



ХИРАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В УРОЛИТАХ

В. И. Каткова, С. Н. Шанина

Институт геологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

katkova@geo.komisc.ru, shanina@geo.komisc.ru

Исследования последних лет показали увеличение содержания D-аминокислот в белках различных тканей организма человека в процессе старения. Известно, что значительные изменения баланса L- и D-аминокислот наблюдаются при различных патологических процессах. Одной из часто встречаемых патологий у человека является уролитиаз, генезис которого до сих пор вызывает много вопросов.

Цель данной работы — выявление D-форм аминокислот в уролитах и сравнительный анализ их содержаний в зависимости от минерального состава мочевых камней и возраста человека. Изучено 19 проб уролитов моно- и полиминерального состава, в которых идентифицированы узуеллит, уэдделлит, струвит, ньюберит, мочевая кислота, карбонатгидроксилапатит. Возраст людей, предоставивших патогенные образования, составлял 22–75 лет.

Для выделения индивидуальных аминокислот из уролитов применялся кислотный гидролиз в 6M HCl при 105 °C в течение 12 часов. Идентификация и количественное определение энантиомеров аминокислот выполнялись методом газожидкостной хроматографии (хроматограф GC-17A, Shimadzu, колонка Chirasil-L-Val).

В изученных уролитах D-формы установлены для трех аминокислот: аланина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Результаты исследований показали, что существует связь между отношением D- и L-аминокислот и минеральной составляющей уролитов. Отмечается, что максимальные содержания D-аспарагиновой кислоты характерны для оксалатсодержащих камней. Высказывается предположение о влиянии оксалат-ионов на степень рацемизации аспарагиновой кислоты в патогенных биоминеральных образованиях.

Ключевые слова: уролиты, L- и D-аминокислоты, аспарагиновая кислота, биоминерал.

CHIRAL CONNECTIONS IN UROLITES

V. I. Katkova, S. N. Shanina

Institute of Geology SC UB RAS, Syktyvkar

Recent studies have shown increasing in the content of D-amino acids in the proteins of various tissues of the human body in the process of aging. It is known that significant changes in the balance of L- and D-amino acids are observed in various pathological processes. One of the most common pathologies in the human is urolithiasis, in the genesis of which there are still many questions.

The purpose of this work is to identify D-forms of amino acids in uroliths and a comparative analysis of their contents depending on the mineral composition of urinary stones and human age. 19 samples of uroliths of mono- and polymineral composition were studied, in which whewellite, weddellite, struvite, newberite, uric acid, carbonate-hydroxylapatite were identified. The chronological age of people who provided pathogenic biominerals was 22–75 years.

Acid hydrolysis in 6 M HCl at 105 °C for 12 hours was used to isolate individual amino acids from uroliths. Identification and quantification of the enantiomers of amino acids was carried out by gas chromatography (chromatograph GC-17A, Shimadzu, column Chirasil-L-Val).

In the studied uroliths, D-forms are established for three amino acids: alanine, aspartic acid, and glutamic acid. Research results have shown that there is a relationship between the ratio of D and L amino acids and the mineral component of uroliths. It is noted that the maximum content of D-aspartic acid is characteristic of oxalic stones. In the presence of impurities of calcium oxalate crystals (weddellite and or weddellite) in phosphate and urate uroliths, elevated values of D-Asp are observed. In this connection, an assumption was made about an increase in the degree of racemization of the aspartic acid in the presence of oxalic acid ions in pathogenic biomineral formations.

Keywords: uroliths, L- and D-enantiomers, amino acids, aspartic acid, biomineral.

Введение

Придавая большое значение асимметрии живого вещества, Л. Пастер считал ее именно той единственной разграничивающей линией, которую можно провести между живой и неживой природой, то есть тем, что отличает живое вещество от неживого. Высказанное предположение является актуальным в настоящее время при решении проблем биоминеральных взаимодействий, происхождения предбиологических молекул и для понимания процессов старения на молекулярном уровне. Биомакромолекулы (аминокислоты, сахара, нуклеиновые кислоты и фосфолипиды) обладают хиральностью, то есть зеркально-антиподобным свойством.

