

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ В ПАТОГЕННЫХ БИОМИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ

Е.В. Машина, С.Н. Шанина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», Первомайская, д. 54, Сыктывкар, Российская Федерация, 167982
E-mail: mashina@geo.komisc.ru

Исследование биоминеральных образований патогенной природы в живых организмах, является актуальным и необходимым для установления механизма их образования и решения многих практических вопросов. В последнее время ведутся интенсивные исследования в области биохимии D-аминокислот, считается, что они, могут быть потенциальными биомаркерами различных патологических процессов в организме человека. Присутствие энантиомеров аминокислот и их роль в механизме образования биоминеральных образований – желчных камней, вопрос еще не изученный. В работе представлены данные по распределению D-энантиомеров аминокислот, их содержание и соотношение с L-формами в составе желчных камней. Показан сравнительный анализ полученных результатов по желчным камням с мочевыми камнями. Установлено, что существует связь между энантиомерами аминокислот и кальциевой минеральной компонентой.

Ключевые слова: D-аминокислоты, энантиомеры, газожидкостная хроматография, биоминерал, желчные камни

STUDY OF ENANTIOMERS IN PATHOGENIC BIOMINERAL FORMATIONS

E.V. Mashina, S.N. Shanina

Institute of Geology FRC Komi SC UB RAS, ul. Pervomayskaya 54, Syktyvkar, Russia, 167982
E-mail: mashina@geo.komisc.ru

The study of biomineral formations of a pathogenic nature in living organisms is relevant and necessary for establishing the mechanism of their formation and solving many practical issues. Recently, intensive research has been carried out in the field of biochemistry of D-amino acids, it is believed that they can be potential biomarkers of various pathological processes in the human body. The presence of enantiomers of amino acids and their role in the mechanism of formation of biomineral formations - gallstones, the issue has not yet been studied. The paper presents data on the distribution of D-enantiomers of amino acids, their content and ratio with L-forms in the composition of gallstones. A comparative analysis of the obtained results on gallstones with urinary stones is shown. It has been established that there is a relationship between the enantiomers of amino acids and the calcium mineral component.

Key words: D-amino acids, enantiomers, gas-liquid chromatography, biomineral, gallstones

Для цитирования:

Машина Е.В., Шанина С.Н. Исследование энантиомеров в патогенных биоминеральных образованиях. *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва)*. 2022. Т. LXVI. № 4. С. 14–18. DOI: 10.6060/rcj.2022664.2.

For citation:

Mashina E.V., Shanina S.N. Study of enantiomers in pathogenic biomineral formations. *Ros. Khim. Zh.* 2022. V. 66. N 4. P. 14–18. DOI: 10.6060/rcj.2022664.2.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биоминералообразования в живых организмах и при участии живых организмов позволяет получить важную информацию об особенностях механизмов взаимосвязей биогенного и минерального вещества. Организм человека, является очень сложной минералообразующей системой. Процессы кристаллизации в нем опосредованы различными биохимическими реакциями, в результате которых в одних случаях образуются биоминералы, физиологически необходимые организму (в составе костей, зубов), в других – патологические биоминералы (в составе мочевых, желчных камней и др.), т.е. не необходимые, а возникающие в результате нарушений функционирования организма. Большое значение в настоящее время придается изучению мочевых и желчных камней, представляющих собой твердые и трудно поддающиеся растворению органоминеральные образования. Решение вопроса механизма их формирования имеет не только медицинское практическое значение, но и представляет большой интерес с точки зрения минералогического изучения, так как они содержат кальциевые минералы, образующиеся в природной геологической среде – оксалат кальция (в угольных пластах, торф), карбонат кальция (осадочные породы), фосфат кальция (фосфориты). Считается, что данные минералы имеют биогенное происхождение. Исследование биоминеральных образований патогенной природы современными методами и на разных уровнях, позволит лучше понять физико-химические условия их формирования.

