

Эффекты L-аргинина на баланс эндогенного карнитина и окислительно-модифицированных белков ткани печени при экспериментальной гипергомоцистеинемии

Э.С. Бельских¹, кандидат медицинских наук, доцент (e-mail: ed.bels@yandex.ru);

О.М. Урясев¹, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой (e-mail: uryasev08@yandex.ru);

В.И. Звягина², канд. биол. наук, доцент;

Ю.А. Марсянова², ассистент;

Е.А. Судакова², ассистент.

¹ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Минздрава России, кафедра факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша (ул. Высоковольтная, 9, г. Рязань, Россия, 390026)

²ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Минздрава России, кафедра биологической химии (ул. Высоковольтная, 9, г. Рязань, Россия, 390026)

К настоящему времени сформированы предпосылки для исследования механизмов взаимосвязей между уровнем гомоцистеина (ГЦ), продукцией оксида азота и концентрацией карнитина в тканях. Печень является главным органом, в котором происходит как метаболизм метионина и ГЦ, а также происходят этапы синтеза эндогенного карнитина. Целью работы стало изучение содержания фракций карнитина в митохондриях тканей печени в условиях экспериментальной модели метиониновой нагрузки на фоне введения L-аргинина, как ключевого субстрата для синтеза оксида азота II (NO) и антиоксиданта. Установлено, что экспериментальная модель трехнедельной метиониновой нагрузки приводит к значительному истощению содержания карнитина и его фракций в митохондриях печени крыс. L-аргинин в дозе 500 мг/кг в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии оказывает протективные эффекты: снижает интенсивность окислительной модификации белков, повышает активность супероксиддисмутазы (СОД) в митохондриальной фракции, способствует утилизации лактата и приросту метаболитов NO. Выявленные изменения позволяют предположить наличие взаимосвязи L-аргинина и L-карнитина в механизмах регуляции метаболизма метионина и ГЦ.

Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, печень, гомоцистеин, L-аргинин.

Effects of l-arginine on the balance of endogenous carnitine and indices of liver mitochondrial function in experimental hyperhomocysteinemia

E.S. Belskikh¹, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor;

O.M. Uryasev¹, Doctor of Medical Sciences, Professor, head of Department (e-mail: uryasev08@yandex.ru);

V.I. Zvyagina², Candidate of Biological Sciences, Associate Professor;

Y.A. Marsyanova², Assistant;

E.A. Sudakova², Assistant.

¹Ryazan State Medical University, Faculty Therapy named after Professor V.Ya. Garmash (9 Vysokovoltynaya str., Ryazan, Russia, 390026)

²Ryazan State Medical University, Biological Chemistry Department (9 Vysokovoltynaya str., Ryazan, Russia, 390026)



To date, prerequisites have been formed to study the mechanisms of interrelationships between homocysteine levels, nitric oxide production and carnitine concentration in tissues. The liver is the main organ in which both methionine and homocysteine metabolism and the stages of endogenous carnitine synthesis take place. The aim of the work was to study the content of carnitine fractions in mitochondria of liver tissues under the conditions of experimental model of methionine load against the background of L-arginine administration as a key substrate for nitric oxide II (NO) synthesis and antioxidant. It was found that the experimental model of three-week methionine load leads to a significant depletion of carnitine and its fractions in rat liver mitochondria. L-arginine at a dose of 500 mg/kg in conditions of experimental hyperhomocysteinemia has protective effects: it reduces the intensity of oxidative modification of proteins, increases the activity of SOD in mitochondrial fraction, promotes lactate utilization and increase of NO metabolites. The revealed changes suggest the presence of interrelation of L-arginine and L-carnitine in the mechanisms of regulation of methionine and homocysteine metabolism.

Keywords: *mitochondrial dysfunction, liver, homocysteine, L-arginine.*

Введение

Гомоцистеин (ГЦ) — серосодержащая аминокислота, являющаяся промежуточным продуктом метаболизма метионина и образующаяся как продукт гидролиза S-аденозилгомоцистеина, который, в свою очередь, образуется из S-аденозилметионина [1]. Высвобожденный ГЦ может быть реметилован до метионина или катаболизироваться до цистеина, при этом небольшие его количества могут превращаться в гомоцистеина тиолактон [1].

