

УДК 577.612.612.67

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И АМИНОКИСЛОТ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ СЕЛЕЗЕНКИ

<sup>1</sup>Вахитов Т.Я., <sup>2</sup>Чалисова Н.И., <sup>1</sup>Полевая Е.В., <sup>3</sup>Линькова Н.С.,  
<sup>3</sup>Салль Т.С., <sup>2,3</sup>Хавинсон В.Х.

<sup>1</sup>Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов,  
Санкт-Петербург, e-mail: tim-vakhitov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: ni-chalisova@mail.ru;

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург,  
e-mail: miayy@yandex.ru

Впервые было изучено действие карбоновых кислот – соединений метаболически и структурно связанных с кодируемыми L-аминокислотами, на пролиферативную активность клеток в органотипической культуре ткани селезенки крыс. Было установлено, что практически все биогенные алифатические карбоновые кислоты оказывают стимулирующее влияние на пролиферативную активность клеток иммунной ткани селезенки. Эффективные концентрации карбоновых кислот оказались близки к действующим концентрациям аминокислот. Полученные результаты создают базу для дальнейшего изучения регуляторных свойств карбоновых кислот и их эволюционной взаимосвязи с аминокислотами.

**Ключевые слова:** карбоновые кислоты, аминокислоты, органотипическая культура ткани

## A COMPARATIVE STUDY OF THE REGULATORY ACTIONS OF CARBOXYLIC AND AMINO ACIDS IN SPLEEN ORGANOTYPIC TISSUE CULTURE

<sup>1</sup>Vahitov T.Y., <sup>2</sup>Chalisova N.I., <sup>1</sup>Polevaya E.V., <sup>3</sup>Linkova N.S., <sup>3</sup>Sall T.S., <sup>2,3</sup>Khavinson V.H.

<sup>1</sup>State Scientific Research Institute of Pure Biochemicals, St. Petersburg,  
e-mail: tim-vakhitov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, St. Petersburg, e-mail: ni-chalisova@mail.ru;

<sup>3</sup>St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, e-mail: miayy@yandex.ru

The effect of carboxylic acids – metabolically and structurally related to coded L-amino acids, on the proliferation activity of the cells in organotypic tissue cultures of rat spleen was first studied. It was found that almost all biogenic aliphatic carboxylic acids have stimulating effects on proliferative activity of immune cells in the spleen tissue and their active concentrations were similar to concentrations existing amino acids. These results provide the basis for further investigation of carboxylic acids regulatory properties and their evolutionary interconnection with amino acids.

**Keywords:** carboxylic acids, amino acids, organotypic tissue culture

За последние десятилетия накопились данные о том, что кодируемые аминокислоты являются не только структурными единицами при построении белковых молекул, но и сигнальными молекулами, которые могут регулировать экспрессию генов. [5, 6, 7]. В наших предыдущих исследованиях [3, 4] было показано, что каждая из 20 кодируемых L-аминокислот в концентрациях 0.05–0.1 нг/мл оказывает в органотипической культуре различных тканей крыс разное воздействие на пролиферацию и апоптоз. Одни аминокислоты вызывают стимуляцию клеточного роста, сопровождающуюся увеличением экспрессии пролиферотропных белков PCNA, Ki67 и снижением экспрессии проапоптозного белка p53. Другие аминокислоты угнетают клеточную регенерацию за счет индукции процессов апоптоза (гиперэкспрессия p53). Было выявлено, что пролиферацию лимфоидных клеток селезенки

стимулируют глутаминовая кислота, аспарагин, лизин и аргинин. Остальные 12 из 20 кодируемых аминокислот угнетали клеточную пролиферацию, 4 аминокислоты не оказывали влияния на клеточный рост [3].

