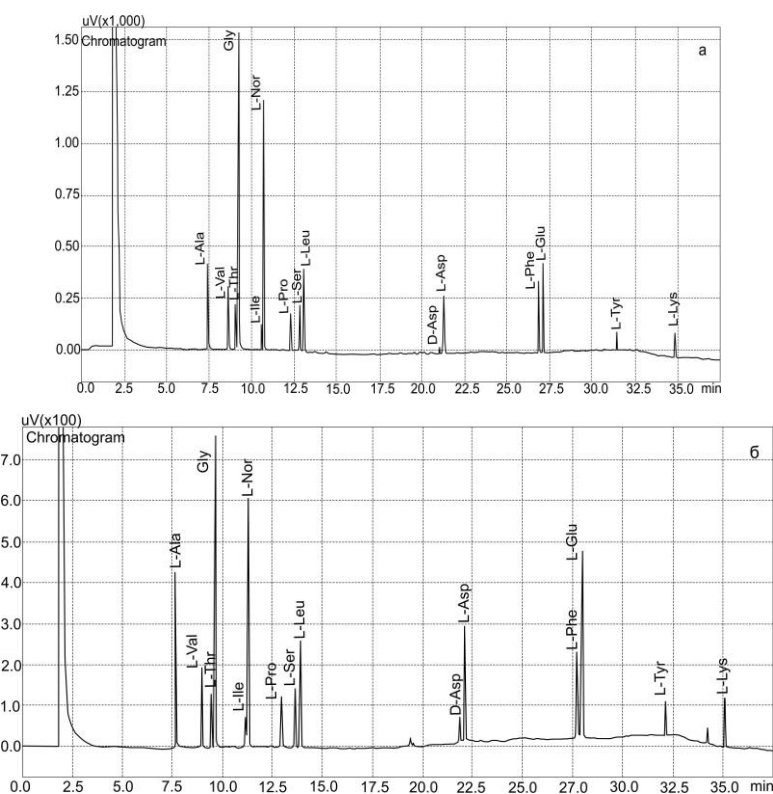


Рис. 1 Вид хроматограмм для образцов желчных камней 13 (а) и 21 (б). Буквенные обозначения: Ala – аланин, Val – валин, Gly – глицин, Пе – изолейцин, Ser – серин, Leu – лейцин, Pro – пролин, Asp – аспарагиновая кислота, Glu – глутаминовая кислота, Phe – фенилаланин, Tyr – тирозин, Lys – лизин, Nor – норвалин (внутренний стандарт).

Fig. 1. Chromatograms of gallstone samples 13 (a) and 21 (b). Designation: Ala – alanine, Val – valine, Gly – glycine, Пе – isoleucine, Ser – serine, Leu – leucine, Pro – proline, Asp – asparagic acid, Glu – glutamic acid, Phe – phenylalanine, Tyr – tyrosine, Lys – lysine, Nor – norvaline (internal standard)

глицин, в отличие от других аминокислот, входит не только в состав белковой компоненты, но и в состав глициноконъюгированных желчных кислот, которые, как известно, содержатся в желчи [11].

Установлено, что холестериновый тип желчных камней характеризуется наименьшими, а пигментный тип наибольшими содержаниями аминокислот. В пигментных желчных камнях, состоящих из билирубината кальция и кальциевой минеральной компоненты, увеличена доля кислых аминокислот, а также лейцина. Это может предполагать, что в их формировании принимали участие, например плазменные белки. Известно, что в альбумине, который является основным представителем белков крови, а также α -глобулинах преобладают лейцин

и гидрофильные аминокислоты – глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота оказывающие влияние на растворимость [30]. Установлено, что большинство белков плазмы крови могут связываться с кальциевой минеральной компонентой, например с карбонатом кальция [31]. Утверждается, что белки, богатые аспарагиновой и глутаминовой аминокислотами с большей вероятностью будут принимать участие в патогенезе мочевого камней состоящих из оксалата кальция, чем те, которые обладают лишь небольшим количеством таких остатков [14, 15]. Тем самым можно полагать, что аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты, имеющие как минимум две карбоксильные группы, в некоторых белках

