

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 19, №2

2020



УДК 577.112.386.5:[612.359]-092.9

14.03.03 Патологическая физиология

DOI: 10.37903/vsgma.2020:2.2

ЭФФЕКТЫ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПУЛА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В ПЕЧЕНИ КРЫС

© Новгородская Я.И., Дорошенко Е.М., Курбат М.Н.

*Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230009, ул. Гродно, Горького, 80**Резюме*

Цель. Выявление эффектов гипергомоцистеинемии у крыс, вызванной принудительным введением метионина, на компоненты пула низкомолекулярных серосодержащих соединений и метаболически связанных с ними свободных аминокислот в печени.

Методика. Цистеиновую и цистеинсульфиновую кислоты, серин, глицин, гипотаурин, таурин, метионин, цистатионин, гомоцистеиновую кислоту в плазме крови и печени крыс определяли методом обращенно-фазной ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции. Определение гомоцистеина, цистеина, цистеинилглицина, γ -глутамилцистеина и глутатиона в плазме крови и печени крыс проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ после предколоночной дериватизации с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом с детектированием по флуоресценции. Количественное определение уровня Mat1a (S-аденозилметионин синтазы) в плазме крови проводили иммуноферментным анализом.

Результаты. Длительная метиониновая нагрузка вызывает гипергомоцистеинемию, а также повышение уровней гипотаурина и таурина в плазме крови крыс. Одновременно снижаются уровни серина и глицина как в плазме крови, так и в печени крыс. На фоне гипергомоцистеинемии в печени крыс выявлено повышение уровней гомоцистеиновой и цистеинсульфиновой кислот, гомоцистеина, цистатионина, гипотаурина и глутатиона.

Заключение. Синтез таурина как в печени, так и в плазме преимущественно осуществляется по пути декарбоксилирования цистеиновой кислоты. Содержание гомоцистеина в плазме крови и в печени не коррелируют ни в контрольной, ни в опытной группе животных.

Ключевые слова: низкомолекулярные серосодержащие соединения, гомоцистеин, плазма, печень, метиониновая нагрузка

EFFECTS OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA ON THE POOL OF LOW-MOLECULAR WEIGHT SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS IN RAT LIVER

Novogrodskaya Ya.I., Doroshenko Ye.M., Kurbat M.N.

*Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus**Abstract*

Objective. To evaluate the effects of hyperhomocysteinemia in rats induced by forced methionine load on the components of the pool of low-molecular weight sulfur-containing compound and metabolically bound free amino acids in the liver.

Methods. Cysteic and cysteinesulfinic acids, serine, glycine, hypotaurine, taurine, methionine, cystothionine, homocysteic acid in blood plasma and liver of rats were determined by reversed-phase HPLC with percolumn derivatization by *o*-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid and detection by fluorescence. Determination of homocysteine, cysteine, cyseinyglycine, γ -glutamylcysteine and glutathione in blood plasma and liver of rats was performed by reversed-phase HPLC after pre-column derivatization by ammonium-7-fluorobenzene-2-oxo-1,3-diazole-4-sulfonate and fluorescence detection. Assay of Mat1a (S-adenosylmethionine synthase) in blood plasma was done by ELISA.

Results. Prolonged methionine load induced hyperhomocysteinemia as well as increase of the levels of hypotaurine and taurine in blood plasma of rats. Simultaneously, the levels of serine and glycine decreased in both plasma and liver of rats. Under hyperhomocysteinemia in the liver of rats an increase of

the levels of homocysteic and cysteinesulfinic acids as well as of homocysteine, cystathionine, hypotaurine and glutathione was demonstrated.

Conclusion. Taurine synthesis in both liver and plasma preferably occurs through decarboxylation of cysteic acid. Homocysteine concentration in the blood plasma has no correlations with its liver content neither in control nor in experimental group of animals.