Растущий интерес к анализу хиральных аминокислот возник благодаря развитию и внедрению современных и точных методов исследования, в частности жидкостной хроматографии. Известно, что живой организм использует исключительно L-формы аминокислот в биологических процессах и биосинтезе белков, поэтому присутствию D-энантиомеров до последнего времени не уделялось должного внимания. Интенсивные биохимические исследования D-аминокислот в последние два десятилетия показали, что они, могут быть потенциальными биомаркерами развития или следствия различных патологических процессов в организме человека [1–6]. Практический интерес к D-формам аминокислот связан с возможностью разработки новых терапевтических стратегий, направленных на устранение причин их синтеза/деградации в организме. Учитывая важное значение D-аминокислот в развитии и диагностике некоторых заболеваний [5], кажется логичным исследовать все возможные

аспекты их присутствия при разных видах патологий. Исследования D-энантиомеров аминокислот в мочевых камнях проведены ранее [7]. Было установлено, что в мочевых камнях присутствуют D-формы трех аминокислот: аланина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Отмечается, что самые высокие содержания D-аспарагиновой кислоты характерны для оксалатсодержащих камней. Частичная рацемизация L-аминокислот на одноименные D-аминокислоты обусловлена, деятельностью микроорганизмов и органической составляющей урины. Присутствие D-аминокислот в желчных камнях и их роль в патогенезе желчнокаменной болезни еще не изучались.

Целью данной статьи являлось установление D-форм аминокислот в желчных камнях, анализ распределения D-энантиомеров и их соотношение с L-формами в зависимости от состава желчных камней.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 24 образца желчных камней. Для изучения фазового состава образцов использовали рентгеноструктурный (Shimadzu XRD-6000; $\text{Cu}_{K\alpha}$ -излучение, шаг сканирования $0,02^\circ$, скорость съемки 1 гр/мин) и ИК-спектроскопический (Инфралюм ФТ-02) методы. На основании проведенных структурных исследований образцы имели следующий состав: холестериновые (10 образцов); холестериновые с минеральной компонентой (холестерин, фосфат кальция, карбонат кальция) (8 образцов); пигментные (билирубинат кальция) (3 образца), пигментные с минеральной компонентой (билирубинат кальция, фосфат кальция, карбонат кальция) (3 образца).

Образцы растирались до порошка и в навеске 100 мг использовались для аминокислотного анализа. Для выделения аминокислот из желчных камней применялся кислотный гидролиз в 6M HCl при 105°C в течении 12 ч. Выделенные из гидролизата аминокислоты очищали от примесей и переводили в N-пентафторпропионовые изопропиловые эфиры соответствующих аминокислот. Идентификация и определение содержания аминокислот в образцах выполнены на газовом хроматографе GC-17A (Shimadzu). Для разделения D- и L-энантиомеров полученных производных аминокислот использовалась капиллярная колонка Chirasil-L-Val (длина 25 м, внутренний диаметр 0.25 мм). Все используемые реагенты имели высокую степень чистоты (компаний Sigma, Aldrich, Fluka). Обработка и запись хроматограмм осуществлялась с использованием программы GC Solution.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех образцах пигментных желчных камней найдена D-аспарагиновая кислота (D-Asp). В трех пигментных камнях с минеральной компонентой содержания D-Asp варьировали от 0,201 до 0,359 мг/г, соотношение D/L-Asp составляло 0,139 – 0,174. Тогда как в трех пигментных камнях без минеральной компоненты содержание D-Asp было значительно ниже и составляло 0,011 – 0,128 мг/г, а соотношение D/L-Asp – 0,006 – 0,041. В них же обнаружены D-формы глутаминовой кислоты (D-Glu) и аланина (D-Ala). Для D-Glu установлены содержания 0,26 – 0,503 мг/г и отношения D/L-Glu – 0,146 – 0,156, для D-Ala – 0,268 – 0,301 мг/г и 0,124 – 0,157 соответственно.

В желчных камнях холестеринавого состава D-аминокислоты не обнаружены. В холестериновых камнях с минеральной компонентой установлена D-аспарагиновая кислота, где ее содержания менялись от 0,018 до 0,066 мг/г, а показатель D/L-Asp – 0,049 – 0,098. В трех случаях в этих образцах обнаружен также D-Ala (0,012 – 0,076 мг/г), отношение D/L-Ala – 0,005 – 0,072.