Биологическая активность карбоновых кислот связана с взаимодействием организма человека и его микрофлоры. Выделяемые микробиотой карбоновые кислоты служат не только источником питания для бактерий и клеток хозяина, но и могут оказывать на них регуляторное воздействие [1, 2]. Различные производные карбоновых кислот можно рассматривать в качестве структурных аналогов соответствующих аминокислот, которые отличаются наличием одной аминокислотной группы в альфа-положении. Например, уксусная кислота является структурным аналогом глицина, пропионовая – аланина, изовалериановая – валина, винная – лизина, фумаровая – аргинина и изолейцина, янтар-

ная – аспарагиновой кислоты, глутаровая – глутаминовой кислоты.

Целью работы являлось сравнительное изучение влияния кодируемых аминокислот и карбоновых кислот на пролиферативную активность клеток в органотипической культуре ткани селезенки крыс.

### Материалы и методы исследования

Органотипическое культивирование ткани селезенки проводилось по описанной ранее методике [3, 4]. В экспериментах использовано 800 эксплантатов селезенки половозрелых 3-месячных самцов крыс линии Вистар. Отпрепарированные в стерильных условиях фрагменты селезенки разделяли на мелкие части величиной около 1 мм. На дно чашки Петри с коллагеновой подложкой помещали 20–25 эксплантатов на расстоянии 3 мм друг от друга. Использовали культуральную среду с pH 7,2 следующего состава: 35% – раствора Хенкса, 35% – среды Игла, 25% – сыворотки крови плодов коровы, с добавлением глюкозы (60 мг, %), гентамицина (100 ед/мл). Чашки Петри с эксплантатами помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при температуре 36,8°C. Контрольные чашки Петри содержали только культуральную среду (3 мл), в экспериментальные чашки с 3 мл среды вводили карбоновые кислоты (фирма «Sigma» США) в концентрациях 0,01–50 нг/мл (10<sup>-11</sup>–10<sup>-12</sup> М). Рост эксплантатов исследовали прижизненно с помощью фазово-контрастного микроскопа через 3 суток, используя микротеленасадку для микроскопа (МТН-13 «Альфа-Телеком», Россия). Морфометрическую оценку эксплантатов осуществляли с помощью пакета программ PhotoM 1.2. Индекс площади ИП рассчитывали как отношение площади всего эксплантата, включая периферическую зону роста (состоящую из пролиферирующих лимфоцитов), к площади центральной зоны. Контрольное значение ИП принимали за 100%, остальные ИП выражали в процентах к контролю. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась в программе «Statistica 6.0».

### Результаты исследования и их обсуждение

Все исследованные алифатические карбоновые кислоты, за исключением уксусной, стимулировали клеточную пролиферацию. Из 17 исследованных аминокислот 9 стимулировали клеточный рост. Не влияли на клеточный рост молочная, яблочная и муравьиная кислоты. Угнетающее клеточную пролиферацию действие выявлено только у уксусной кислоты (таблица).

Глутаровая кислота является структурным аналогом глутаминовой кислоты и она, также как и глутаминовая кислота, стимулировала рост эксплантатов [3], т.е. она способна в тканях селезенки выполнять те же регуляторные функции, что и глутаминовая кислота. Глутаровая, гамма-аминомасляная, янтарная, фумаровая, яблочная и малеиновая кислоты тесно связаны между собой как в структурном, так и в метаболическом отношении, и все они, кроме яблочной, стимулировали рост эксплантатов иммунной ткани селезенки.

Пропионовая, молочная и пировиноградная кислоты рассматриваются как структурные аналоги аминокислоты аланина, которая не оказывает влияния на ткань селезенки [3]. При этом пировиноградная кислота (пируват) является конечным продуктом гликолиза и важным источником питания и энергии для клеток, поэтому не удивительно, что сама она оказывает стимулирующее влияние на развитие эксплантатов. В ходе дальнейшего метаболизма пируват окисляется до ацетилкофермента А и включается в цикл трикарбоновых кислот, либо служит прекурсором для образования ряда продуктов, в том числе аланина и молочной кислоты. Оба структурных аналога пирувата, – аминокислота аланин и молочная кислота, практически не оказывали регуляторного воздействия на ткань селезенки.

