

PACS numbers: 68.37.Hk, 81.07.Bc, 87.14.Df, 87.14.Pq, 87.64.Bx, 87.64.km, 87.85.J-

**Влияние витаминов группы В:
тиамина, пиридоксина, цианокобаламина
на патогенез кальция оксалата моногидрата**

Ю. В. Таранец, О. Н. Безкровная, И. М. Притула,
П. В. Матейченко, М. А. Кабаненко

Институт монокристаллов
НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины,
просп. Науки, 60,
61001 Харьков, Украина

Исследовано влияние тиамин (В1), пиридоксина (В6) и цианокобаламина (В12), основных водорастворимых витаминов группы В, на морфологию и размер патогенных кристаллов кальция оксалата моногидрата (СОМ). Установлено, что введение витаминов В1 и В12 в модельную систему на основе оксалата кальция уменьшает агрегацию СОМ и приводит к формированию одиночных кристаллов. Добавление витамина В6 в раствор оксалата кальция приводит к ингибированию роста кристаллов и уменьшению их размеров пропорционально увеличению концентрации добавки. При концентрации витамина В6 ~ 50 ммоль/л происходит уменьшение размера кристаллов СОМ в пять раз по сравнению с чистыми кристаллами СОМ, что свидетельствует об адсорбции молекул пиридоксина на растущих гранях кристаллов СОМ и проявлении ингибирующего эффекта В6 на формирование кристаллов кальция оксалата моногидрата.

The effect of the main water-soluble B-group vitamins (thiamine (B1), pyridoxine (B6) and cyanocobalamin (B12)) on morphology and size of pathogenic calcium oxalate monohydrate (COM) is studied. As revealed, the introduction of the B1 and B12 vitamins into the model system reduces the aggregation of COM crystals and leads to the formation of individual crystals. The addition of B6 vitamin to the solution of calcium oxalate leads to inhibition of crystal growth and decreasing their size in proportion to the increase of the additive concentration. The amount of COM crystals decreases by 5 times at the 50 mM of the B6 vitamin in comparison with pure COM crystals due to adsorption of the pyridoxine molecules on the faces of COM crystals.

Досліджено вплив тіаміну (В1), піридоксину (ВВ6) і ціанокобаламіну (В12), основних водорозчинних вітамінів групи В, на морфологію та

розмір патогенних кристалів кальцію оксалату моногідрату (СОМ). Виявлено, що введення вітамінів В1 і В12 у модельну систему на основі оксалату кальцію зменшує агрегацію кристалів СОМ і приводить до формування поодиноких кристалів. Додавання вітаміну В6 у розчин оксалату кальцію призводить до пригнічення росту кристалів і зменшення їх розмірів пропорційно до збільшення концентрації добавки. При концентрації вітаміну В6 ~ 50 ммоль/л відбувається зменшення розміру кристалів СОМ у п'ять разів у порівнянні з чистими кристалами СОМ, що свідчить про адсорбцію молекул піридоксину на зростаючих гранях кристалів СОМ і виявлення інгібувального ефекту молекул В6 на формування кристалів кальцію оксалату моногідрату.

Ключевые слова: кальция оксалат моногидрат, сканирующая электронная микроскопия, витамин В (тиамин), витамин В6 (пиридоксин), витамин В12 (цианокобаламин).

Keywords: calcium oxalate monohydrate, scanning electron microscopy, vitamin В1 (thiamine), vitamin В6 (pyridoxine), vitamin В12 (cyanocobalamin).

Ключові слова: кальцію оксалат моногідрат, сканувальна електронна мікроскопія, вітамін В (тіамін), вітамін В6 (піридоксин), вітамін В12 (ціанокобаламін).

(Получено 24 января 2018 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Человеческий организм — это биологическая система, в которой непрерывно протекает огромное количество процессов. Эти процессы взаимосвязаны между собой, и в случае изменения работы какого-либо одного процесса нарушается целостность функционирования, что влечёт за собой множество последствий. Одним из примеров такого нарушения является патогенная кристаллизация, в результате которой в организме формируются мочевые, жёлчные, почечные и др. камни. Поэтому выявление механизмов их образования и поиск молекул, влияющих на патогенез кристаллов, на сегодняшний день является актуальным направлением исследований.

В данной работе мы исследовали особенности кристаллизации кальция оксалата моногидрата (СОМ), одного из главных компонентов почечных камней [1, 2], в присутствии водорастворимых витаминов группы В. Существует множество работ о влиянии различных молекул на кристаллизацию СОМ. Рассмотрено влияние белков, полисахаридов, некоторых аминокислот, а также поверхностно-активных веществ на формирование кристаллов СОМ [3–6]. Однако не только эти молекулы способны тем или иным образом влиять на функционирование организма. Всем нам изве-

стен такой класс низкомолекулярных органических соединений, как витамины, играющие огромную роль в организме. Большинство из них не синтезируется организмом; поэтому человек должен получать их с пищей или в виде пищевых добавок.

