

СОСТАВ И МИКРОСТРУКТУРА КОРАЛЛОВИДНЫХ МОЧЕВЫХ КАМНЕЙ. ТЕОРИИ РОСТА

М.О. Антонова, аспирант, Г.М. Кузьмичева, профессор,

*В.И. Руденко, доцент, **А.А. Натыкан, научный сотрудник,

***Н.В. Садовская, ведущий научный сотрудник

кафедра Физики и химии твердого тела МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 117571 Россия

*кафедра Урологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

**Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

***ФГУП «НИФХИ им. Л.Я. Карпова», Москва, 105064 Россия

e-mail: mary-andre@inbox.ru

Впервые комплексом методов (рентгенография, рентгеноспектральный микроанализ, сканирующая электронная микроскопия, ИК-спектроскопия, спектрофотометрия, газовая хроматография с пламенно-ионизационной детекцией) выполнено исследование мочевого камня (состав, микроструктура), включая коралловидные камни, большого (>2 см) размера по их объему, а также исследование состава мочи, в котором произошло их образование и рост. Анализ полученных результатов совместно с литературными данными позволил уточнить и расширить теории образования мочевого камня и предложить объяснение процесса их роста.

Ключевые слова: мочекаменная болезнь, коралловидные камни, теории роста, рентгенофазовый анализ, сканирующая электронная микроскопия, рентгеноспектральный микроанализ.

Физические, химические и физико-химические методы исследования могут быть с успехом применены в медицине, в частности, для изучения мочевого камня и среды их образования [1]. Применение этих методов, усовершенствованных и адаптированных к данному виду объектов, оправданно, целесообразно и необходимо вследствие актуальности проблемы камнеобразования: мочекаменная болезнь (МКБ) встречается у 3% населения, затрагивая не только трудоспособную часть, но и новорожденных, и опасна своими осложнениями и рецидивами.

Среди более 500 изученных (2000–2012 гг.) образцов мочевого камня пациентов Научно-исследовательского института урологии и репродуктивного здоровья человека, кафедры урологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова на долю камней большого размера (~20 мм и более) приходится ~10%. Среди них ~15% оксалаты, ~30% – фосфаты, ~30% – ураты, а остальные 25% – камни смешанного состава с преобладанием смесей (оксалаты + ураты, оксалаты + фосфаты). Если же провести подобную статистику среди камней всех размеров (от ~1 мм и более), то оксалаты, фосфаты и ураты составляют ~67%, ~11% и ~4%, соответственно, а остальные ~18% – смешанные камни (оксалаты+ураты и оксалаты+фосфаты). Около 50% больших камней составляют коралловидные мочевые камни, занимающие практически всю полостную систему почки (слепок). Они представлены фосфатами и смешанными фосфатно-оксалатными камнями без конкретного указания состава; данные по микроструктуре и особенностям роста отсутствуют. Данные камни встречаются в ~3–5% случаев; вероятность их рецидива достигает ~10%, а в течение 5 лет при отсутствии адекватного лечения – уже ~50%.

Несмотря на то, что росту мочевого камня посвящено довольно много публикаций (см. например, [1–28]), к настоящему времени отсутствует единая теория их образования и роста, а представления о механизмах их формирования до сих пор находятся на уровне гипотез. Отнесение или подтверждение той или иной теории делается на основании изучения только состава мочевого камня с применением качественного рентгенофазового анализа [1–9] и количественной ИК-спектроскопии [11], исследования их морфологии (в основном, поверхности камней) – с использованием петрографических шлифов (увеличение в 60 раз) [1–3] и сканирующей электронной микроскопии (увеличение в 8000 раз) [9]. При этом в подавляющем большинстве случаев состав мочи, в которой произошли образование и рост мочевого камня (в том числе, и коралловидных) исследователи или вообще не изучали, или не приводили в литературных источниках соответствующие данные.

Изучение состава и строения камней большого размера, включая коралловидные камни, от центра до периферии совместно с исследованием состава мочи с использованием новых знаний, а также новых, ранее не применявшихся (газовая хроматография с пламенно-ионизационной детекцией), усовершенствованных (спектрофотометрический метод Лоури) или оптимизированных (количественный рентгенофазовый анализ, сканирующая электронная микроскопия) методов исследования и их анализ позволит уточнить, подтвердить или расширить теории роста мочевого камня. Отсюда появляется возможность влиять на процесс камнеобразования. Это и явилось мотивацией настоящей работы.

Методическая часть

Из всех изученных мочевых камней нами отобраны 44 камня размером более 20 мм, которые наиболее представительны для каждого рассматриваемого случая. Камни разрезаны на две части по осевой линии, и для исследования выбрана периферийная и центральная части.

Изучение фазового состава мочевых камней проводили качественным и количественным рентгенографическим методом (РФА) [29], позволяющим надежно определять состав двух-, трех-, а, в ряде случаев, и четырехкомпонентных образцов (чувствительность анализа не менее 2%). При этом впервые разделены апатиты на карбонат-, гидроксил- и карбонат-гидроксилапатит и струвиты – на струвит и гексагидрат смешанного фосфата калия и магния рентгенографическим методом с выбором группы отражений (не всегда максимальных и не подверженных текстуре), однозначно характеризующих отдельную фазу. Содержание белка в составе камней (предел повторяемости 5%) определяли с помощью усовершенствованного спектрофотометрического метода Лоури [29].