Капроновая (гексановая) кислота является важным продуктом брожения кишечной микрофлоры и является структурным аналогом аминокислоты лизина, который представляет собой 2,6-диаминогексановую кислоту и обладает стимулирующим действием на ткань селезенки [3]. Капроновая кислота стимулировала пролиферацию клеток в широком диапазоне от 0,1 до 10 нг/мл.

Изовалериановая кислота является структурным аналогом валина и образуется из аминокислоты лейцина. Обе эти аминокислоты подавляли развитие эксплантатов [3], однако карбоновые кислоты – валериановая, изовалериановая, оказывали положительное действие на рост эксплантатов.

Лимонная кислота является центральным соединением в метаболизме и бактериальных и эукариотических клеток, и эта роль может объяснять ее стимулирующее воздействие на развитие эксплантатов селезенки в широком диапазоне концентраций.

Л-винная кислота, структурно связанная с лизином и лейцином, является распространённым природным соединением и представляет собой диоксиянтарную, или 2,3-диоксибутандиовую кислоту. Она получается введением дополнительной оксигруппы в яблочную кислоту или двух оксигрупп в янтарную. Эта структурная модификация приводит к значительному изменению биологической активности. Винная кислота отличается максимальной из всех исследованных карбоновых кислот активностью и, кроме того, самым широким диапазоном действия: 0,01 – 10 нг/мл.

Единственной карбоновой кислотой, подавляющей развитие эксплантатов, оказалась уксусная кислота. Аналогичным действием обладал и структурный аналог уксусной кислоты – аминокислота глицин [3].

## Влияние карбоновых кислот на рост эксплантатов селезенки

| № п/п | Карбоновая кислота  | Концентрация, нг/мл         |           |           |         |         |
|-------|---------------------|-----------------------------|-----------|-----------|---------|---------|
|       |                     | 0,01                        | 0,05      | 0,1       | 10      | 50      |
|       |                     | Разность индекса площади, % |           |           |         |         |
| 1     | Муравьиная          | 5 ± 1                       | 4 ± 2     | 3 ± 1     | 5 ± 2   | 9 ± 4   |
| 2     | Уксусная            | – 4 ± 1                     | – 1 ± 0.5 | – 20* ± 5 | 2 ± 1   | – 5 ± 3 |
| 3     | Пропионовая         | 13 ± 5                      | 15 ± 4    | 24* ± 6   | 22* ± 3 | 7 ± 25  |
| 4     | D,L-молочная        | 5 ± 2                       | 5 ± 1     | 3 ± 1     | 5 ± 3   | 2 ± 1   |
| 5     | Пировиноградная     | 11 ± 5                      | 16 ± 4    | 17 ± 7    | 23* ± 3 | 8 ± 5   |
| 6     | Масляная            | 8 ± 4                       | 15 ± 5    | 20* ± 3   | 9 ± 5   | 12 ± 7  |
| 7     | Янтарная            | 22* ± 3                     | 17* ± 2   | 11 ± 5    | 12 ± 6  | 8 ± 3   |
| 8     | D,L-яблочная        | 12 ± 5                      | 11 ± 4    | 5 ± 1     | 6 ± 3   | 1 ± 0.5 |
| 9     | L-Винная            | 20* ± 5                     | 20* ± 3   | 23* ± 4   | 37* ± 8 | 17 ± 5  |
| 10    | Фумаровая           | 12 ± 5                      | 24* ± 5   | 9 ± 5     | 7 ± 5   | 5 ± 1   |
| 11    | Малеиновая          | 13 ± 7                      | 18* ± 2   | 11 ± 5    | 12 ± 6  | 8 ± 5   |
| 12    | Глутаровая          | 15 ± 5                      | 31* ± 9   | 20* ± 5   | 19* ± 3 | 15 ± 7  |
| 13    | Гамма-аминомасляная | 11 ± 6                      | 25* ± 4   | 14 ± 7    | 19* ± 2 | 11 ± 6  |
| 14    | Валериановая        | 12 ± 7                      | 24* ± 5   | 24* ± 3   | 18* ± 2 | 12 ± 6  |
| 15    | Изовалериановая     | 9 ± 4                       | 26* ± 5   | 30* ± 7   | 18* ± 4 | 15 ± 5  |
| 16    | Капроновая          | 12 ± 8                      | 14 ± 5    | 25* ± 6   | 23* ± 5 | 7 ± 2   |
| 17    | Лимонная            | 7 ± 3                       | 25* ± 6   | 24* ± 5   | 24* ± 3 | 15 ± 7  |