Keywords: low-molecular weight sulfur-containing compounds, homocysteine, plasma, liver, methionine load

Введение

Гомоцистеин – четырехуглеродная α -аминокислота, содержащая SH-группу. Источником гомоцистеина является активная форма метионина – S-аденозилметионин (SAM), который образуется в результате присоединения метионина к молекуле аденозина, образующегося при гидролизе АТФ. Первую реакцию метаболизма метионина, направленную на образование SAM катализирует фермент метионаденозилтрансфераза (MAT). Имеется две формы MAT, являющиеся продуктами двух генов MAT1A и MAT2A, которые кодируют соответственно MAT1/III и MATII. MAT1A экспрессируется только в гепатоцитах у взрослых, а MAT2A – в остальных тканях, а также в печени плода. Специфичные для печени изоферменты ингибируются при циррозе печени человека, что является причиной аномального метаболизма метионина [7]. Отдавая метильную группу в многочисленных реакциях трансметилирования, SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH), а аденозилгомоцистеиназа переводит его в гомоцистеин. Finkelstein J.D. еще в 1998 г. в работе «The metabolism of homocysteine: pathways and regulation» описал два способа утилизации гомоцистеина из клеток млекопитающих: транссульфурирование и реметилирование (превращение Hcy в метионин под действием кобаламин-зависимой метионинсинтазы и бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансферазы (BHMT)). Известно, что обработка первичных гепатоцитов мыши гомоцистеином снижает экспрессию BHMT, а обработка их BHMT/бетаином защищает клетки от вызванного гомоцистеином увеличения маркеров окислительного стресса: белка теплового шока (GRP78 – glucose-regulated protein) и важного транскрипционного фактора CHOP, экспрессия которого повышается при окислительном стрессе (CHOP – C/EBP homologous protein), а также от гибели клеток [8]. Сравнительно недавно в печени и почках взрослых грызунов, взрослых людей и свиней обнаружена активность другого фермента – бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансферазы 2, субстратом которого является S-метил-L-метионин. Данный фермент, вероятно, также принимает участие в процессе реметилирования гомоцистеина [6].

Трансульфурирование гомоцистеина до цистатионина происходит при участии цистатионин- β -синтазы. Цистатионин- β -синтаза – первый фермент транссульфурирования, катализирующий превращение гомоцистеина и серина в цистатионин. Полный путь транссульфурирования имеется в печени, почках, поджелудочной железе и тонком кишечнике. Однако, цистатионин- β -синтаза не обнаружена в сердце, легких, яичках, селезенке и надпочечниках. Вторая реакция катализируется цистатионин- γ -лиазой.

Моделирование гипергомоцистеинемии возможно путем внутрибрюшинного введения этионина, тиолактона D,L-гомоцистеина, некоторые исследователи добавляют метионин в питьевую воду. Несмотря на то, что существует достаточное количество работ по изучению влияния гипергомоцистеинемии на различные системы организма, в литературе практически отсутствуют сведения о его тканевых уровнях.

Цель исследования – выяснение эффектов гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на показатели пула низкомолекулярных серосодержащих соединений и некоторых родственным им свободных аминокислот в печени крыс.

Методика

Эксперимент был выполнен на 18 белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г. Крысы находились в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом, получали воду и корм в достаточном количестве. На выполнение данного исследования получено разрешение этического комитета Гродненского государственного университета.

Моделирование гипергомоцистеинемии осуществлялось путем внутривенного введения суспензии L-метионина в 1% крахмальном растворе (Chem-Impex Int'l Inc., USA) в дозе 1,5 г/кг дважды в сутки в течение 21 сут [1]. Контрольная группа получала эквивалентное количество 1% крахмального раствора в том же режиме дозирования. Декапитацию проводили через 12 ч. после последнего введения метионина. Кровь забирали в пробирки с гепарином. Плазма крови отделялась центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин.