Несмотря на очевидную необходимость витаминов, роль их в процессах кристаллизации СОМ не установлена. В литературе можно лишь встретить клинические испытания о влиянии некоторых витаминов, в частности А, С, Е [7, 8]. Целью нашей работы было изучить влияние водорастворимых витаминов группы В, в частности, тиамина (В1), пиридоксина (В6) и цианокобаламина (В12) на морфологию и агрегацию кристаллов СОМ.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Кристаллы СОМ получали путём реакции взаимодействия оксалата калия $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ (х.ч.) и хлорида кальция $CaCl_2$ (х.ч.) в контролируемых условиях. Витамины В1, В6, В12 использовали в жидкой форме в виде растворов тиамин гидрохлорида, пиридоксин гидрохлорида и цианокобаламина соответственно. Модельные растворы кристаллов оксалата кальция, как без добавок, так и в присутствии витаминов, создавали в условиях, близких к физиологическим [9–11]. Кристаллизацию проводили при температуре $37^\circ C$ и ионной силе раствора $0,15 M$ (KCl) и $pH = 5,8$ (создавали добавлением $NaOH$ и CH_3COOH). Пересыщение модельных растворов оксалата кальция составляло $4,6$ [12, 13]; соотношение молярных концентраций ионов кальция и оксалат-ионов составляло $20:1$ (концентрации $[Ca^{2+}] = 4$ ммоль/л, $[C_2O_4^{2-}] = 0,2$ ммоль/л). Растворы витаминов В1, В6, В12 вводили перед началом реакции (за начало реакции кристаллизации оксалата кальция принимали добавление в систему раствора оксалата калия). Концентрацию витаминов В1 и В6 в системе варьировали в диапазоне $5-50$ ммоль/л, а концентрацию витамина В12 — в диапазоне $10-100$ мкмоль/л, что не превышало биологические концентрации каждого из витаминов в организме [14, 15].

Морфология кристаллов СОМ изучалась с помощью сканирующей электронной микроскопии (микроскоп JSM-6390LV). Образование фазы оксалата кальция подтверждали методами рентгеноструктурного анализа (дифрактометр ДРОН-2-М) и ИК-спектроскопии (спектрофотометр Spectrum One PerkinElmer).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезируемые образцы оксалата кальция были представлены исключительно в виде кальция оксалата моногидрата [3, 16], и

других фаз обнаружено не было, независимо от природы и концентрации вводимых витаминов. Типичные дифрактограммы образцов СОМ, выращенных в присутствии витаминов, приведены на рис. 1–3.

Витамины В1 (тиамин), В6 (пиридоксин), В12 (цианокобаламин) относятся к гетероциклическим соединениям (рис. 4). Основу химической структуры витамина В1 составляют два гетероцикла: пиридин и тиазол, связанные между собой радикалом. Витамин В6 относится к производным пиридина. По сравнению с другими витаминами, витамин В12 имеет самую сложную химическую структуру, основой которой является корриновое кольцо.

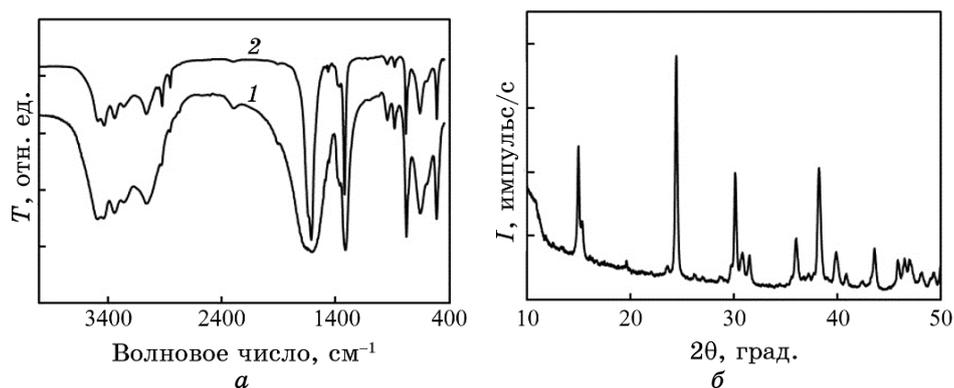


Рис. 1. ИК-спектры кристаллов СОМ, выращенных без добавок (1) и в присутствии 10 ммоль/л В1 (2) (а); дифрактограмма кристаллов СОМ, выращенных в присутствии В1 с концентрацией 10 ммоль/л (б).¹