С целью выяснения вопроса распределения D-аминокислот в структуре желчных камней, были отобраны отдельные фрагменты из разных зон трех желчных камней, содержащих холестерин и минеральную компоненту. В результате установлено, что D-аспарагиновая кислота обнаружена в зонах, где сосредоточена кальциевая минеральная составляющая, тогда как в зонах содержащих холестерин она отсутствовала. Это наводит на мысль, что D-энантиомеры аминокислот в желчных камнях связаны с кальциевой минеральной компонентой.

Сравнительный анализ изученных нами желчных камней с мочевыми [7], показал, что для них характерны одни и те же D-аминокислоты: аланин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. Самые высокие содержания D-Asp и отношения D/L-Asp установлены в пигментных желчных камнях с минеральной компонентой и оксалатных мочевых камнях, D-Glu и D/L-Glu – в пигментных желчных камнях и фосфатных мочевых камнях, D-Ala и D/L-Ala – в пигментных желчных камнях и оксалатных камнях (рис. 1). В мочекислых мочевых камнях D-Asp установлена не во всех образцах, при этом показатель D/L – низкий, в них также отсутствуют D-Glu и D-Ala. В холестериновых желчных камнях без минеральной компоненты D-аминокислоты тоже не обнаружены. Отсюда можно заключить, что в желчных и мочевых камнях D-энантиомеры аминокислот связаны с кальциевой минеральной компонентой. В патогенных

образованиях, содержащих только холестерин или мочевую кислоту такой связи, не выявлено.

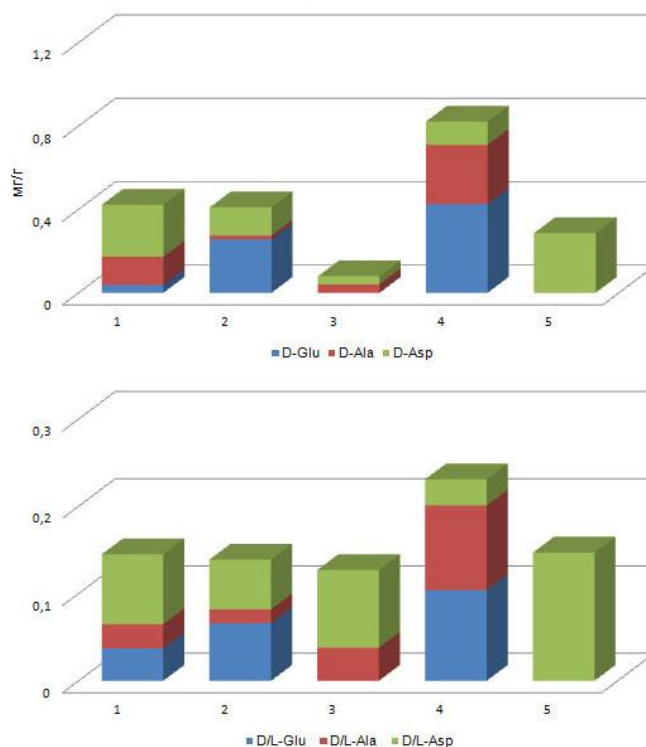


Рис. 1. Средние значения по содержанию D-аминокислот и соотношению D/L в мочевых (1-2) и желчных (3-5) камнях: 1 – оксалатные, 2 – фосфатные, 3 – холестериновые с минеральной компонентой, 4 – пигментные, 5 – пигментные с минеральной компонентой

Встает вопрос, об источниках D-форм аминокислот в желчных камнях. Так присутствие D-форм глутаминовой кислоты и аланина может быть связано с деятельностью микроорганизмов, а наличие D-аспарагиновой кислоты, как с микроорганизмами, так и рацемизацией белковой составляющей в результате патологических процессов [1, 8, 9]. Учитывая, что в образовании пигментных желчных камней центральную роль отводят бактериям [10], то нахождение D-аминокислот в них может быть обусловлено бактериальной деятельностью. При пигментном холелитиазе обнаруживают *Klebsiella*, *Enterococcus*, *E. Coli* и др., причем из одного пигментного желчного камня может быть выделено более одного микроорганизма [10]. Каждый вид микроорганизма вырабатывает определенное количество D-аминокислоты, а также ее тип. Например, *Enterococcus* синтезирует D-Asp, *E. coli* D-Glu и D-Ala. Помимо синтеза D-изомеров, микроорганизмы обладают и различной активностью – β-глюкуронидазогенерирующей, уреазопродуцирующей, фосфатазопродуцирующей и