Исследование микроструктуры и определение элементного состава камней осуществляли комплексом методов: сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) совместно с рентгено-спектральным микроанализом (РСМА). Изучение микроструктуры проводили на электронном микроскопе высокого разрешения с автоэмиссионным катодом 7500F фирмы JEOL (Япония). Образцы наносили на проводящий углеродный скотч и загружали в высоковакуумную камеру (2.6×10^{-8} Па) электронного микроскопа. Изображения микроструктуры мочевых камней получали в режиме низкоэнергетических вторичных электронов (20 кВ), обеспечивающем наиболее высокое разрешение. С целью исключения эффектов зарядки поверхности образцов, а также их разрушения под воздействием электронного пучка, применяли следующие методические подходы:

- исследования проводили при низком токе электронного пучка (3×10^{-11} А), что обеспечивалось наличием автоэмиссионного катода с холодной полевой эмиссией;
- применяли специальный режим Gentle Beam, при котором электроны зонда замедлялись непосредственно у поверхности образца, в результате, с одной стороны, энергия первичных электронов уменьшалась до ультранизких значений (2 кВ), что приводило к снижению зарядовых эффектов и исключению разрушения образца, с другой стороны, диаметр электронного зонда оставался небольшим, что способствовало сохранению высокого разрешения;
- на поверхность скола наносили методом магнетронного напыления металлическую пленку платины (толщина около 5 нм, режимы процесса: электрический ток – 30 мкА, время напы-

ления – 40 с, расстояние от мишени до образца – 40 см, давление – 5 Па).

Количественный и качественный рентгено-спектральный микроанализ (РСМА) выполняли на энергодисперсионном рентгеновском микроанализаторе INCA Penta FETx 3 фирмы OXFORD (Великобритания), установленном в той же высоковакуумной камере микроскопа. Калибровку прибора (6 итераций) осуществляли по двум линиям K-серии стандартного образца кобальта. Количественный анализ элементов с атомным номером $N \geq 3$ проводили с использованием программы INCA Penta FET. Предел повторяемости результатов – 0.05%.

Для изучения состава мочи мы воспользовались результатами клинического анализа мочи (общий анализ; суточная экскреция – СЭ: ионы Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , Cl^- , $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ – мочева кислота, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ – мочевины, креатинин и др; бактериологическое исследование: *Pseudomonas aeruginosa*, *St. pyogenes*, *Entococcus faecalis*, *E. coli*, *Acinetobacter sp.* и т.д.) и химического анализа (безреагентная ионная хроматография – БИХ: ионы Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , цитрат-ион $[(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{OH})(\text{COO})_3]^{3-}$, изоцитрат-ион $[(\text{CH})_2(\text{OH})\text{CH}_2(\text{COO})]^{3-}$, урат-ион $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3^-$ и урат-ионы, связанные с калием или натрием; титриметрия – ионы $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) [30]. Применение химических методов анализа связано с необходимостью определения содержания в моче важных для процесса камнеобразования ионов, прежде всего, цитратов, оксалатов и сульфатов, которые в клинических лабораториях в подавляющем большинстве случаев не определяются. Необходимо подчеркнуть, что используемый в данной работе комплекс методов применяется впервые для изучения мочевых камней большого размера и является необходимым и достаточным для решения поставленной цели.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты проанализированы и систематизированы нами в рамках имеющихся теорий роста. Приведены отдельные примеры для каждой из них.

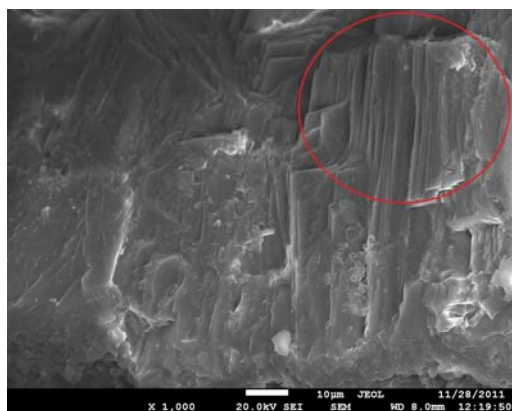
В настоящее время известны четыре основные теории, которые объясняют образование отдельных видов мочевых камней: органическая, коллоидная, инфекционная и нано-бактериальная.

I. Органическая (матричная) теория роста. Основная идея данной теории заключается в том, что центром кристаллизации является вещество белковой природы (матрикс), на котором послойно начинают осаждаться малорастворимые вещества, образуя зоны роста для дальнейшего развития камня [1], причем осаждение органических компонентов на поверхности камня замедляет процесс кристаллизации [2]. В почках постоянно присутствует

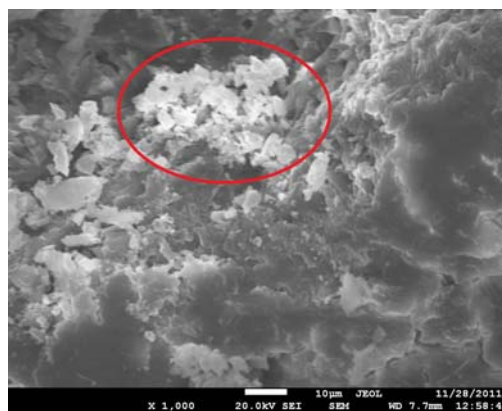
протеин Тамма-Хорсвалла (ТХП) – ингибитор камнеобразования [4], который в некоторых патологических условиях может преобразовываться с последующим стимулированием камнеобразования [4–8] и выступать в качестве органического слоя в камне. Так образуется слоистая структура мочевого камня: на органическом зародыше формируется слой минеральной природы, затем на нем откладывается органический слой, а потом все опять повторяется. При повышении концентрации камнеобразующих ионов в моче скорость осаждения органических компонентов уменьшается, что приводит к ускорению роста камня. По име-

ющимся литературным данным, этот механизм роста характерен для оксалатов [3] и уратов [2, 9]. Так, авторами [2, 3, 9] при исследовании петрографических шлифов обнаружена слоистая структура с чередованием органических (темные полосы на фотографиях) и минеральных (светлые полосы на фотографиях) слоев, а общий состав мочевых камней определялся качественным рентгенофазовым анализом.