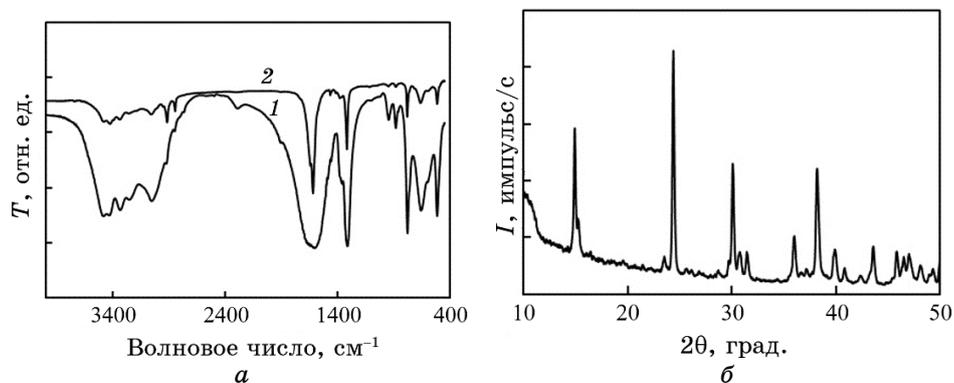


Рис. 2. ИК-спектры кристаллов СОМ, выращенных без добавок (1) и в присутствии 10 ммоль/л В6 (2) (а); дифрактограмма кристаллов СОМ, выращенных в присутствии В6 с концентрацией 10 ммоль/л (б).²

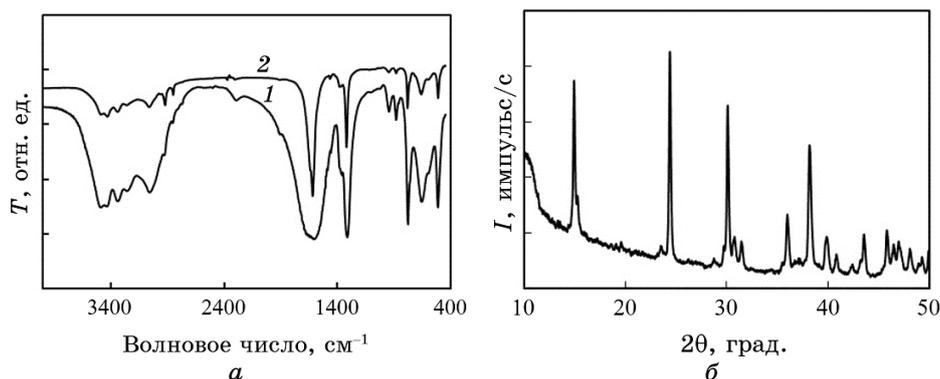


Рис. 3. ИК-спектры кристаллов СОМ, выращенных без добавок (1) и в присутствии 20 мкмоль/л В12(2) (а); дифрактограмма кристаллов СОМ, выращенных в присутствии В12 с концентрацией 20 мкмоль/л (б).³

Витамин В1(тиамин) Витамин В6(пиридоксин) Витамин В12(цианокобаламин)