Повышение уровня ГЦ в крови (гипергомоцистеинемия, ГГЦ) может развиваться вследствие генетических нарушений, при дефиците витаминов, участвующих в метаболизме ГЦ, при повышенном содержании метионина в пищевых продуктах, нарушении экскреторной функции почек, приеме лекарственных препаратов (фибраты, теофиллин, изониазид, метотрексат и другие), а также вследствие курения [2].

По данным метаобзора 9 исследований, проводившихся в период с 2001 по 2021 год установлено, что у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в крови обнаруживается повышенный уровень ГЦ [3]. К настоящему времени наиболее известна связь ГГЦ с развитием сердечно-сосудистой патологии [3, 4]. При этом накопление сведений о роли повышенного уровня ГЦ в развитии сахарного диабета и патологии почек, прогрессировании остеопороза и неврологических нарушений позволяет предположить, что уровень ГЦ крови также может быть одной из важных предпосылок для развития коморбидных состояний у пациентов с ХОБЛ [4, 5]. По данным ряда исследований подчеркивается, что токсичность повышенного уровня ГЦ в тканях может быть обусловлена развитием митохондриальной дисфункции клеток различных тканей, что может рассматриваться как потенциальная точка приложения для разработки новых терапевтических подходов [2–5].

Исследования последних лет демонстрируют, что пациенты с ХОБЛ и бронхиальной астмой характеризуются снижением уровня карнитина и изменением соотношений его производных [6–9]. Выявленные взаимосвязи между уровнем карнитина и генерацией оксида азота II (NO) делают интересным изучение механизмов связей между ГГЦ, NO и уровнем карнитина у пациентов с ХОБЛ [7–9].

Примечательно, что ранее было выявлено, что карнитин снижается в митохондриях тканей сердца и эпидидимиса в условиях экспериментальной ГГЦ [10, 11].

Печень является главным органом, в котором происходят как превращения, связанные с метаболизмом метионина и ГЦ, так и процессы, связанные с синтезом эндогенного карнитина. Поэтому целью работы стало изучение содержания фракций карнитина и показателей функционирования митохондрий печени в условиях экспериментальной ГГЦ на фоне введения L-аргинина, как ключевого субстрата для синтеза NO и антиоксиданта [12–14].

Материалы и методы

Исследование проводилось на крысах-самцах линии Wistar. 1-я группа (Твин, n = 8) получала суспензионную основу и служила контролем [15]. 2-я группа (Метионин 3 недели, n = 8) животные с экспериментальной ГГЦ [15]. 3-я группа (Метионин 3 недели + L-аргинин, n = 8) на фоне моделирования ГГЦ с 11-го по 21-й день получала раствор L-аргинина на 0,9 % NaCl в дозе 500 мг/кг ежедневно внутривенно [12, 13, 16]. У животных извлекали печень и помещали в холодный раствор (+ 4°C) среды выделения, содержащий 0,25 М сахарозы, 0,001 М этилендиаминтетраацетата натрия и 0,02 М трис-HCl буфер с pH = 7,4 [1]. Навески тканей взвешивали, затем измельчали с помощью ножниц и помещали в гомогенизатор «Potter S», где гомогенизировали в среде выделения в соотношении 1 : 9 при 900 об/мин 35 секунд. Митохондрии печени выделяли методом дифференциального центрифугирования. Все манипуляции осуществляли при температуре + 4°C.

Содержание белка определяли по методу Лоури с использованием коммерческого набора НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург, Россия). Оценку концентрации лактата и активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) осуществляли с помощью коммерческих наборов (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, ФРГ).

Содержание метаболитов NO (нитраты и нитриты суммарно) определяли спектрофотометрически по методу Метельской В.А. [18]. Активность супероксид-



дисмутазы (СОД) определяли методом, основанным на реакции торможения аутоокисления кверцетина [19]. Концентрацию карнитина определяли по методу L. Wan и R. Hubbard [20].