На рис. 1 дан фрагмент изученного нами смешанного по составу мочевого камня I.1: периферия представлена смесью вееллита (97%) и мочевой кислоты (3%), а центр – только мочевой кислотой.



а



б

Рис. 1. Фотография микроструктуры мочевого камня смешанного состава I.1:
а – периферии; б – центральной части камня.

На фотографии микроструктуры периферии камня можно увидеть слои из плотных кристаллических образований (рис. 1а), а в центральной части преобладают кристаллиты размером ~5 мкм (рис. 1б). Данные РФА подтверждаются элементным анализом: на периферии обнаружено большее количество кальция (12.5% мас.), чем в центре (0.27% мас.). Результаты РСМА (количество N: 1.5% мас. на периферии, 41% мас. – в центре) согласуются с данными спектрофотометрии: содержание белка в центральной части этого камня в 4 раза больше, чем на периферии (здесь и далее количество белка мы будем соотносить с содержанием азота, так как кислород входит во все виды камней, а углерод может выступать в качестве примеси в процессе проведения РСМА).

При анализе состава мочи больного мочекаменной болезнью (МКБ) с удаленным камнем I.1 комплексом методов найдено, что до лечения (т.е. до удаления камня) содержание кальция, по данным суточной экскреции, составило 14 ммоль/сут (нормальный показатель – 2.5–7.5 ммоль/сут), т.е. больше нормы, а содержание уратов по данным БИХ – 808 мг/сут (нормальный показатель – 850–2250 мг/сут) – меньше нормы.

В работе [24] представлены результаты изучения уратного мочевого камня: по данным РФА (периферия: мочевая кислота; центр:

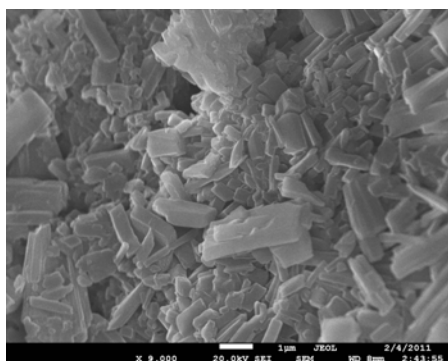
мочевая кислота – 93% + дигидрат мочевой кислоты – 7%). На приведенной в работе фотографии микроструктуры также видны слои, отличающиеся по цвету и по элементному составу: в темных слоях содержание азота намного больше (31.83% мас.) по сравнению с белыми слоями (17.85% мас.), где тоже присутствует кальций (4.59% мас.). На рис. 2 представлен уратный мочевой камень I.2, на периферии которого (мочевая кислота – 45% + дигидрат мочевой кислоты – 55%) видны кристаллиты размером ~1–10 мкм (рис. 2а), а в центральной части (мочевая кислота – 50% + урат аммония – 50%) впервые обнаружены полосчатые, вытянутые в одном направлении кристаллические образования длиной более 10 мкм (рис. 2б).

На основании полученных нами данных с учетом литературных можно говорить об органическом механизме образования и этого камня. В составе мочи пациента с использованием метода БИХ обнаружено, что концентрация урат-ионов составляет 652 мг/сут (нормальный показатель – 850–2250 мг/сут), т.е. меньше нормы.

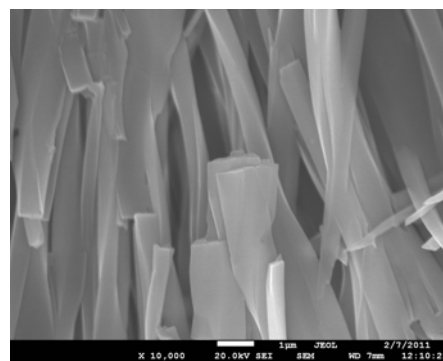
Таким образом, рост камней по органической теории характерен для уратных (по нашим и литературным данным), смешанных оксалатно-уратных (по нашим данным) и оксалатных (по литературным данным) камней. При образовании камней по представленному

механизму на срезе можно увидеть слои различного цвета, содержащие либо белковую, либо кристаллическую составляющие. Нами обнаружено, что в составе мочи содержание

камнеобразующих ионов (оксалат-ионов и мочевой кислоты для оксалатных и уратных мочевых камней, соответственно), меньше нормы.



а



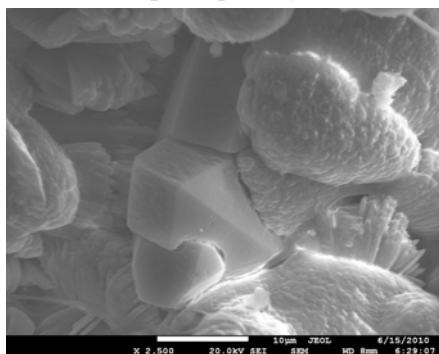
б

Рис. 2. Фотография микроструктуры уратного мочевого камня I.2: а – периферии; б – центральной части камня.