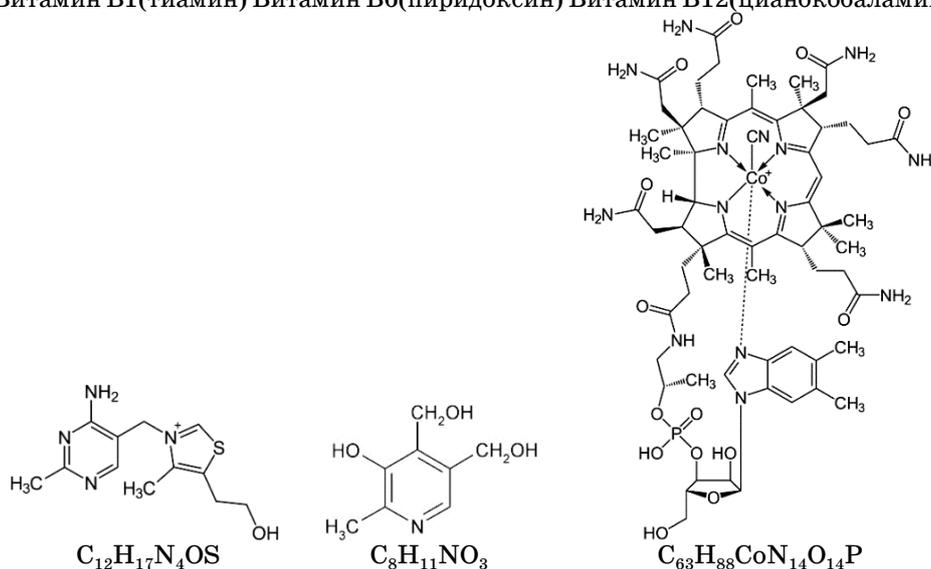


Рис. 4. Структурные формулы витаминов.⁴

Суточная норма витаминов В1 и В6 для взрослого человека составляет 1,1–1,8 мг/сутки, а витамина В12 — 0,4–0,6 мкг/сутки [14, 15]. Исследуемые нами концентрации витаминов более чем на порядок ниже суточных физиологических концентраций, однако, выбранный диапазон концентраций витаминов дает возможность проанализировать динамику роста и морфологию кристаллов СОМ. При высоких концентрациях витаминов анализ

получаемых образцов был затруднён.

При добавлении витамина В1 в концентрации 5–50 ммоль/л в исходную модельную систему на основе оксалата кальция наблюдается изменение морфологии кристаллов СОМ, что характерно для всего выбранного концентрационного диапазона В1 (рис. 5).

Минимальная концентрация вводимого витамина 5 ммоль/л не оказывает влияния на морфологию получаемых кристаллов, формируются агрегаты и дендритные кристаллы СОМ размером ~ 10 мкм, как и в случае чистых кристаллов СОМ (рис. 5, а).

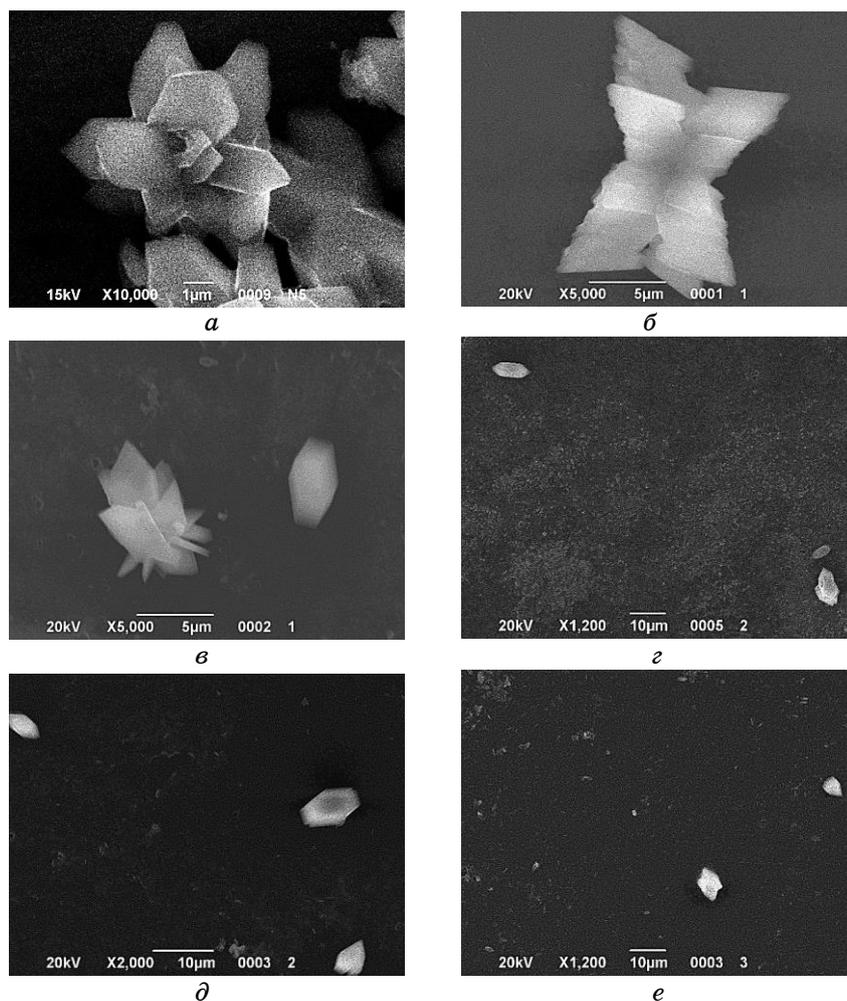


Рис. 5. Морфология кристаллов СОМ, выращенных без добавок (а) и в присутствии витамина В1 с концентрациями: 5 (б), 10 (в), 20 (г), 40 (д) и 50 (е) ммоль/л ($I = 0,15$, $pH = 5,8$, $s = 4,6$).⁵

При концентрациях 10–40 ммоль/л витамина В1 образуются не только агрегаты СОМ, но и одиночные кристаллы СОМ, имеющие типичную морфологию характерную для кристаллов СОМ [17]. Концентрация 50 ммоль/л В1 приводит к формированию одиночных кристаллов размером около 8 мкм.