Для оценки интенсивности повреждения белков вследствие окислительного стресса исследовалось содержание окислительно-модифицированных белков по методу R.L. Levine в модификации с последующей комплексной оценкой (АДНФГ — альдегиддинитрофенилгидразоны — маркеры раннего окислительного повреждения белков, КДНФГ — кетондинитрофенилгидразоны — маркеры позднего окислительного повреждения белков; uv — в ультрафиолетовом спектре, vis — в видимом спектре) [21].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью GraphPad Prism 9.0. С помощью критерия Шапиро-Уилка проверяли соответствие выборок нормальному распределению. В связи с тем, что распределение в исследуемых группах было отлично от нормального, для попарного сравнения исследуемых групп применялся критерий Манна-Уитни с поправкой Бенджамини-Кригера-Иекутели при множественном сравнении. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как следует из рисунка 1, моделирование экспериментальной ГГЦ сопровождалось статистически значимым снижением содержания общего (в 8,8 раз, 47,5 [45,09; 51,83] мкмоль/мг белка; $p = 0,0001$), свободного (в 4,6 раз, 12 [10,72; 15,21] мкмоль/мг белка; $p = 0,0009$) и связанного карнитина (в 13,7 раз; 28,3 [19,54; 34,11] мкмоль/мг белка; $p = 0,0009$) в митохондриях печени крыс по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, экспериментальная модель трехнедельной метиониновой нагрузки приводит к выраженному снижению уровня карнитина и его фракций в митохондриях печени крыс.

Экспериментальная ГГЦ на фоне назначения животным L-аргинина (группа Метионин 3 недели + L-аргинин) в митохондриях тканей печени сопровождалась повышением концентрации общего карнитина в 2,2 раз (12 [10,8; 14,73] мкмоль/мг белка; $p_{2-3} = 0,07$), свободного карнитина в 1,4 раз (3,7 [3,52; 5,3]; мкмоль/мг белка, $p_{2-3} = 0,104$), связанного карнитина в 1,7 раз (8 [7,05; 8,82] мкмоль/мг белка, $p_{2-3} = 0,024$) по сравнению с группой 2 (Метионин 3 недели).

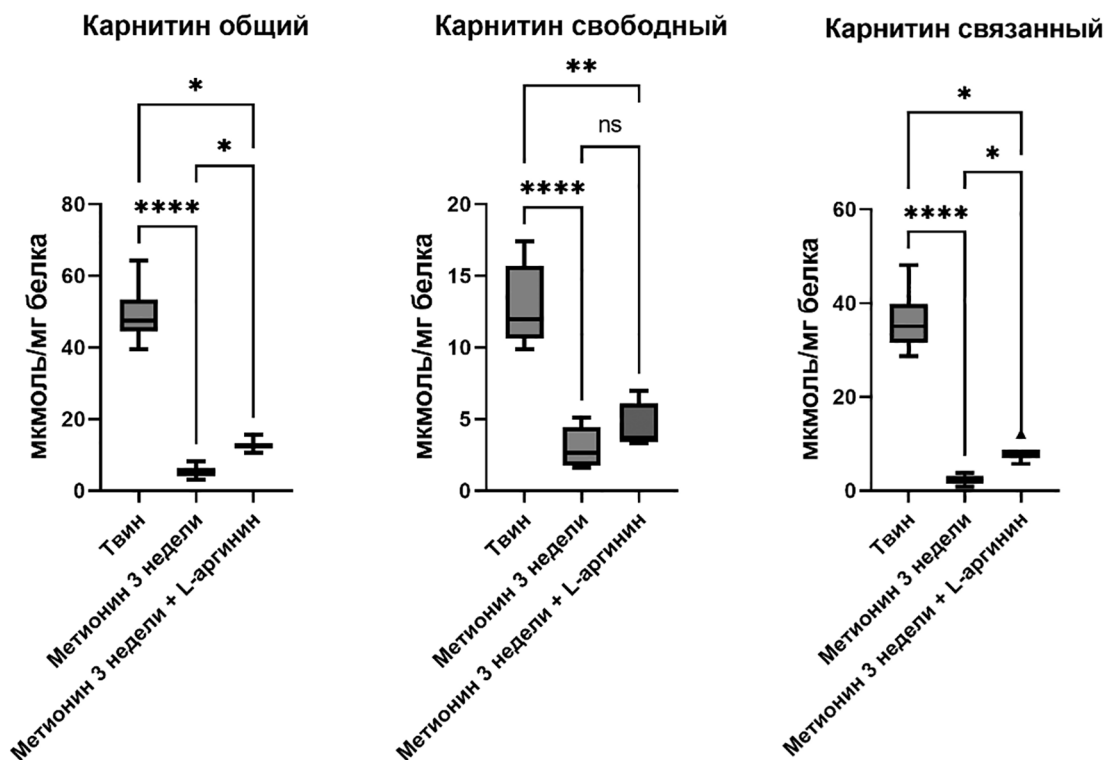


Рис. 1. Оценка баланса фракций карнитина в митохондриях печени
Assessment of the balance of carnitine fractions in liver mitochondria.