Считалось, что все живые организмы содержат и используют в своей жизнедеятельности только L-аминокислоты, а наличие и функции D-аминокислот долгое время оставались неустановленными. Последние исследования показали, что D-аминокислоты широко распространены в тканях живых организмов, в том чи-

сле и человека. Было установлено, что D-аспарагиновая кислота, в частности, обнаружена в хрусталике, головном мозге, костях, эритроцитах, зубах и в других органах и системах. Определены специфические функции D-форм отдельных аминокислот в здоровом организме [4, 5].

Известно, что количественное соотношение L- и D-энантиомеров изменяется в процессе жизнедеятельности организма. D-аминокислоты поступают в организм млекопитающих с пищей, образуются при метаболизме кишечной флоры, а также в результате спонтанной рацемизации аминокислот при биосинтезе и старении. При старении происходит рацемизация L-аминокислот с переходом их в D-форму в белках, причем в наибольшей степени подвержена этому процессу аспарагиновая кислота. Считается, что скорость рацемизации аминокислот в пептидах значительно выше, чем свободных аминокислот. Согласно В. А. Твердислову и его соавторам (2007), процессы рацемизации, в частности аспарагиновой кислоты, проходят без участия фер-



ментов. Единичная замена аминокислотных остатков на их D-изомеры может приводить как к полной потере функциональности белков, так и к снижению активности ферментов. В обзорной работе [5] показано, что при некоторых психосоматических заболеваниях (шизофрении, болезнь Альцгеймера и Паркинсона), наблюдаются значительные изменения уровня некоторых D-аминокислот — D-Ser, D-Ala, D-Asp — в плазме крови, сером и белом веществе головного мозга и спинномозговой жидкости. Найдена положительная корреляция между концентрацией D-аминокислот и маркерами почечных заболеваний.

Влияние процессов рацемизации аминокислот в организме человека при уролитиазе на уровень концентрации D-форм в уролитах остается неизученным.

Целью данной работы является проведение сравнительного анализа концентраций D-аминокислот в уролитах, формирующихся в организме человека, и выявление зависимости соотношения D- и L-энантиомеров от возраста человека и минеральных фаз в составе патогенных биоминеральных образований.

Фактический материал и методы исследований

Изучено 19 проб уролитов (см. таблицу), минеральный состав которых определен методами рентгеновской дифрактометрии и ИК-спектроскопии. Идентифицированы следующие минеральные фазы: уэвеллит ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), уэдделлит ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), струвит ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ньюбериит ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), мочева кислота ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$), карбонатсодержащий апатит-(CaOH) [1]. Возраст людей с уролитиазом составлял 22–75 лет.

Анализировались L- и D-изомеры 13 аминокислот: аланина (Ala), валина (Val), изолейцина (Ile), лейцина (Leu), аспарагиновой кислоты (Asp), глутаминовой кислоты (Glu), треонина (Thr), серина (Ser), фенилаланина (Phe), тирозина (Tyr), пролина (Pro), лизина (Lys) и метионина (Met).

Для извлечения аминокислот из белковой составляющей применяли кислотный гидролиз в 6M HCl при 105 °C в течение 12 часов. 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, капиллярная колонка Chirasil-L-Val). Подробно методика описана в статье [3].

Результаты и обсуждение исследований

Содержание и распределение аминокислот в изученных уролитах подробно описаны в работе [1]. Анализ белковой составляющей уролитов позволил выделить отдельные аминокислоты, доминирование которых специфично для конкретного типа уролитов: в оксалатных наблюдаются относительно высокие концентрации аланина и пролина, в фосфатных — лизина, а в уратных — глицина и тирозина.