Следовательно, добавление витамина В1 к оксалату кальция и увеличение его концентрации способствует формированию одиночных кристаллов СОМ, в отличие от чистых кристаллов СОМ, когда формируются исключительно дендриты. При добавлении 10–50 ммоль/л витамина В1 размер образующихся кристаллов практически не изменяется и составляет 7–8 мкм. Для выяснения природы этого явления рассмотрим более подробно ИК-спектры чистых кристаллов СОМ и кристаллов, выращенных в присутствии витамина В1. В ИК-спектрах оксалата кальция наблюдаются полосы поглощения, характерные для СОМ (рис. 1, а). Группа полос в диапазоне 3477–3047 см⁻¹ обусловлена асимметричными и симметричными валентными колебаниями ОН-групп кристаллизационной воды, а полосы поглощения на 1618 и 1316 см⁻¹ — асимметричными и симметричными валентными колебаниями группы С=О. Пик на 780 см⁻¹ обусловлен колебаниями группы О–С=О, а полосы поглощения на 947 см⁻¹ — симметричными колебаниями С–О, на 883 см⁻¹ — колебаниями связи С–С, 660 см⁻¹ — колебаниями ОН-групп. Пик на 516 см⁻¹ обусловлен присутствием связи металл–кислород [16].

В ИК-спектрах кристаллов СОМ, выращенных в присутствии В1 (рис. 1, а), кроме полос поглощения оксалата кальция, наблюдаются полосы, характерные для тиамин. Эти полосы поглощения при 3073 см⁻¹ и 2926 см⁻¹ обусловлены ароматическим и алифатическим колебаниями связи С–Н соответственно. Пик на 1472 см⁻¹ обусловлен колебанием пиримидинового кольца. Кроме того, известно, что для тиамин характерен пик на 1658 см⁻¹, соответствующий колебаниям связи С=N [18]. Однако в наших ИК-спектрах (рис. 1) этот пик отсутствует, а наблюдается изменение ширины и интенсивности пика в области 1613 см⁻¹. Изменение положения и интенсивности пика, по-видимому, обусловлено взаимодействием поверхности растущих граней СОМ с витамином В1 (образование водородных связей и межмолекулярное взаимодействие), в результате чего происходит растяжение пиримидинового кольца и, соответственно, сдвиг пика поглощения.

Введение витамина В6 в систему оксалата кальция с концентрациями 5–50 ммоль/л приводит к ингибированию роста кристаллов и уменьшению их размера (рис. 6). Так, концентрация 5 ммоль/л не оказывает влияния на кристаллизацию СОМ. При концентрациях 10–20 ммоль/л формируются одиночные кристаллы и двойники размером 7–8 мкм, а при 40 ммоль/л В6 —