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$, ** при $p < 0,01$, *** при $p < 0,001$, **** при $p \leq 0,0001$, символом ns — non significant — результаты статистически не значимые ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me [Q1; Q3].

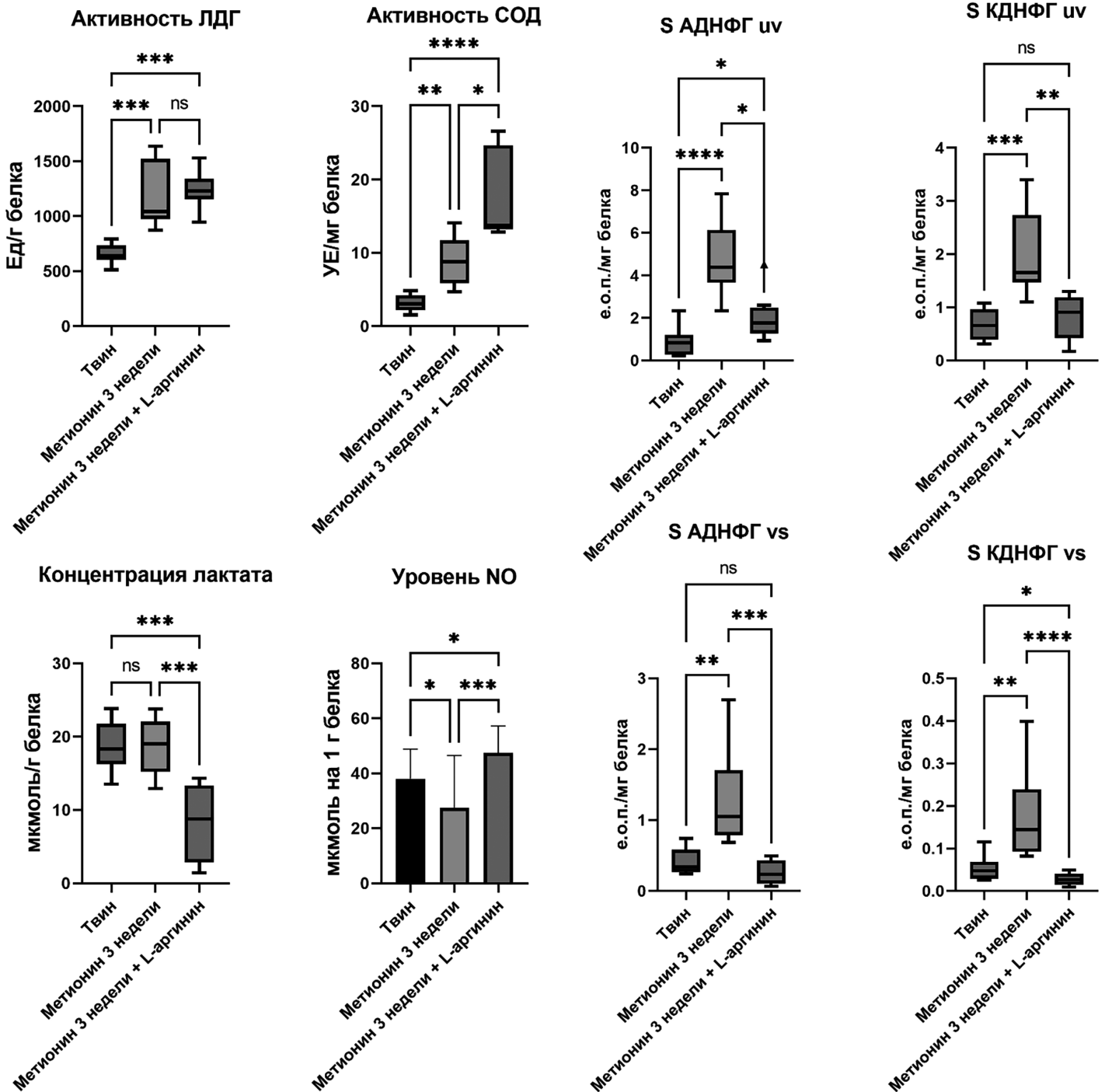


Рис. 2. Активность исследуемых ферментов и концентрации метаболитов в митохондриях печени
The activity of the studied enzymes and the concentration of metabolites in the liver mitochondria