В результате проведенных исследований D-формы были выявлены только для трех аминокислот: аланина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

Установлено, что для оксалатсодержащих образцов (уэвеллита и уэдделлита) характерен высокий по-

казатель D/L для Asp, тогда как D-Glu и D-Ala, часто являющиеся маркерами жизнедеятельности микроорганизмов, установлены только в некоторых образцах и имеют низкие содержания (см. таблицу). В литературе имеются данные показателей соотношений D/L-Asp в эмали в зависимости от возраста коренных зубов [9], а также в дентине с учетом фактического возраста человека [8, 11]. Поскольку уролиты не относятся к долгоживущим образованиям *in vivo*, в отличие от зубов и костей, это наводит на мысль о влиянии оксалат-ионов (щавелевой кислоты) на ускорение процесса рацемизации аспарагиновой кислоты в патогенных биоминеральных образованиях.

В фосфатных уролитах значение D/L-Asp меняется от 0.010 до 0.099. Выявлено, что повышенные концентрации D-Asp характерны для фосфатных уролитов, в составе которых наряду с апатитом содержится уэвеллит. Биоминеральные образования, состоящие только из апатита или струвита, имеют пониженный уровень D-Asp.

Кроме того, в струвитсодержащих образцах зафиксированы высокие показатели отношений D/L-Glu (0.095–0.106). Формирование фосфатных уролитов издавна связывали с проникновением бактериальной инфекции в мочевыводящие органы. Пептидогликаны, входящие в состав клеточной стенки бактерий, можно рассматривать как один из источников связанных D-Glu и D-Ala [6]. В связи с этим присутствие их в белковой составляющей может свидетельствовать об участии микроорганизмов в генезисе фосфатных биоминералов (струвита, апатита).

В мочекислых уролитах отношения D/L-Asp меняются от 0 до 0.089 (см. таблицу). При этом в уролитах, содержащих только мочевую кислоту, концентрация D-Asp значительно ниже, чем в образцах, содержащих примеси солей щавелевой кислоты (уэвеллита и уэдделлита). На основе полученных данных можно предположить, что на содержание L-Asp в белковой составляющей оказывает влияние присутствие оксалат-ионов в патогенных твердых образованиях. В данном типе уролитов не обнаружены D-Glu и D-Ala. Результаты исследований наводят на мысль о генетической специфике кристаллических образований органического состава изученных уролитов, формирование которых часто связано с метаболическими нарушениями в организме человека.

Источником D-аминокислот в уролитах, на наш взгляд, могут быть урина, компоненты микробальной клеточной стенки с цитоплазмой и протеом уролитов, представляющий многообразный спектр белков. Как связанные с пептидами, так и свободные D-аминокислоты, в частности D-Asp, D-Ser и D-Ala, в избытке содержатся в моче и сыворотке крови [6]. D-Asp найден во фрагментах коллагена типа I в моче пожилых людей. У трех здоровых добровольцев в 24-часовых пробах урины наибольшие количества были определены для D-Ser (64–199 моль/день) и D-Ala (24–138 моль/день). В среднем от 0.4 до 1.1 г свободных аминокислот ежедневно выделяется с мочой здорового взрослого человека [6]. На экскрецию D-стереоизомеров в физиологических жидкостях влияет возраст, рацион питания, физиологическое состояние и антибиотикотерапия [10].

Ранее при исследованиях количественного содержания L- и D-форм аспарагиновой кислоты в эма-



Соотношение D/L энантиомеров аминокислот в белковой составляющей уролитов, сформированных в организме человека

D/L ratio of enantiomers of amino acids in the protein component of uroliths, formed in the human body