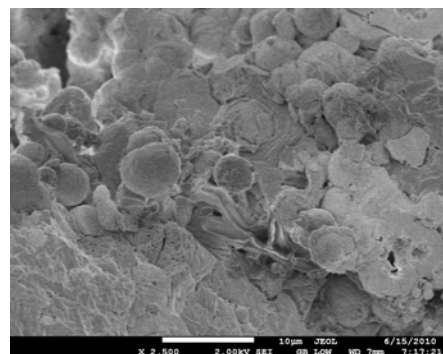
II. Коллоидная теория роста. Моча – пересыщенный коллоидный раствор, состоящий из воды, минеральных солей и макромолекул органических веществ (в частности, белков) [1, 10, 21]. При нарушении во взаимодействии между минеральными и органическими веществами в моче может наступить кристаллизация камнеобразующих компонентов [4]. При этом коллоиды, состоящие из минерального компонента, окруженного органической матрицей, за счет потери электрических зарядов из лиофильных превращаются в лиофобные, обладающие свойствами коагуляции, конгломерации и седиментации, т.е. способностью к образованию частиц большого размера, служащие центрами

кристаллизации [4, 9, 10]. Этот механизм роста характерен для фосфатов [2, 9, 11]. Однако коллоидный механизм камнеобразования на сегодняшний день изучен недостаточно, так как проникновение в мочу органических веществ, способных нарушить коллоидное равновесие, практически невозможно из-за их крупного размера. Кроме того, непонятно, почему коллоиды, находящиеся в моче в пересыщенном состоянии, не выпадают в осадок.

На рис. 3 представлен коралловидный фосфатный мочевой камень II.1: периферия – струвит (65%)+карбонатгидроксилапатит (35%), центр – струвит.



а



б

Рис. 3. Фотография микроструктуры фосфатного мочевого камня II.1: а – периферии; б – центральной части камня.

Морфология струвита представлена призматическими многогранными кристаллами размером ~10 мкм (рис. 3а), а смесь фосфатов (струвит + карбонатгидроксилапатит) – в виде сросшихся между собой округлых форм размером от 1 мкм (рис. 3б). Содержание фосфат-ионов в составе мочи этого пациента, определенное методом БИХ ($\text{с(PO}_4^{3-})$ = 4000 мг/сут), соответствует нормальным показателям: ($\text{с(PO}_4^{3-})$ = 1000–6500 мг/сут).

В связи с тем, что для коллоидной теории характерно образование сферических кристаллитов различного размера, сросшихся друг с

другом, что мы наблюдали для камня II.1, он образован по коллоидной теории, что согласуется с известными литературными данными [9, 10]. На примере данного камня и аналогичных из изученных 44 камней мы впервые показали, что в составе мочи пациента содержание фосфат-ионов находится в пределах нормы.

III. Инфекционная теория роста. Некоторые фосфатные мочевые камни (струвиты, апатиты) формируются в результате деятельности бактерий [11–15]. К ним относятся хорошо изученные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis* (их классифицируют как

urease-positive-up), выделенные у пациентов с хроническим калькулезным пиелонефритом [12–14]. Указанные бактерии расщепляют

мочевину $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, которая входит в состав мочи, что приводит к повышению величины pH (реакция 1 и 2):



Авторам [15] удалось обнаружить в моче пациентов с оксалатами и фосфатами (карбонататапатит, гидроксилатапатит, брушит) существование бактерий (при пересеве на среду, не характерную для уреазопродуцирующих бактерий), не расщепляющих мочевину (они были названы *urease-negative-up*), которые не определяются при обычном посеве мочи на бактерии. В составе мочи присутствуют также и другие бактерии (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, стафилококки и кишечная палочка), которые, по данным [12–14], не влияют на камнеобразование.

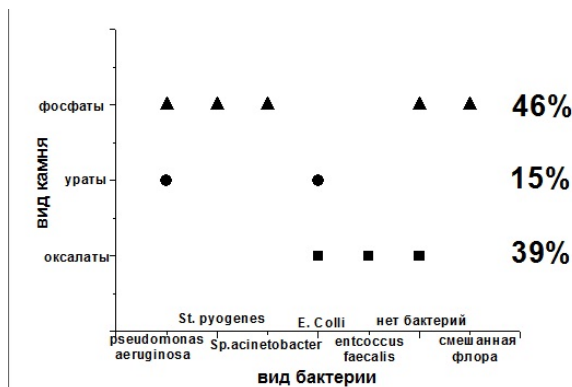


Рис. 4. Виды бактерий в моче пациентов с различными типами камней [11].

В рамках инфекционной теории для определения вида бактерий проведено бактериологическое исследование мочи [11–15]; для исследования состава камней применяли качественный РФА [12–15] и количественную ИК-спектроскопию [11]. В моче пациентов с коралловидными камнями обнаружены микроорганизмы *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

Acinetobacter sp., некоторые разновидности кокков (*Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*). На основании анализа изученных камней подтверждено [11], что для пациентов с фосфатными камнями характерны *Pseudomonas aeruginosa*, *St. pyogenes* и *Acinetobacter sp.* В моче пациентов с уратными и оксалатными камнями также найдены, соответственно, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecalis*, которые не вызывают образование таких камней [11] (рис. 4).