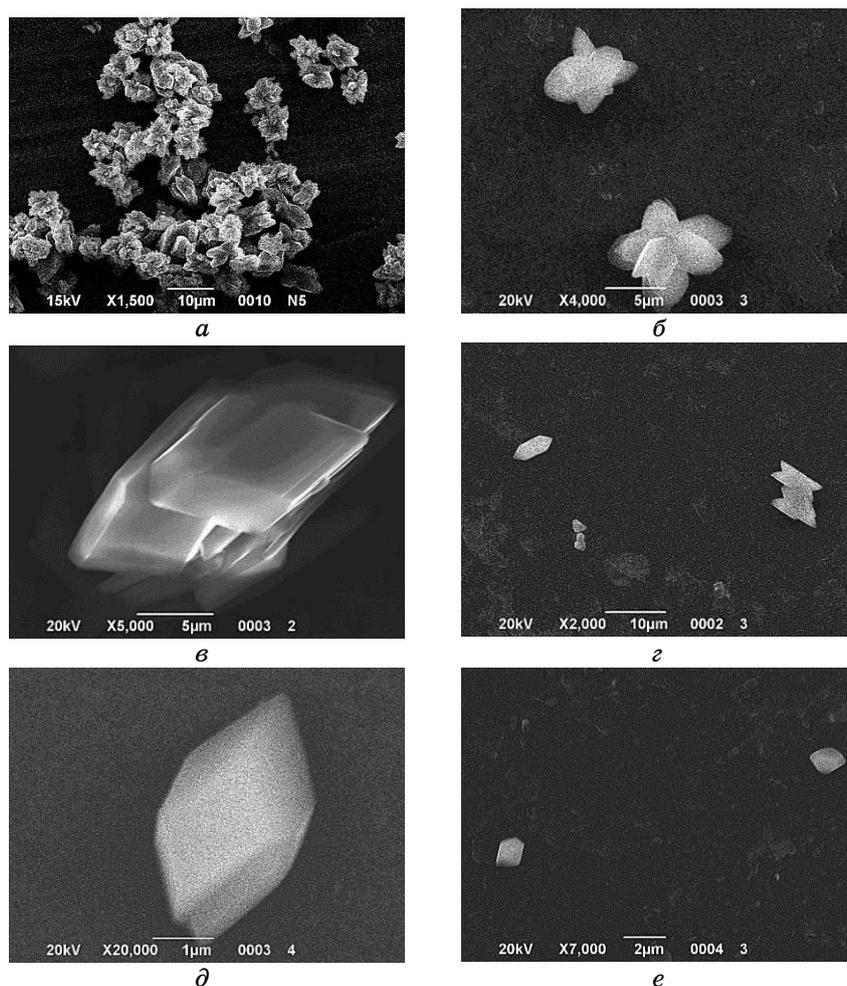


Рис. 6. Морфология кристаллов СОМ, выращенных без добавок (*а*) и в присутствии витамина В6 с концентрациями: 5 (*б*), 10 (*в*), 20 (*г*), 40 (*д*) и 50 (*е*) ммоль/л ($I = 0,15$, $pH = 5,8$, $s = 4,6$).⁶

одиночные кристаллы размером 4 мкм. При добавлении витамина В6 с концентрацией 50 ммоль/л наблюдается образование одиночных кристаллов ромбовидной формы с закруглёнными углами, размер которых около 2 мкм.

Соответственно, размеры кристаллов СОМ уменьшаются при увеличении концентрации витамина В6. Данный факт обусловлен образованием водородных связей между молекулами витамина и поверхностью граней кристаллов СОМ, в результате которых витамин В6 адсорбируется на поверхности СОМ, блокирует рост

граней и препятствует продвижению новых слоёв роста кристалла. Взаимодействие растущих граней кристаллов СОМ с витамином В6 подтверждают данные ИК-спектров.

В ИК-спектрах кристаллов СОМ в присутствии В6 (рис. 2, а) присутствуют полосы в диапазоне $3100\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ обусловленные ароматическим колебанием С–Н. Полосы на $2960\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ обусловлены ароматическим колебанием связи С–Н. Пиридоксин имеет полосу поглощения с высокой интенсивностью около 1545 см^{-1} благодаря С=C/C=N-плоским колебаниям пиридинового кольца [19]. В нашем случае эта полоса смещается и мы наблюдаем изменение ширины и интенсивности пика на 1625 см^{-1} , что подтверждает взаимодействие витамина В6 с поверхностью кристаллов СОМ. Полосы поглощения при 1464 см^{-1} и 1395 см^{-1} соответствуют фенольному колебанию О–Н и алифатическому колебанию С–СН.

Рассмотрим влияние витамина В12 на кристаллизацию СОМ. Концентрации $10\text{--}70\text{ мкмоль/л}$ не оказывает влияния на размеры и морфологию кристаллов СОМ по сравнению с кристаллами СОМ без добавок, на протяжении этого концентрационного диапазона формируются дендритные кристаллы, агрегаты и двойники кристаллов СОМ размером $9\text{--}10\text{ мкм}$ (рис. 7). При концентрации 100 мкмоль/л витамина В12 формируются двойники и одиночные кристаллы СОМ размером $\sim 9\text{ мкм}$. В ИК-спектрах кристаллов СОМ в присутствии В12 (рис. 3, а) присутствует полоса поглощения при $2960\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, которая обусловлена ароматическим колебанием С–Н. Для цианокобаламина характерна полоса поглощения на 1664 см^{-1} , которая связана с растяжением пропионамидной стороны кольца коррина, а также полосы при 1063 и 998 см^{-1} , обусловленные растяжением фосфатного фрагмента [20]. Однако, согласно нашим результатам, на ИК наблюдается изменение ширины и интенсивности пика на 1615 см^{-1} , но отсутствуют полосы на 1063 и 998 см^{-1} . Вероятно, с одной стороны, витамин В12 принимает участие в межмолекулярных взаимодействиях, посредством которых препятствует агрегации кристаллов СОМ. А с другой стороны, концентрация витамина В12 на поверхности кристаллов СОМ может быть очень маленькой, по сравнению с объёмной концентрацией витамина в растворе. Однако за счёт своей сложной химической структуры механизм взаимодействия витамина В12 с кристаллами СОМ ещё до конца не изучен, и требует дальнейших исследований.