Пробы плазмы крови депротеинизировали смешиванием (1:1) с 1 М раствором хлорной кислоты, содержащим 0,2 мМ норвалина (nVal), 50 мг/л ЭДТА, 50 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, центрифугировали при 4°C 15 мин. при 16000g, супернатанты отделяли аспирацией и хранили при -18°C не более 15 сут. Пробы печени крыс, хранившиеся в жидком азоте, гомогенизировали (1:10) в 0,2 М хлорной кислоте, содержащей 0,2 мМ nVal, 50 мг/л ЭДТА, 50 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, дальнейшая обработка проб аналогична пробам плазмы крови. Растворы стандартов, используемые для калибровки хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом. В полученных хлорнокислых экстрактах печени и плазмы определяли концентрации цистеиновой кислоты (CA), цистеинсульфиновой кислоты (CSA), серина (Ser), глицина (Gly), гипотаурина (HrTau), таурина (Tau), метионина (Met), цистатионина (Ctn), гомоцистеиновой кислоты (HCA) методом обращенно-фазной ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции (338/455 нм). Колонка Zorbax Eclipse Plus C_{18} с размером частиц 3,5 мкм, размеры колонки 2,1×150 мм, с предколонокой 2,1×12,5 мм, заполненной таким же сорбентом, размером частиц 5 мкм (Agilent). Подвижная фаза: 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,8, содержащий 20 мг/л ЭДТА (A); ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (B), метанол/вода 7/3 (об/об) (C), 0,1 М Na-ацетат натрия, содержащий 20 мг/л ЭДТА (D). Разделение – с градиентным элюированием.

Определение гомоцистеина (Hcy), цистеина (Cys), цистеинилглицина (CysGly), γ -глутамилцистеина (γ GluCys), глутатиона (GSH) в плазме крови и печени проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции (379/510 нм). Метод основан на предколоночной дериватизации SH-содержащих соединений с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F). Пробы плазмы смешивали с 0,5 мМ раствором N-ацетилцистеина (внутренний стандарт) и раствором трис-(карбокситил)фосфина (TCEP) (100 мг/мл). Пробы инкубировали 30 мин. при комнатной температуре, белки осаждали 10% ТХУ и центрифугировали при 4°C 15 мин. при 16000 g. К безбелковому супернатанту добавляли смесь для дериватизации, состоящую из 1,55 М NaOH, 0,125 М Na-боратного буфера, pH 9,5 и раствора SBD-F (1 мг/мл). Инкубировали 1 ч. при 60°C. В систему вводили 5 мкл реакционной смеси. Растворы стандартов, используемые для калибровки хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом. Колонка Zorbax Eclipse Plus SB C_{18} , 2,1×150 мм. Подвижная фаза: 0,1 М NaH_2PO_4 , 17 мМ H_3PO_4 , 20 мг/л ЭДТА (A), ацетонитрил/вода 7/3 (об/об.) (B). Разделение – с градиентным элюированием.

Количественное определение уровня метионинаденозилтрансферазы (Mat1a) в плазме крови проводили с помощью набора для иммуноферментного анализа Rat Mat1a (S-adenosylmethionine synthase isoform type-1) ELISA Kit Cat. № ER0266 («Fine test», Китай).

Статистическую обработку данных проводили с применением *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок после контроля нормальности с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллифорса и Шапиро-Уилка. При отклонении распределения от нормального достоверность различий между группами проверяли медианным тестом Манна-Уитни, различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Для выявления взаимосвязи между исследуемыми показателями с нормальным распределением использовали корреляционный анализ Пирсона, корреляционный анализ Спирмена – для показателей с ненормальным распределением. Результаты выражали в виде среднего и средней ошибки среднего ($M \pm m$) для показателей с нормальным распределением, медианы, нижней и верхней квартили (Me [нижняя; верхняя квартили]) – для показателей, имеющих различия между группами, достоверные только по непараметрическому тесту. Применяли пакет статистических программ Statistica 10.0 (серийный номер AXAR207F394425FA-Q).

Результаты исследования и их обсуждение

Уровень Hcy в плазме крови крыс опытной группы соответствовал средней и тяжелой форме гипергомоцистеинемии у человека (табл. 1), что согласуется с литературными данными [1]. Нагрузка метионином вызывала дисбаланс низкомолекулярных серосодержащих соединений и родственных им свободных аминокислот как в плазме крови, так и в печени крыс. В плазме крови

крыс наблюдалось значимое повышение уровней Met, HpTau и Tau. Концентрация Mat1a в плазме крови контрольной группы составила $20,81 \pm 1,07$ против $19,99 \pm 0,27$ пг/мл в опыте и существенно не изменялась, т.е., по-видимому, катализируемая реакция не являлась лимитирующей в дальнейших превращениях метионина. Первая реакция транссульфурирование, очевидно, не нарушена, что подтверждается неизменным уровнем продуктов транссульфурирования гомоцистеина – Ctn, Cys, и статистически достоверным снижением уровня Ser в плазме (табл. 1).