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$, ** при $p < 0,01$, *** при $p < 0,001$, **** при $p < 0,0001$, символом ns – non significant – результаты статистически не значимые ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me [Q1; Q3]. NO – оксид азота II, СОД – супероксиддисмутаза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

Рис. 3. Показатели комплексной оценки окислительной модификации белков митохондрий печени
Indicators of a comprehensive assessment of oxidative modification of liver mitochondrial proteins

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$, ** при $p < 0,01$, *** при $p < 0,001$, **** при $p \leq 0,0001$, символом ns – non significant – результаты статистически не значимые ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me [Q1; Q3]. АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны – маркеры раннего окислительного повреждения белков, КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны – маркеры позднего окислительного повреждения белков; uv – в ультрафиолетовом спектре, vs – в видимом спектре)

Выявленные изменения демонстрировали, что введение экзогенного L-аргинина в дозе 500 мг/кг при моделировании экспериментальной ГГЦ ассоциировано с невыраженным, но статистически значимым эффектом на баланс фракций эндогенного карнитина митохондрий гепатоцитов, что создает предпосылки для дальнейших исследований дозозависимости и системности обнаруженного эффекта [12, 13, 16].

Оценка показателей функции митохондрий позволила установить кратное повышение активности ЛДГ и СОД, что, вероятно, отражало компенсаторные реакции, связанные с развитием метаболического и окислительного стресса в условиях нагрузки метионином. При этом, уменьшение концентрации метаболитов NO в митохондриях указывало, возможно, на снижение активности генерации NO, принимающего участие в контроле активности ферментов цепи переноса электронов.

В соответствии с рисунком 3, прирост окислительно модифицированных белков, в первую очередь АДНФГ, как маркеров раннего повреждения, подтверждал развитие окислительного стресса в условиях исследуемой экспериментальной модели [21].

Введение экзогенного L-аргинина сопровождалось воспроизведением его ранее установленного антиоксидантного эффекта — снижение как показателя АДНФГ, так и КДНФГ. Также отмечалось увеличение активности СОД (в 1,6 раз; 13,8 [13,3; 23]; $p = 0,005$) по сравнению с группой, получавшей только метионин. Наряду с этим, в группе 3 установлено уменьшение концентрации лактата (в 2,17 раз; 8,8 [3,4; 12,4]; $p = 0,0015$) и увеличение содержания метаболитов NO (47,4 [41,6; 51,6]; в 1,72 раз, $p = 0,005$) митохондриальной фракции по сравнению с показателями группы 2, что позволяет предполагать протективный эффект L-аргинина в отношении митохондрий печени в условиях ГГЦ.

Выводы

Экзогенный L-аргинин в условиях метиониновой нагрузки оказывает протективные эффекты в отношении митохондрий печени: уменьшает содержание маркеров раннего и позднего окислительного повреждения белков, повышает активность СОД, способствует утилизации лактата и приросту метаболитов NO.

Выявленные изменения позволяют предположить наличие взаимосвязи L-аргинина и L-карнитина в механизмах регуляции метаболизма метионина и ГГЦ.

Источники финансирования

Исследование проведено при поддержке гранта Президента РФ МК-4805.2022.3.