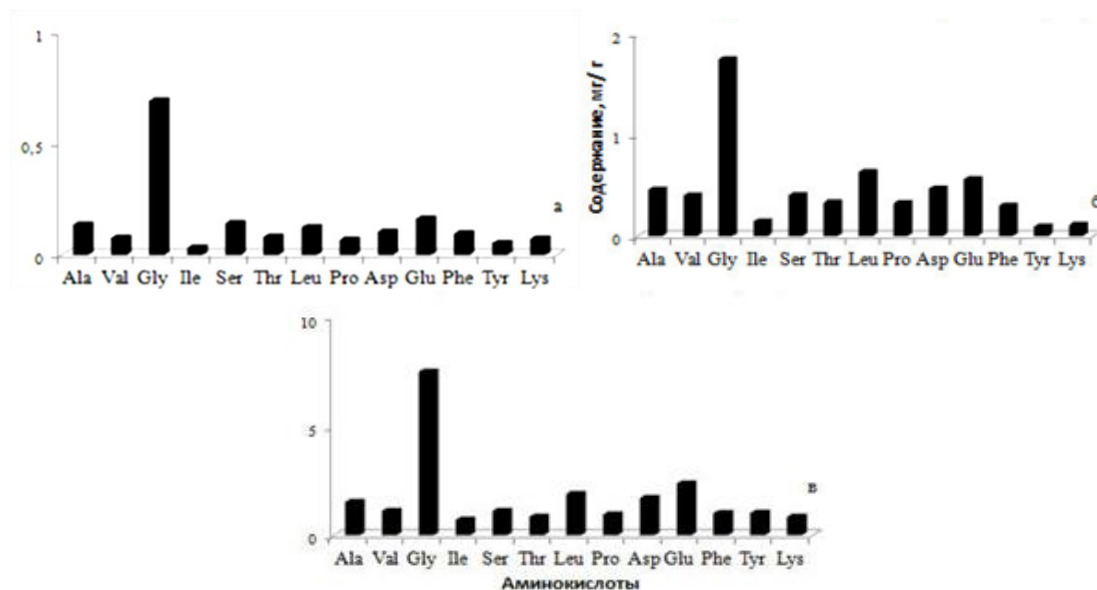


Рис 2. Медианные значения содержаний L-аминокислот в желчных камнях (мг/г): а – холестериновые (n = 8), б – холестериновые с минеральной компонентой (n = 8), в – пигментные (n = 4). Примечание. n – количество образцов.

Fig. 2. Median values of contents of L-amino acids in gallstones (mg/g). a – cholesterol type (n = 8), b – cholesterol with mineral component (n = 8), c – pigment type (n = 4). Note. n - amount of samples.

связываются с минеральной компонентой, в структуре которой, находится кальций.

Мы не исключаем присутствие в желчных камнях, более сложных белков гликопротеидов, содержащих олигосахаридные боковые цепи, присоединенные к аминокислотам. Кислотный гидролиз таких белков может не всегда приводить к переходу в гидролизат некоторых аминокислот. Согласно литературным данным [7 – 10], муцины могут взаимодействовать с холестерином. Возможно, что в холестериновых камнях содержатся подобные белки. Мы предполагаем, что причиной формирования камней холестеринового состава является пересыщение желчи холестерином. Связывание его с гликопротеидами происходит, вероятно, посредством дисперсионного взаимодействия [32].

В желчных камнях, часто обнаруживается различная микрофлора [33]. В связи с чем, источниками D-аспарагиновой кислоты в них могут являться микроорганизмы, которые, как известно, содержат

энантиомеры аминокислот [34]. Кроме того, появление D-форм может быть связано с рацемизацией белков в ходе патологических процессов [35]. В пигментных камнях содержание D-аминокислот выше, что может быть связано с наложением обоих факторов.

Заключение

Предложен способ определения некоторых аминокислот (D- и L-форм) в составе желчных камней. Анализ включает в себя кислотный гидролиз подготовленных образцов желчных камней с 6M HCl при 105°C в течение 12 часов, их последующую очистку, получение производных выделенных аминокислот и дальнейшее определение методом газовой хроматографии. Проведенные исследования позволили выявить некоторые особенности составов желчных камней. Желчные камни холестеринового состава, сформированные в организме женщин, не старше 50 лет характеризуются самыми низкими содержаниями аминокислот. В аминокислотном составе желчных камней данного

типа преобладают глицин и L-формы серина, аланина и глутаминовой кислоты. В холестериновых камнях с присутствием минеральной компоненты (карбонат кальция, фосфат кальция) содержания аминокислот выше. В их составе доминируют глицин и L-формы лейцина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты. Они сформированы в организме женщин старше 50 лет и мужчин среднего и зрелого возраста. В пигментных камнях установлены самые высокие содержания аминокислот, с преобладанием в составе глицина и L-форм глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, лейцина, аланина. Такие желчные камни выявлены у мужчин и женщин старше 55 лет.