На фотографии микроструктуры периферии коралловидного камня III.1 (струвит – 65% + карбонатгидроксилатапатит – 35%) видны сросшиеся друг с другом округлые формы размером ~0.5–1.5 мкм (рис. 5а), характерные для роста камней по коллоидной теории, а в моче данного пациента обнаружены бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, что является отличительным признаком инфекционной теории, согласно данным [11]. При ультранизких значениях энергии первичных электронов на поверхности сфер обнаружены образования овальной формы размером 50 нм (рис. 5б). В центральной части этого камня (карбонатгидроксилатапатит – 60% + струвит – 40%) наблюдаются образования ромбовидной формы размером 0.5 мкм, содержащие в большом количестве Mg (10.73% мас.), относящиеся к струвиту (область А на рис. 5в). На их поверхности присутствуют образования округлой формы размером 1 мкм с большим содержанием Ca (10.10% мас.), принадлежащие карбонатгидроксилатапатиту (область В на рис. 5в). Концентрация фосфат-ионов в моче этого пациента, по данным БИХ ($\text{c}(\text{PO}_4^{3-}) = 2500$ мг/сут), находится в норме при повышенном значении pH мочи (pH 8).

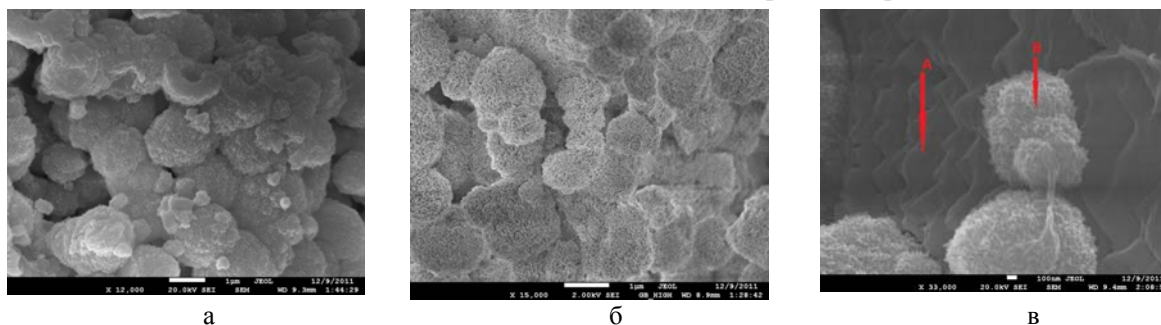
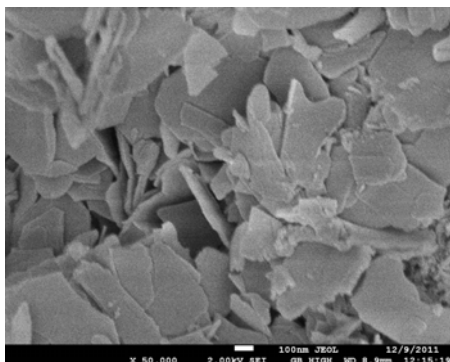


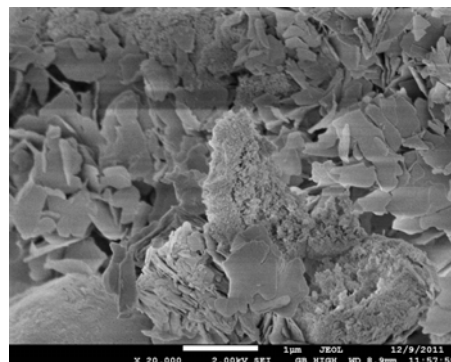
Рис. 5. Фотография микроструктуры фосфатного мочевого камня III.1: а – периферии; б – периферии при ультранизких значениях энергии первичных электронов; в – центральной части камня.

Бактерии *St. pyogenes* обнаружены в моче пациента с коралловидным фосфатным камнем III.2: периферия – гидроксилapatит (70%) + струвит (30%), центр – гидроксилapatит (50%) + струвит (50%). На периферии данного камня

видны плоские бесформенные сросшиеся образования размером ~1 мкм (рис. 6а), а в центральной части – плоские образования размером 1.5 мкм вместе с кристаллитами игольчатой формы размером 100 нм (рис. 6б).



а



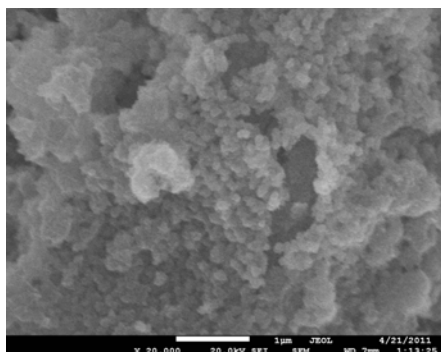
б

Рис. 6. Фотография микроструктуры фосфатного мочевого камня III.2:
а – микроструктура периферии; б – центральной части камня.

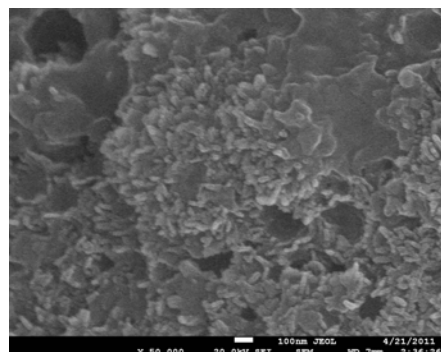
Содержание фосфат-ионов в моче этого пациента ($\text{с(PO}_4^{3-}) = 3999 \text{ мг/сут)}$ – в норме.

Бактерии *Acinetobacter sp.* обнаружены в моче пациента с коралловидным фосфатным камнем III.3: периферия – карбонатгидроксилapatит (55%) + струвит (45%); центр – карбонатгидроксилapatит (50%) + струвит (40%) +

брушит (10%). Морфология наружной части (рис. 7а) камня представлена сферическими образованиями (размер 0.3–1 мкм), а на кристаллитах центральной части (рис. 7б) обнаружены частицы удлиненной палочковидной формы (размер 20–50 нм).