Уролиты Uroliths	№ образца Sample No.	Биоминералы Biominerals	Возраст индивида, г Age of individual	D/L Asp	D/L Glu	D/L Ala
Оксалатные <i>Oxalate</i>	19 к	уэвеллит \ whewellite	?	0.053	0	0
	58	уэдделлит \ whedellite	22	0.03	0	0.014
	59	уэвеллит, уэдделлит whewellite, whedellite	70	0.081	—//—	—//—
	79	уэвеллит whewellite	60	0.085	—//—	0.032
	87	—//—	69	0.152	0.037	0.038
Фосфатные <i>Phosphate</i>	46	апатит, уэвеллит apatite, whewellite	45	0.099	0.059	0.025
	48	—//—	50	0.074	0.034	0.01
	51	апатит, уэвеллит, струвит apatite, whewellite, struvite	56	0.082	0.095	0.032
	52	апатит,	53	0.039	0.024	0.031
	53	струвит apatite, struvite	42	0.051	0.106	0.002
	69	—//—	24	0.01	0	0.012
	35	струвит, уэвеллит struvite, whewellite	35	0.061	0.124	0
	47	ньюбериит \ newberyite	?	0.042	0.022	0.002
	29 к	мочевая кислота \ uric acid	?	0.056	0	0
Мочекислые <i>Urate</i>	45	—//—	75	0	—//—	—//—
	54	—//—	56	0.039	—//—	—//—
	61	мочевая кислота, уэвеллит uric acid, whewellite	53	0.089	—//—	—//—
	72	мочевая кислота uric acid	55	0.046	—//—	—//—
	77	—//—	64	0	—//—	—//—

Примечание: ? — нет данных возраста

Note: ? — no data on age

ли была установлена положительная корреляция между коэффициентом рацемизации и возрастом человека [8, 9, 10]. Исследования показали, что D-аспарагиновая кислота в эмали после 60 лет может составлять до 8 % всей аспарагиновой кислоты. В настоящее время анализ содержания D-аспарагиновой кислоты в долгоживущих тканях (зубы, кости) считается надежным методом оценки возраста человека в развитых странах [7, 8, 11].

В нашем случае отсутствие представительной выборки камнеобразователей не позволяет достоверно говорить о влиянии возраста на степень рацемизации аспарагиновой кислоты в мочевых камнях. Однако следует отметить, что в изученных уролитах самые низкие отношения D/L-аспарагиновой кислоты также установлены у людей, чей возраст составляет 22 и 24 года.

Выводы

Таким образом, показано, что концентрация D-энантиомеров в составе органической составляющей в патогенных биоминералах зависит от состава минеральной фазы. В оксалатсодержащих уролитах отмечены значительные изменения баланса L- и D-формы Asp. Уровень аспарагиновой кислоты повышен в фосфатных и мочекислых уролитах в присутствии оксалатионов, и напротив, пониженные концентрации D-Asp

наблюдаются в тех случаях, когда они имеют мономинеральный состав. Полагаем, что ионы щавелевой кислоты оказывают влияние на степень рацемизации аспарагиновой кислоты в патогенных биоминеральных образованиях. Содержание D-изомеров в уролитах обусловлено частичной рацемизацией L-аминокислот на одноименные D-аминокислоты деятельностью микроорганизмов и составом органической составляющей урины.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке проекта УрО РАН № 18-5-5-44 «Процессы и механизмы минералообразования, надмолекулярной организации минерального вещества, комплексной переработки минерального сырья и формирования наноструктурированных материалов».

Аналитические исследования выполнялись в ЦКП «Геонаука».

Литература

1. Каткова В. И., Амосова О. Е., Шанина С. Н. Скрытые биомаркеры процессов минералообразования в генезисе уролитов // Вестник Кольского научного центра РАН. 2018. № 4. С. 17–24.
2. Твердислов В. А., Яковенко Л. В., Жаворонков А. А. Хиральность как проблема биохимической физики // Российский химический журнал. 2007. Т. LI. № 1. С. 13–22.