В камнях холестеринового типа D-аминокислоты не обнаружены, тогда как в холестериновых камнях с минеральной компонентой и пигментных желчных камнях обнаружена D-аспарагиновая кислота. Присутствие D-форм может

быть связано с рацемизацией белков и микрофлорой. В пигментных камнях содержание D-аминокислот выше, что может быть связано с наложением обоих факторов.

Поскольку в желчных камнях могут содержаться сложные гликопротеиды, которые не до конца разрушаются при кислотном гидролизе, то полученные нами данные по содержанию некоторых аминокислот, возможно занижены. Полученные результаты носят предварительный характер, исследования аминокислотного состава желчных камней методом газовой хроматографии будут продолжены.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Shaffer E.A. Epidemiology and risk factors for gallstone disease: has the paradigm changed in the 21st century? *J. Curr. Gastroenterol Rep.* 2005; 7(2): 132-40.
2. Mendez-Sanchez N., Bahena-Aponte J., Chavez-Tapia N., Motola-Kuba D., Sanchez-Lara K., Ponciano-Radriguez G., Ramos M., Uribe M. Strong association between gallstones and cardiovascular disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2005; 100(4): 827-830.
3. Novacek G. Gender and gallstone disease. *Wien Med Wochenschr.* 2006; 156: 527-533.
4. Stinton L.M., Shaffer E.A. Epidemiology of Gallbladder Disease: gallstone disease and cancer. *Gut Liver.* 2012; 6(2): 172-187.
5. Bergman S., Sourial N., Vedel I., Hanna W.C., Fraser S.A., Newman D., Bilek A.J., Galatas C., Marek J.E., Monette J.

Gallstone disease in the elderly: are older patients managed differently? *Surg Endosc.* 2011; 25: 55-61.

6. Skvortsov V.V., Khalilova U.A. Diagnostika i lechenie zhelchnokamennoj bolezni. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya.* 2018; 157 (9): 142-150. (In Russ).

7. Berg A.A., Buul J.D., Ostrow J.D., Groen A.K. Measurement of cholesterol gallstone growth in vitro. *J. Lipid Res.* 2000; 41: 189-194.

8. Yoo K.S., Choi H.S., Jun D.W., Lee H.L., Lee O.Y., Yoon B.C., Lee K.G., Paik S.S., Kim Y.S., Lee J. MUC expression in gallbladder epithelial tissues in cholesterol-associated gallbladder disease. *Gut Liver.* 2016; 10(5): 851-858.

9. Lee S., Lamont J., Carey M. Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones. *Clin Invest.* 1981; 67: 1712-1723.