Пр и м е ч а н и е . \*p < 0,05 по сравнению с контролем.

Масляная кислота, также как и другие карбоновые кислоты, оказывает на эксплантаты стимулирующее действие, хотя ее структурный аналог – аминокислота треонин обладает ингибирующим клеточный рост действием.

### Закключение

Впервые показано, что алифатические карбоновые кислоты метаболически и структурно связанные с аминокислотами, (за исключением уксусной кислоты), оказывают стимулирующее влияние на пролиферацию клеток в иммунной ткани селезенки. Полученные данные позволяют полагать, что карбоновые кислоты, могут выполнять роль положительных регуляторов в тканях селезенки и стимулировать иммунитет животного. Значительное количество карбоновых кислот поступает в организм хозяина от его микрофлоры, что может оказывать влияние на иммунный статус животного.

Таким образом сравнительный анализ влияния карбоновых кислот и кодируемых аминокислот на лимфоидную ткань показывает, что, в отличие от своих структурных аналогов, оказывающих лишь стимулирующее действие на иммунную ткань, аминокислоты при усложнении структуры (присоединение аминогруппы в альфа-положении) приобрели свойства регуляции обоих основных клеточных процессов, т.е. не только стимуляции, но и угнетения клеточной пролиферации за счет развития апоптоза. Можно полагать, что в качестве регуляторов пролиферативной активности

клеток карбоновые кислоты являются эволюционными предшественниками аминокислот. Аминокислоты обладают уже большей специфичностью влияния на основные клеточные процессы – пролиферацию и апоптоз, чем карбоновые кислоты. Ранее нами [8] было установлено, что сами аминокислоты уступают по этим показателям структурно более сложным олигопептидам. Все эти данные отражают одну из общебиологических закономерностей эволюции живой материи, заключающуюся в том, что по мере усложнения структуры субстрата увеличивается специфичность его действия.

### Список литературы

1. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболитов бактерий // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 483–488.
2. Чалисова Н.И., Вахитов Т.Я., Петров Л.Н., Балыкина Н.А., Ноздрачев А.Д. Модулирующее влияние метаболитов микрофлоры человека и животных на культуру лимфоидной ткани. // Доклады АН. – 2009. – Т. 428, № 1. – С. 121–124.
3. Чалисова Н.И., Концевая Е.А., Войцеховская М.В., Комашня А.В. Регуляторное влияние кодируемых аминокислот на клеточные процессы у молодых и старых животных // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 2. – С. 189–197.
4. Хавинсон В.Х., Чалисова Н.И., Линькова Н.С., Халимов Р.И., Ничик Т.Е. Зависимость тканеспецифического действия пептидов от их количественного аминокислотного состава // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2 (2). – С. 497–503.
5. Braun R.J., C. Sommer, C. Leibiger Accumulation of Basic Amino Acids at Mitochondria Dictates the Cytotoxicity of Aberrant Ubiquitin // Cell. Rep. – 2015. – № 10. – P. 1557–1571.
6. Cheon W. Effect of leucine uptake on hepatic and skeletal muscle gene expression in rats: a microarray analysis // J. Exerc. Nutr. Biochem. – 2015. – Vol. 19, № 2. – P. 139–146.
7. D'Aniello A. D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role // Brain Res. Rev. – 2007. – Vol. 53, № 2. – P. 215–234.