а



б

Рис. 7. Фотография микроструктуры фосфатного мочевого камня III.3:
а – периферии; б – центральной части камня.

Содержание фосфат-ионов, по данным БИХ [30] в моче пациента ($\text{с(PO}_4^{3-}) = 2837 \text{ мг/сут)}$, находится в норме. В составе мочи пациентов с оксалатными мочевыми камнями бактериями нами не обнаружено.

Итак, нами впервые установлено, что при образовании камней по инфекционной теории содержание фосфат-ионов в моче пациента находится на уровне нормальных показателей. Кроме того, в ней присутствуют уреазопродуцирующие бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *St. pyogenes*, *Acinetobacter sp.*, а в состав камня входит струвит и гидроксилapatит, что согласуется с литературными данными [11]. На поверхности отдельных камней нами впервые обнаружены частицы палочковидной формы размером ~50–100 нм (рис. 5б, 7б) и сферические образования размером ~100 нм (рис. 6б), которые

ранее никем не были зафиксированы на поверхности мочевого камня.

IV. Нанобактериальная теория роста.

Данная теория своим названием обязана нанобактериям, понятие о которых привело к одному из самых больших споров в современной микробиологии [18, 19], а природа этих образований до сих пор не определена окончательно.

Впервые частицы палочковидной формы, напоминающей по форме бактерии, размером ~100 нм, были обнаружены в горячих источниках Viterbo (Италия) в 1989 г. и названы ультрамикробактериями [20]. В 1998 г. частицы овальной и сферической формы с теми же размерами, найденные в крови и мочевых камнях, получили название *нанобактерии* [21] («нанобактерии – частицы, которые в 100 раз

меньше бактерии и в 10 раз меньше вируса, т. е. достигающие нескольких десятков нанометров в диаметре» [19]). Появившаяся в 1998 г. теория камнеобразования [21], в которой предполагалось, что нанобактерии являются «затравкой» для начала кристаллизации, была названа нанобактериальной. Этими же авторами было показано, что формирование нанобактерий связано с процессами отвердевания, так как в составе образований с нанобактериями присутствует белок фетуин – мощный ингибитор скелетного отвердевания и образования апатита. Авторы [19] предположили, что нанобактерии не являются живыми организмами, а подобные «биоморфные» неорганические образования связаны с кристаллизацией гидроксилapatита, при этом молекулы фосфата являются центром кристаллизации, с чем связаны наблюдаемый «рост» и «размножение» кристаллов гидроксилapatита. По данным [16], именно нанобактерии являются первопричиной образования кристаллических частиц на стенках почек – бляшек Рэндала, на которых затем образуются камни. На поверхности нанобактерий происходит кристаллизация оксалат-ионов, но влияние нанобактерий на начало процесса кристаллизации не доказано. В 2006 г. на Международной конференции по нанобактериям было принято называть эти частицы как наноразмерные кальцификаты. Тем не менее, в литературе наноразмерные кальцификаты продолжают называть нанобактериями, и авторами [18] сформулировано определение нанобактерий как «круглых либо овальных органо-минеральных структур размером от 30 до 200 нм».

Необходимо отметить, что до сих пор не существует прямых доказательств принадлежности нанобактерий к живым организмам: одни авторы пытаются доказать наличие ДНК у нанобактерий [17], другие – обнаружить живой организм внутри апатитного панциря [25]. Так, в работе [17] на основании исследования влияния нанобактерий мочевых камней на полимеразную цепную реакцию (ПЦР) установлено, что они являются живыми организмами (обнаружена 16s-РНК-последовательность) и, следовательно, активируют камнеобразование в организме человека. В то же время в работе [18] показано, что 16s-РНК-последовательность бактерий *Phyllobacterium mysinacearum*, которые часто являются загрязнителями проб в ПЦР, неотличима от 16s-РНК-последовательности нанобактерий. Авторы [23] описывают влияние нанобактерий и на образование желчных камней, не исключают влияние нанобактерий на биоминерализацию и относят эти образования к живым организмам. Согласно [24], нанобактерии относятся к микробиологическому фактору в камнеобразовании, но в работе не утверждается принадлежность этих образований к

живым организмам. Нанобактерии, по мнению [25], представляют собой овальные или сферические апатитные образования с микроорганизмами внутри, наличие которых не доказано, а, согласно [26], нанобактерии относятся к наночастицам, а не к микроорганизмам, влияющим на минералообразование. Рост «биоморфных» неорганических частиц детально изучен в работе [22], где показано образование внешне похожих на бактерии частиц путем кристаллизации в присутствии растворов хлорида бария и силикатов. Поразительная схожесть этих образований с предполагаемыми нанобактериями говорит о том, что исследователи не должны полагаться лишь на морфологию частиц как на доказательство наличия жизни у исследуемых объектов [22]. Необходимо отметить, что в рассмотренных работах [16–26] состав мочи не был изучен.

Подводя итоги вышесказанному, можно отметить общее во всех литературных источниках: нанобактерии – частицы овальной формы размером от 50 до 200 нм, в состав которых входит фосфат кальция, т.е. нанобактериальный механизм роста характерен для фосфатов. При взаимодействии с компонентами мочи (например, с ионами Ca^{2+} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , OH^-) образуются гранулы апатита диаметром до нескольких десятков нанометров, а далее на их поверхности происходит осаждение камнеобразующих компонентов, которыми могут выступать те же фосфат-ионы и ионы кальция.