10. Dayan Y., Vilkin A., Niv Y. Gallbladder mucin plays a role in gallstone



- formation. *European Journal of Internal Medicine*. 2004; 15(7): 411-414.
11. Ichenko A.A. ZHelchekamennaya bolezni'. M.: Anaharasis. 2004; 200 p. (In Russ).
12. Reshetnyak V.I. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J. Gastroenterol*. 2013; 19(42): 7341-7360.
13. Primiano A., Persichilli S., Ferraro P. M., Calvani R., Biancolillo A., Marini F., Picca A., Marzetti E., Urbani A., Gervasoni J. A Specific Urinary Amino Acid Profile Characterizes People with Kidney Stones. *Disease Markers*. 2020; 1-7.
14. Kohri K., Takada M., Katoh Y., Kataoka Kurita T. Amino acids in urine and plasma of urolithiasis patients. *International Urology and Nephrology*. 1989; 21: 9-16.
15. Fleming D., Bronswijk W., Ryall R. A comparative study of the adsorption of amino acids on to calcium minerals found in renal calculi. *Clinical Science*. 2001; 101: 159-168.
16. Shaker Y.M., El-Hawary M.F., Zahran M.M., Mostafa S.O. Urine and Calculus Amino Acids in the Different Types of Urolithiasis. *Urol Int*. 1983; 38(1): 51-54.
17. Chen Y, Wang L.L., Xiao Y.X., Ni J.H., Yu Y. Analysis of amino acid constituents of gallstones. *World J Gastroenterol*. 1997; 3: 255-256.
18. Frank H. Chiral stationary phases for capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography Communications*. 1988; 11: 787-792.
19. Frank H., Rettenmeier A., Weicker F., Nicholzen G.J., Bayer E. Determination of enantiomer-labeled amino acids in small volumes of blood by gas chromatography. *Analytical Chemistry*. 1982; 54: 715-719.
20. Ketting D., Wadman S.K., Spaapen L.J.M., Van der Meer S.B., Duran M. Gas chromatography method for separation of amino acids enantiomers in plasma and urine. *Clinica Chimica Acta*. 1991; 204: 79-86.
21. Amelung W., Zhang X. Determination of amino acid enantiomers in soils. *Soil biology and biochemistry*. 2001; 33: 553-562.
22. Sowden F.J. Effect of hydrolysis time and iron and aluminum removal on the determination of amino compounds in soil. *Soil Science*. 1969; 107: 264-371.
23. Leenheer J.A., Huffman E.W.D. Analytical method for dissolved-organic carbon fractionation. *U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigations*. 1979. 16 p.
24. Qualls R.G., Haines B.L. Geochemistry of dissolved organic nutrients in water percolating through a forest ecosystem. *J. Soil Sci. Soc. Am*. 1991; 55: 1112-1123.
25. Erbe T., Bruckner H. Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. *Journal of Chromatography A*. 2000; 881: 81-91.
26. Abdalla S., Bayer E., Frank H., Derivatives for separation of amino acid enantiomers. *Chromatographia*. 1987; 23: 83-85.
27. Brueckner H., Schieber A. Determination of amino acid enantiomers in human urine and blood serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr*. 2001; 15: 166-172.
28. Vyahirev A.A., Shushunova A.F. Rukovodstvo po gazovoj hromatografii: Ucheb. posobie dlya him. i him.-tekhnolog. spec. vuzov. M., Vyssh. shk. 1987. 335 p. (In Russ).
29. Kim J.O., Mueller C.W., Klecka W.R., Oldenderfer M.S., Blashfield R.K. Faktornyj, diskriminantnyj i klasternyj analiz. M: Finansy i statistika. 1989. 215 p. (In Russ).
30. Cummings A.J., Flynn F.V. Amino-acid composition of serum proteins in health and disease. *J. Clin. Pathol*. 1955; 8: 153-159.
31. Burt H.M., Jackson J.K., Taylor D.R., Crowther R.S. Activation of human neutrophils by calcium carbonate polymorphs. *Digestive Diseases and Sciences*. 1997; 42(6): 1283-1289.
32. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Mironenko N.V., Butyrskaya E.V. *Lipidomika*.



Voronezh: Izdatel'sko-poligraficheskij centr «Nauchnaya kniga». 2023. 316 p. (In Russ).

33. Stewart L., Oesterle A. L., Erdan I., Griffiss J. M., Way L.W. Pathogenesis of pigment gallstones in Western societies: the central role of bacteria. *J. Gastrointest Surg.* 2002; 6(6): 891-903.

34. Cava F., Lam H., de Pedro M.A., Waldor M.K. Emerging knowledge of regulatory roles of d-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68: 817-831.

35. Timme S., Collins M. Racemization of aspartic acid in human proteins. *J. Ageing Research Reviews.* 2002; 1(1): 43-59.

Информация об авторах / Information about the authors

Е.В. Машина – аспирант, научный сотрудник лаборатории экспериментальной минералогии ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

С.Н. Шанина – кандидат геолого-минералогических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной минералогии ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

О.Е. Амосова – кандидат геолого-минералогических наук, научный сотрудник лаборатории минерально-сырьевых ресурсов ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

E.V. Mashina – Ph. D. student of IG FRC Komi Scientific Center Ural Branch of RAS, researcher laboratory of Experimental mineralogy, Syktyvkar, Russian Federation

S.N. Shanina – Ph.D. in geology and mineralogy, senior researcher laboratory of Experimental mineralogy IG FRC Komi Scientific Center Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation

O.Ye. Amosova – Ph.D. in geology and mineralogy, researcher laboratory of Mineral resources IG FRC Komi Scientific Center Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 22.11.2023; одобрена после рецензирования 27.03.2024; принята к публикации 03.04.2024.

The article was submitted 22.11.2023; approved after reviewing 27.03.2024; accepted for publication 03.04.2024.