др. [11]. Если микроорганизм обладает β -глюкуро-нидазогенерирующей активностью, то это может способствовать образованию билирубината кальция, являющимся основным компонентом пигментных желчных камней. Данный процесс осуществляется за счет деконъюгации билирубинглюкоронида и высвобождению свободного билирубина, который связываясь с кальцием, образует нерастворимый билирубинат кальция. Также при попадании в желчь различных микроорганизмов обладающих уреазопродуцирующей или фосфатазапродуцирующей активностью, есть вероятность осаждения карбонатов и фосфатов кальция, за счет гидролиза уреазой мочевины до углекислого газа и аммиака и гидролиза щелочной фосфатазой фосфорорганических соединений с высвобождением фосфора. В качестве примера, можно привести биоминерализацию карбоната кальция уреазопродуцирующими бактериями [12, 13]. Тем самым, в пигментных желчных камнях, кальциевая минерализация может являться побочным продуктом микробного метаболизма. Помимо микроорганизмов, источником D-Asp в желчных камнях могут быть рацемизированные белки, как результат патологических процессов. Согласно В.А. Твердислову и его соавторам [14], единичная замена аминокислотных остатков на их D-изомеры приводит к изменению пространственной структуры белков и нарушению их функциональных свойств. Вполне вероятно, что белки подверженные рацемизации или измененные белки в желчных камнях находятся в тесной взаимосвязи с кальциевой минеральной компонентой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Timme S., Collins M. Racemization of aspartic acid in human proteins. *J. Ageing Research Reviews*. 2002. V. 1. N 1. P. 43–59. DOI: 10.1016/s0047-6374(01)00363-3.
2. Fuchs S.A., Berger R., Klomp L.W., Koning T.J. D-amino acids in the central nervous system in health and disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2005. V. 85. N 3. P. 168–180. DOI: 10.1016/j.ymgme.2005.03.003.
3. Червяков А.В., Гуляева Н.В., Захарова М.Н. D-аминокислоты при нормальном старении и в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. *Нейрохимия*. 2011. Т. 28. № 2. С. 113–129.
4. Kimura T., Hamase K., Miyoshi Y., Yamamoto R., Yasuda K., Mita M., Rakugi H., Hayashi T., Isaka Y. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Scientific Reports*. 2016. V. 6. N 1. P. 26137. DOI: 10.1038/srep26137.
5. Genchi G. An overview on D-amino acids. *Amino Acids*. 2017. V. 49. P. 1521–1533. DOI: 10.1007/s00726-017-2459-5.
6. Jacco J.A., Eijk H.M., Damink S.W., Rensen S.S. D-amino acids in health and disease: A focus on cancer. *Nutrients*. 2019. V. 11. N 9. P. 2205. DOI: 10.3390/nu11092205.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования позволили получить новые данные о составе желчных камней. В них выявлены D-формы для трех аминокислот: аланина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

Присутствие D-аминокислот в желчных камнях зависит от их фазового состава. Они отсутствуют в желчных камнях холестеринавого состава, а также в отдельных зонах желчных камней содержащих только холестерин. Энантиомеры аминокислот уставлены совместно с минеральной компонентой в холестериновых желчных камнях и в пигментных желчных камнях, где их содержания достигают максимума. Кальциевая минерализация в пигментных камнях, возможно, является побочным продуктом микробного метаболизма. Источниками D-аминокислот в желчных камнях могут являться микроорганизмы и белки подверженные рацемизации. Полученные данные могут иметь важное значение для понимания механизма образования разных типов желчных камней.

Работа выполнена по теме НИР государственного задания (№ 1021062211108-5-1.5.2) ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.