4. ВЫВОДЫ

Рассмотрено влияние водорастворимых витаминов тиамин (В1), пиридоксин (В6) и цианокобаламина (В12), их концентрации в

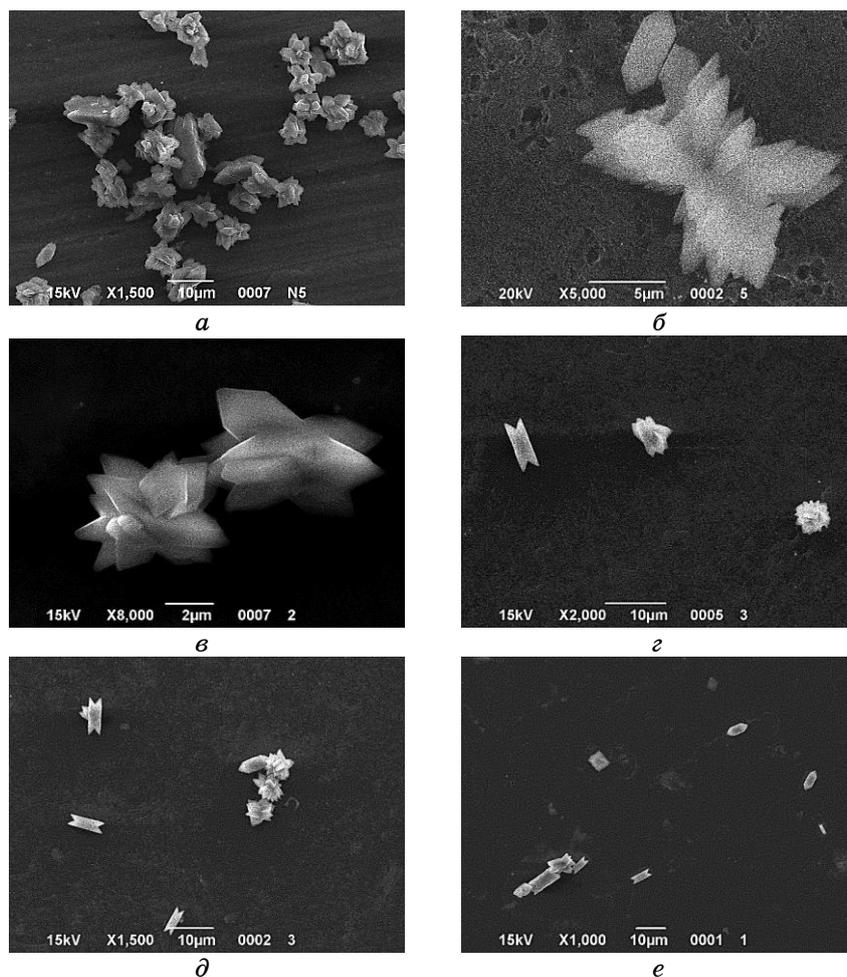


Рис. 7. Морфология кристаллов СОМ, выращенных без добавок (*a*) и в присутствии витамина В12 с концентрациями: 10 (*б*), 20 (*в*), 40 (*г*), 70 (*д*) и 100 (*е*) ммоль/л ($I = 0,15$, $pH = 5,8$, $s = 4,6$).⁷

модельной системе на основе оксалата кальция на особенности кристаллизации и морфологию кристаллов СОМ. Обнаружено влияние витаминов на морфологию и размер кристаллов СОМ. Установлено, что витамины (В1, В6, В12) оказывают ингибирующее действие на процессы кристаллизации СОМ, которое проявляется по-разному и обусловлено строением и свойствами витаминов.

В ряду витаминов В6, В1 и В12 значительный ингибирующий эффект на рост кристаллов СОМ проявляет витамин В6. Добавление 50 ммоль/л витамина В6 в модельную систему приводит к

формированию одиночных кристаллов СОМ размером 2 мкм, что в пять раз меньше размеров кристаллов, выращенных без добавок. Снижение размера кристаллов СОМ при добавлении витамина В6 обусловлено образованием множественных водородных связей и адсорбцией молекул В6 на поверхности растущих кристаллов СОМ. Витамины В1 и В12, в отличие от В6, не приводят к уменьшению размера кристаллов СОМ, а уменьшают агрегацию СОМ вследствие межмолекулярных взаимодействий, чем и способствуют образованию одиночных кристаллов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА—REFERENCES