3. Шанина С. Н., Голубев Е. А. Аминокислоты в шунгитах Карелии // Геохимия. 2010. № 9. С. 972–987.
4. Червяков А. В. Нарушение молекулярной асимметрии аминокислот (D\l-энантиомеры) при нормальном старении // Асимметрия. 2010. Т. 4. № 2. С. 78–117.
5. Червяков А. В., Захарова М. Н., Пестов Н. Б. Роль D-аминокислот в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и при нормальном старении // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2014. Том 8. № 2. С. 51–58.
6. Brückner H., Schieber A. Determination of amino acid enantiomers in human urine and blood serum by gas chromatography-mass spectrometry // Biomedical Chromatography, 2001. № 15. P. 166–172.
7. Griffin R. C., Moody H., Penkman K. E. H., Collins M. J. The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth // Forensic Science International, 2008. V. 175. P. 11–16.
8. Hassan Q., Jaleel A., Bashir Z., Jajja N., Tarar U. M., Haider S., Zehra L. Amino acid racemization in human dentine as an estimator of chronological age // Pakistan Journal of Medicine and Dentistry, 2014. V. 3. P. 3–11.
9. Helfman P. M., Bada J. L. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans // Biochemistry, 1975. V. 72. No. 8. P. 2891–2894.
10. Oancea S., Formaggio F. Biological role of d-a-amino acids and their occurrence in foodstuffs // Food technology, 2008. V. XII. № 1. P. 3–18.
11. Ohtani S., Yamamoto T. Cases of age estimation from human teeth // J. Forensic Sciences, 2010. V. 55. No. 6. P. 1630–1633.
2. Tverdislov V. A., Yakovenko L. V., Zhavoronkov A. A. *Khiral'nost' kak problema biokhimicheskoy fiziki* (Chirality as a problem of biochemical physics). Russian Chemical Journal, 2007, V. LI., No. 1, pp. 13–22.
3. Shanina S. N., Golubev Ye. A. *Aminokisloty v shungitakh Karelii* (Amino acids in shungite of Karelia). Geochemistry, 2010, No. 9, pp. 972–987.
4. Chervyakov A. V. *Narusheniye molekulyarnoy asimetrii aminokislot (d\l- enantiomery) pri normal'nom starenii* (Violation of molecular asymmetry of amino acids (d \ l-enantiomers) with normal aging). Asymmetry, 2010, V. 4, No. 2, pp. 78–117.
5. Chervyakov A. V., Zakharova M. N., Pestov N. B. *Rol' D-aminokislot v patogeneze neyrodegenerativnykh zabolevaniy i pri normal'nom starenii* (The role of D-amino acids in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and in normal aging). Annals of Clinical and Experimental Neurology, 2014, V. 8, No. 2, pp. 51–58.
6. Brückner H., Schieber A. Determination of amino acid enantiomers in human urine and blood serum by gas chromatography-mass spectrometry. Biomedical Chromatography, 2001, No. 15, pp. 166–172.
7. Griffin R. C., Moody H., Penkman K. E. H., Collins M. J. The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth. Forensic Science International, 2008, V. 175, pp. 11–16.
8. Hassan Q., Jaleel A., Bashir Z., Jajja N., Tarar U. M., Haider S., Zehra L. Amino acid racemization in human dentine as an estimator of chronological age. Pakistan Journal of Medicine and Dentistry, 2014, V. 3, pp. 3–11.
9. Helfman P. M., Bada J. L. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. Biochemistry, 1975, V. 72, No. 8, pp. 2891–2894.
10. Oancea S., Formaggio F. Biological role of d-a-amino acids and their occurrence in foodstuffs. Food technology, 2008, V. XII, No. 1, pp. 3–18.
11. Ohtani S., Yamamoto T. Cases of age estimation from human teeth. J. Forensic Sciences, 2010, V. 55, No. 6, pp. 1630–1633.

References

1. Katkova V. I., Amosova O. Ye., Shanina S. N. *Skrytyrye biomarkery protsessov mineraloobrazovaniya v genezise urolitov* (Latent biomarkers of mineral-forming processes in the urolith genesis). Vestnik of the Kola Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Apatity: GI, 2018, No. 4, pp. 17–24.