Литература

1. D. Finkelstein, J. J. Martin. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. The journal of biological chemistry. 1986. 261(4): 1582-1587.
2. J. Perla-Kaján, T. Twardowski, H. Jakubowski. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. Amino Acids. 2007. 32(4): 561-572. — doi: 10.1007/s00726-006-0432-9.
3. Zinellu A., Zinellu E., Pau M.C., Fois A.G., Mellino S., Piras B., Scano V., Fois S.S., Mangoni A.A., Carru C., Pirina P. A systematic review and meta-analysis of homocysteine concentrations in chronic obstructive pulmonary disease. Clin Exp Med. 2023 Jul;23(3):751-758. doi: 10.1007/s10238-022-00833-0.
4. Kaplan P., Tatarikova Z., Sironova M.K., Racay P., Lehotsky J. Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems. Int J Mol Sci. 2020. 18;21(20):7698. doi: 10.3390/ijms21207698.
5. Tripathi P. Molecular and biochemical aspects of Homocysteine in Cardiovascular Diseases. International Cardiovascular Forum Journal. 2016;6:13-17. DOI: 10.17987/icfj.v6i0.240
6. Tinelli C., Di Pino A., Ficulie E., Marcelli S., Feligioni M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. Front Nutr. 2019. 24;6:49. doi: 10.3389/fnut.2019.00049.
7. Reinke S.N., Naz S., Chaleckis R., Gallart-Ayala H., Kolmert J., Kermani N.Z., Tiotiu A., Broadhurst D.I., Lundqvist A., Olsson H., Ström M., Wheelock Å.M., Gómez C., Ericsson M., Sousa A.R., Riley J.H., Bates S., Scholfield J., Loza M., Baribaud F., Bakke P.S., Caruso M., Chanez P., Fowler S.J., Geiser T., Howarth P., Horváth I., Krug N., Montuschi P., Behndig A., Singer F., Musial J., Shaw D.E., Dahlén B., Hu S., Lasky-Su J., Sterk P.J., Chung K.F., Djukanovic R., Dahlén S.E., Adcock I.M., Wheelock C.E.; U-BIOPRED Study Group. Urinary metabolite of severe asthma evidences decreased carnitine metabolism independent of oral corticosteroid treatment in the U-BIOPRED study. Eur Respir J. 2022. 30;59(6):2101733. doi: 10.1183/13993003.01733-2021.
8. Novotna B., Abdel-Hamid M., Koblizek V., Svoboda M., Hejduk K., Rehacek V., Bis J., Salajka F. A pilot data analysis of a metabolomic HPLC-MS/MS study of patients with COPD. Adv Clin Exp Med. 2018. 27(4):531-539. doi: 10.17219/acem/68763
9. Sun X., Sharma S., Fratz S., et al. Disruption of endothelial cell mitochondrial bioenergetics in lambs with increased pulmonary blood flow // Antioxid Redox Signal. 2013. 18(14): 1739-1752. doi:10.1089/ars.2012.4806
10. Звягина В.И., Бельских Э.С., Урясьев О.М., и др. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2018. 13(1): 78–81. doi:10.14300/mnsc.2018.13022
11. Zvyagina V.I., Belskikh E.S. Comparative Assessment of the Functional Activity of Rat Epididymal Mitochondria in Oxidative Stress Induced by Hyperhomocysteinemia and L-NAME Administration. J Evol Biochem Phys. 2022. 58(2): 364-379.
12. West S.G., Likos-Krick A., Brown P., et al. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men // J Nutr. 2005. 135(2): 212-217. doi:10.1093/jn/135.2.212
13. Lee S.J., Park S.H., Chung J.F., et al. Homocysteine-induced peripheral microcirculation dysfunction in zebrafish and its attenuation by L-arginine // Oncotarget. 2017. 8(35): 58264-58271. doi:10.18632/oncotarget.16811
14. Zvyagina V.I., Belskikh E.S. Carnitine Chloride Reduces the Severity of Experimental Hyperhomocysteinemia and Promotes Lactate Utilization by the Mitochondrial Fraction of the Rat Epididymis // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2021. 67(4): 338–346. doi:10.1134/S1990750821040119
15. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2014. 22(4):42-46. doi: 10.17816/PAVLOVJ2014442-46
16. Звягина В.И., Шумаев К.Б., Бельских Э.С., Урясьев О.М., Ахмедова С.Р., Марьянова Ю.А., Шитикова А.М., Сучкова О.Н. Протективные эффекты L-аргинина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. - 2022. 30(4): 457-470. doi: 10.17816/PAVLOVJ109410
17. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие / под ред. М.И. Прохоровой. - Л.: Издательство Ленинградского университета, 1982. 327 с.
18. Метельская В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова. — Текст (визуальный): непосредственный // Клинич. лаб. диагностика. 2005. 6, 15- 18.
19. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопросы медицинской химии. 1990. 36(2), 88-91.
20. Wan L., Hubbard R.W. Determination of free and total carnitine with a random-access chemistry analyzer // Clin Chem. 1998. 44(4): 810-816.
21. Фомина М.А. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота: монография / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. — 192 с. — ISBN 978-5-9704-4372-9. — Текст (визуальный): непосредственный.