1. T. Sugimoto, Y. Funae, H. Rubben, S. Nishio, R. Hautmann, and W. Lutzeyer, *Eur. Urol.*, **11**: 334 (1985).
2. J. He, R. Lin, H. Long, Y. Liang, and Y. Chen, *J. Colloid Interface Sci.*, **454**: 144 (2015).
3. Sh. Guo, M. D. Ward, and J. A. Wesson, *Langmuir*, **18**: 4284 (2002).
4. F. Grases, J. G. March, F. Bibiloni, and E. Amat, *J. Cryst. Growth*, **87**: 299 (1988).
5. L. Tunik, L. Addadi, N. Garti, and H. Furedi-Milhofer, *J. Cryst. Growth*, **167**: 748 (1996).
6. P. Bhadja, J. Lunagariya, and J.-M. Ouyang, *Journal of Functional Foods*, **27**: 685 (2016).
7. M. Bardaoui, R. Sakly, F. Neffati, M. F. Najjar, and A. E. Hani, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **62**: 573 (2010).
8. M. S. Kumar and R. Selvam, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **14**: 306 (2003).
9. J. P. Kavanagh, L. Jones, and P. N. Rao, *Urol. Res.*, **27**: 231 (1999).
10. I. Gutsow, S. Atanasova, and G. Budevsky, *Z. Chem.*, **30**: 299 (1990).
11. Y. Ogawa, T. Miyazato, and T. Hatano, *J. Surg.*, **24**: 1154 (2000).
12. Yu. V. Taranets, O. M. Bezkrovnyaya, I. M. Pritula, P. V. Mateychenko, and D. S. Sofronov, and V. K. Klochkov, *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, **14**, No. 3: 445 (2016); Ю. В. Таранец, О. Н. Безкровая, И. М. Притула, П. В. Матейченко, Д. С. Софронов, В. К. Клочков, *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*, **14**, вып. 3: 445 (2016) (in Russian).
13. E. V. Petrova, N. V. Gvozdev, and L. N. Rashkovich, *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, **6**: 261 (2004).
14. D. Quilliot, N. Michot, L. Brunaud, et A. Malgras, *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **31**: 176 (2017).
15. A. Shenkin, M. Baines, and G. S. Fell, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (Eds. C. A. Burtis, E. R. Ashwood, and D. E. Bruns) (St. Louis: Elsevier, Inc.: 2006), pp. 1100–1105.
16. V. B. Suryawanshi and R. T. Chaudhari, *J. Scholars Research Library*, **5**: 38 (2014).
17. A. Millan, *J. Mat. Sci.: Materials in Medicine*, **8**: 247 (1997).
18. A. O. Adeyemo, G. A. Kolawole, and E. F. Archibong, *Inorganica Chimica Acta*, **165**: 255 (1989).

19. D. A. Köse, B. Zumreoglu-Karan, O. Sahin, and Orhan Büyükgüngör, *Inorganica Chimica Acta*, **413**: 77 (2014).
20. L. Jin, P. Lu, H. You, Q. Chen, and J. Dong, *Int. J. Pharm.*, **371**: 82 (2009).

*Institute for Single Crystals,
STC 'Institute for Single Crystals', N.A.S. of Ukraine,
Nauky Ave., 60,
61001 Kharkiv, Ukraine*

¹ Fig. 1. IR-spectra of COM crystals grown without additives (*I*) and in the presence of 10 mM B1 (*2*) (*a*); diffractogram of COM crystals grown in the presence of 10 mM B1 (*б*).

² Fig. 2. IR-spectra of COM crystals grown without additives (*I*) and in the presence of 10 mM B6 (*2*) (*a*); diffractogram of COM crystals grown in the presence of 10 mM B6 (*б*).

³ Fig. 3. IR-spectra of COM crystals grown without additives (*I*) and in the presence of 20 mM B12 (*2*) (*a*); diffractogram of COM crystals grown in the presence of 20 mM B12 (*б*).

⁴ Fig. 4. The vitamins' structures.

⁵ Fig. 5. The morphology of COM crystals grown without additives (*a*) and in the presence of vitamin B1 with concentrations of 5 (*б*), 10 (*в*), 20 (*г*), 40 (*д*) and 50 (*е*) mM (*I* = 0.15, pH = 5.8, *s* = 4.6).

⁶ Fig. 6. The morphology of COM crystals grown without additives (*a*) and in the presence of vitamin B6 with concentrations of 5 (*б*), 10 (*в*), 20 (*г*), 40 (*д*) and 50 (*е*) mM (*I* = 0.15, pH = 5.8, *s* = 4.6).

⁷ Fig. 7. The morphology of COM crystals grown without additives (*a*) and in the presence of vitamin B12 with concentrations of 10 (*б*), 20 (*в*), 40 (*г*), 70 (*д*) and 100 (*е*) mM (*I* = 0.15, pH = 5.8, *s* = 4.6).