Вышеперечисленным признакам удовлетворяют частицы, обнаруженные нами при исследовании микроструктуры периферии камней III.1 и III.3. Как видно из рис. 3б и 5б, частицы размером ~50 нм овальной формы, состоящие из фосфата кальция, похожи на частицы, обнаруженные в [18, 19] на кальцификатах артерий (частицы, похожие на нанобактерии). Основываясь на этих признаках, образование камней III.1 и III.3 можно отнести не к инфекционной, а к нанобактериальной теории роста мочевых камней.

Таким образом, обобщая итоги проведенных исследований мочевых камней большого размера, в том числе коралловидных, с помощью сканирующей электронной микроскопии, рентгенофазового анализа и рентгено-спектрального микроанализа, а также результаты, имеющиеся в литературе по изучению состава и строения мочевых камней, и данные проведенных нами впервые методом безреагентной ионной хроматографии анализов мочи, можно сделать следующие выводы:

- органический механизм образования характерен для уратных, оксалатных и смешанных оксалатно-уратных камней, а для фосфатных камней (прежде всего, коралловидных) – коллоидный, инфекционный и нанобактериальный механизмы;

- в соответствии с коллоидной теорией бактериальная флора в моче отсутствует;
- бактерии в моче являются инициаторами роста струвитных, струвитно-апатитных и коралловидных струвитно-апатитных камней по инфекционной теории;
- основные отличительные черты нанобактериальной теории роста мочевых камней – их форма (удлиненная, овальная, палочковидная), размер (~20–100 нм) и состав (элементы Ca, P, O) образованных частиц на поверхности мочевого камня;
- для инфекционной и нанобактериальной теорий наблюдается присутствие в моче бактериальной флоры, представленной *Pseudomonas aeruginosa*, *St. pyogenes*, *Acinetobacter sp.*

Основываясь на описанных в литературе процессах роста мочевых камней [9–11] с добавленными и уточненными данными наших исследований и с учетом полученных нами результатов изучения состава мочи, можно предположить, что в случае *органической теории*:

1. В моче появляются белковые частицы – зародыши будущего мочевого камня, что приводит к нарушению равновесия между ионами в моче [9, 10].
2. На зародыше начинается рост мочевого камня с камнеобразующим ионом (ионами) A_i в составе, концентрация которого в моче повышена, что сопровождается уменьшением концентрации этого иона в моче по мере роста камня с дальнейшим замедлением или прекращением роста камня данного состава. Это подтверждается при изучении состава мочи пациентов с камнями I.1 (вевеллит + мочева кислота) и I.2 (мочева кислота).
3. Если кристалл растет достаточно быстро, то в моче диффузия ионов не успевает вы-

ровнять содержание остальных кристаллообразующих компонентов (аналогично механизму роста кристаллов, описанному в работе [27]). Данное обстоятельство может способствовать повышению содержания других ионов в моче – B_i , которые начинают осаждаться на поверхности уже образованного камня с ионами A_i в составе. При этом уменьшение концентрации иона B_i в моче по мере роста камня сопровождается дальнейшим замедлением или прекращением роста камня другого состава и т.д.

При образовании мочевых камней по *коллоидной, инфекционной и нанобактериальной теориям* стадии образования камня иные (по нашим данным):

1. В моче появляются коллоидные частицы или бактерии (смещение равновесия в моче), способствующие образованию зародыша мочевого камня.
2. На зародыше начинается рост мочевого камня с камнеобразующим ионом (ионами) C_i в составе, концентрация которого (которых) в моче находится в пределах нормы.
3. В процессе роста камня в моче постоянно присутствует инициатор роста (бактериальная флора, инфекционный агент), не связанный с катионами и анионами.

Таким образом, нами впервые установлено, что рост мочевых камней может происходить как при значительных отклонениях содержания камнеобразующих компонентов от нормы (оксалаты и ураты) – рост мочевых камней по *органической теории*, так и при колебаниях их концентрации в пределах нормы (фосфаты) – рост мочевых и коралловидных камней по *коллоидной, инфекционной и нанобактериальной теориям*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Голованова О.А., Франк-Каменецкая О.В., Пунин Ю.О. Особенности патогенного минералообразования в организме человека // Рос. хим. журн. 2010. Т. IV. № 2. С. 124–136.
2. Голованова О.А. Комплексное изучение почечных камней // Изв. ВУЗов. Химия и химическая технология. 2004. Т. 47. № 1. С. 3–12.
3. Al-Atar U., Bokov A.A., Gates B.D., Ye Z.-G., Branda N.R., Marshall D., Teichman J.M.H. Mechanism of calcium oxalate monohydrate kidney stones formation: Layered spherulitic growth // Chemistry of Materials. 2010. № 22. P. 1318–1329.
4. Зверев Я.Ф., Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Лампатов В.В. Модуляторы оксалатного нефролитиаза. Ингибиторы кристаллизации // Нефрология. 2010. Т. 14. № 1. С. 29–49.
5. Tiselius H. A hypothesis of calcium stone formation: An interpretation of stone research during the past decades // Urol. Res. 2011. № 39. P. 231–243.
6. Benzerara K., Miller V.M., Barell G. Search for microbial signatures within human and microbial calcifications using soft X-ray spectromicroscopy // J. Invest. Med. 2006. № 54. P. 367–379.
7. Kumar V., Farell G., Yu S., Harrington S., Fitzpatrick L., Rzewuska E., Miller V.M., Lieske J.C. Cell biology of pathologic renal calcification: Contribution of crystal transcytosis, cellmediated calcification, and nanoparticles // J. Invest. Med. 2006. № 54. P. 412–424.
8. Miftiopl N., Vejdani K., Lee O. Association between Randall's plaque and calcifying nanoparticles // Int. J. Nanomed. 2008. V. 3. № 1. P. 105–115.
9. Пятанова П.А. Физико-химические исследования почечных камней, формальный генезис : дис. ... канд. хим. наук. – М., 2004. 157 с.
10. Тиктинский О.Л., Александров В.П. Мочекаменная болезнь. – СПб.: Питер, 2000. 384 с.
11. Голованов С.А. Клинико-биохимические и физико-химические критерии течения и прогноза мочекаменной болезни : дис. ... д-ра мед. наук. – М.: НИИ урологии, 2002. 253 с.