REFERENCES

1. Timme S., Collins M. Racemization of aspartic acid in human proteins. *J. Ageing Research Reviews*. 2002. V. 1. N 1. P. 43–59. DOI: 10.1016/s0047-6374(01)00363-3.
2. Fuchs S.A., Berger R., Klomp L.W., Koning T.J. D-amino acids in the central nervous system in health and disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2005. V. 85. N 3. P. 168–180. DOI: 10.1016/j.ymgme.2005.03.003.
3. Chervyakov A.V., Gulyaeva N.V., Zakharova M.N. D-amino acids in normal aging and in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochemistry*. 2011. V. 28. N 2. P. 113–129. (in Russian).
4. Kimura T., Hamase K., Miyoshi Y., Yamamoto R., Yasuda K., Mita M., Rakugi H., Hayashi T., Isaka Y. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Scientific Reports*. 2016. V. 6. N 1. P. 26137. DOI: 10.1038/srep26137.
5. Genchi G. An overview on D-amino acids. *Amino Acids*. 2017. V. 49. P. 1521–1533. DOI: 10.1007/s00726-017-2459-5.
6. Jacco J.A., Eijk H.M., Damink S.W., Rensen S.S. D-amino acids in health and disease: A focus on cancer. *Nutrients*. 2019. V. 11. N 9. P. 2205. DOI: 10.3390/nu11092205.

7. Каткова В.И., Шанина С.Н. Хиральные соединения в уrolитах. Вестник геонаук. 2019. № 4. С. 38–41.
8. 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. V. 68. P. 817–831. DOI: 10.1007/s00018-010-0571-8.
9. Sasabe J., Suzuki M. Distinctive Roles of D-Amino Acids in the Homochiral World: Chirality of Amino Acids Modulates Mammalian Physiology and Pathology. *The Keio Journal of Medicine.* 2019. V. 68. N 1. P. 1–16. DOI: 10.2302/kjm.2018-0001-IR.
10. 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. V. 6. N 6. P. 891–904.
11. Хоулт Дж., Криг Н., Снеат П., Стейли Дж., Уильямс С. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ. М.: Мир. 1997. 432 с.
12. Rodriguez-Navarro C., Jimenez-Lopez C., Rodriguez-Navarro A., Gonzalez-Munoz M., Rodriguez-Gallego M. Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2007. V. 71. N 5. P. 1197–1213.
13. Anbu P., Kang C.-H., Shin Y.-J., So J.-S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springer Plus.* 2016. V. 5 N 250. P. 5–26. DOI: 10.1186/s40064-016-1869-2.
14. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Жаворонков А.А. Хиральность как проблема биохимической физики. *Российский химический журнал.* 2007. Т. LI. N 1. С. 13–22.
7. Katkova V.I., Shanina S.N. Chiral compounds in urinary stones. *Bulletin of Geosciences.* 2019. N 4. P. 38–41. (in Russian).
8. 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. V. 68. P. 817–831. DOI: 10.1007/s00018-010-0571-8.
9. Sasabe J., Suzuki M. Distinctive Roles of D-Amino Acids in the Homochiral World: Chirality of Amino Acids Modulates Mammalian Physiology and Pathology. *The Keio Journal of Medicine.* 2019. V. 68. N 1. P. 1–16. DOI: 10.2302/kjm.2018-0001-IR.
10. 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. V. 6. N 6. P. 891–904.
11. Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J., Williams S. *Bergie bacteria determinant.* In 2 volumes. M.: Mir. 1997. 432 p. (in Russian).
12. Rodriguez-Navarro C., Jimenez-Lopez C., Rodriguez-Navarro A., Gonzalez-Munoz M., Rodriguez-Gallego M. Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2007. V. 71. N 5. P. 1197–1213.
13. Anbu P., Kang C.-H., Shin Y.-J., So J.-S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springer Plus.* 2016. V. 5 N 250. P. 5–26. DOI: 10.1186/s40064-016-1869-2.
14. Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Zhavoronkov A.A. Chirality as a problem in biochemical physics. *Russian Chemical Journal.* 2007. V. LI. N 1. P. 13–22. (in Russian).

*Поступила в редакцию 05.07.2022
Принята к опубликованию 24.10.2022*

*Received 05.07.2022
Accepted 24.10.2022*