12. Satoh M., Munakata K.-I., Takeuchi H., Yoshida O. Evaluation of the usefulness of a novel injectable cephalosporin, E1040, and ceftazidime for management of complicated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* by using the rat urolithiasis model // *Antimicrob. Agents & Chemotherapy*. 1992. V. 36. № 7. P. 1580–1583.
13. Beynon L.M., Dumanski A.J., McLean D.-J.C., MacLean L.L., Richards J.C., Perry M.B. Capsule structure of *Proteus mirabilis* (ATCC 49565) // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. № 7. P. 2172–2177.
14. Takeuchi H., Okada Y., Kobashi K., Yoshida O. Treatment of infected urinary stones in rats by a new hydroxamic acid, N-(pivaroyl)glycinohydroxamic acid // *Urol. Res.* 1982. № 10. P. 217–219.
15. Sabinski F., Leusmann D.B. Potential contribution of optional urease positive bacteria to idiopathic urinary calcium stone formation. 1. Expression of urease activity in bacteria from the urinary-tract that are commonly classified as urease-negative // *Urol. Res.* 1996. № 24. P. 51–54.
16. Зверев Я.Ф., Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Лампатов В.В. Механизм формирования кристаллов при оксалатном нефролитиазе // *Нефрология*. 2009. Т. 13. № 4. С. 37–50.
17. Вошула В.И. Мочекаменная болезнь: этиотропное и патогенетическое лечение, метафилактика : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Минск, 2008. 32 с.
18. Young J.D., Martel J., Young L., Wu C.-Y., Young A., Young D. Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis // *J. List. PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 2. P. 1–35.
19. Cisar J.O., Xu De-Qi, Thompson J., Swaim W., Hu L., Kopecko D.J. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 21. P. 11511–11515.
20. Folk R.L. SEM imaging of bacteria and nanobacteria in carbonate sediments and rocks // *J. Sediments Petrol.* 1993. № 63. P. 990–999.
21. Kajander E.O., Ciftcioglu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenesis intra- end extracellular calcification and stone formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 7. № 14. P. 8274–8279.
22. García-Ruiz J.M., Melero-García E., Hyde S.T. Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica // *Science*. 2009. V. 323. № 5912. P. 362–367.
23. Боровкова Е.В., Филлипов В.Н. Микровключения в пигментном холелите // *Вестник Томского гос. университета*. 2009. № 8. С. 9–11.
24. Каткова В.И. Проблема генезиса уролитов // *Вестник Томского гос. университета*. 2011. № 10. С. 14–17.
25. Пономарев А.П., Гарасько Е.В. Морфология клеток нанобактерий при воздействии *in vitro* некоторых антимикробных препаратов // *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2011. Т. 6. № 1. С. 34–40.
26. Тедиков В.М. О мнимых нанобактериях и явных наночастицах // *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2011. Т. 6. № 1. С. 42–49.
27. Урусов В.С. Симметрия–диссимметрия в эволюции мира / Бюллетень Комиссии РАН по разработке научного наследия академика В.И. Вернадского. № 19. – М.: Наука, 2008. С. 103–151.
28. Рашкович Л.Н., Перова И.В. Кристаллизация оксалата кальция // *Химия и жизнь*. 2006. № 1. С. 24–27.
29. Антонова М.О., Кузьмичева Г.М., Руденко В.И. Применение физико-химических методов для изучения мочевых камней *in vitro* // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2011. № 4. С. 437–445.
30. Кузьмичева Г.М., Антонова М.О., Чернобровкин М.Г., Руденко В.И., Мельников Д.В. Определение состава мочи и мочевых камней и установление связи между ними // *Изв. ВУЗов. Химия и хим. технология*. 2012. № 2. С. 26–30.

COMPOSITION AND MICROSTRUCTURE OF STAGHORN URINARY STONES. THEORIES OF GROWTH

M.O. Antonova[@], G.M. Kuzmicheva, *V.I. Rudenko, **A.A. Natykan, *N.V Sadovskaya**

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

**I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*

***M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, 119991 Russia*

****Karpov Institute of Physical Chemistry, Moscow, 105064 Russia*

[@]Corresponding author e-mail: mary-andre@inbox.ru

For the first time the composition and microstructure of large (more than 2 cm) urinary stones, including staghorn stones, were studied according to their volume by a set of techniques (X-ray, X-ray microanalysis, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, spectrophotometry, gas chromatography with a flame ionization detector), as well as the composition of the urine, in which their formation and growth occurred. The results and analysis combined with the published data have allowed to clarify and expand the theories of formation and suggest the process of urinary stones growth.

Key words: *urinary stone disease, staghorn stones, growth theories, X-ray method, scanning electron microscopy.*