Таблица 1. Уровни серосодержащих аминокислот и родственных им соединений в плазме крови крыс после метиониновой нагрузки

Концентрация (мкМ)	Контроль (n=9)	Метионин (n=8)
Cys	42,67 [34,82; 44,71]	55,28 [28,30; 59,94]
Hcy	9,48 [8,05; 10,80]	36,28 [32,29; 226,60]*
CysGly	1,15 \pm 0,099	1,09 \pm 0,257
γ GluCys	4,41 \pm 0,395	5,27 \pm 0,512
GSH	27,65 \pm 1,513	33,39 \pm 1,799
CA	0,90 [0,58; 0,98]	0,62 [0,54; 0,73]
CSA	0,17 \pm 0,027	0,18 \pm 0,031
HCA	0,16 [0,14; 0,20]	0,27 [0,23; 0,29]
Ser	172,60 \pm 3,598	102,29 \pm 6,260*
Gly	169,04 \pm 6,188	101,66 \pm 8,079*
HpTau	1,12 \pm 0,300	5,80 \pm 0,799*
Tau	118,54 \pm 8,297	228,16 \pm 11,680*
Met	32,79 [31,75; 36,20]	50,80 [36,83; 139,67]*
Ctn	1,62 \pm 0,252	1,97 \pm 0,497

Примечание: * – статистически достоверные изменения по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Уровень HpTau в плазме крови повысился в 5,2 раза, но при этом наблюдалось повышение уровня Tau только в 1,9 раза. Лимитирующей реакцией синтеза Tau является, таким образом, декарбоксилирование CA. В печени крыс после длительной нагрузки метионином наблюдалось повышение уровня Ctn и снижение уровня Ser (табл. 2).

Таблица 2. Уровни серосодержащих аминокислот и родственных им соединений в печени крыс после метиониновой нагрузки

Концентрация (нмоль/г)	Контроль (n=9)	Метионин (n=8)
CA	2,09 \pm 0,134	2,22 \pm 0,093
CSA	1,87 \pm 0,209	2,80 \pm 0,347*
HCA	37,12 \pm 2,744	86,97 \pm 7,267*
Ser	1280,87 \pm 112,885	307,53 \pm 42,805*
Gly	4000,75 \pm 256,618	1688,60 \pm 265,201*
HpTau	69,51 [25,67; 143,67]	840,14 [543,36; 3080,84]*
Tau	1216,55 \pm 79,536	2015,70 \pm 248,057
Met	54,61 \pm 2,672	44,87 \pm 4,072
Ctn	8,94 \pm 2,107	47,79 \pm 11,119*
Cys	286,71 \pm 54,697	246,41 \pm 19,355
Hcy	1,03 [0,84; 1,49]	4,34 [2,75; 15,62]*
CysGly	82,02 \pm 8,509	88,80 \pm 6,131
γ GluCys	28,79 \pm 4,100	40,81 \pm 3,825
GSH	1715,37 \pm 152,077	3019,93 \pm 277,515*

Примечание: * – статистически достоверные изменения по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Эти сведения позволяют предположить, что нарушение процесса транссульфурирования происходит на этапе второй реакции, которую осуществляет цистатионин- γ -лиаза (CSE). Как известно, данный фермент экспрессируется в гепатоцитах и звездчатых клетках печени, однако, его экспрессия в печени и плазме крови при экспериментальном циррозе снижается [4,10]. Наряду с этим имеются данные, которые показывают, что высокое содержание Hcy и α -кетобутирата снижает активность CSE в печени [9], а одного только транссульфурирования недостаточно для удаления этого токсичного метаболита. На фоне снижения уровня Ser наблюдалось снижение уровня Gly не только в плазме, печени, но и в головном мозге крыс [3]. В своем исследовании S.

Fukada отметил, что гипергомоцистеинемия, вызванная добавлением Met в питьевую воду, либо внутрибрюшинной инъекцией Met, может корректироваться добавлением Gly и Ser, а высокий уровень Met в печени также снижается при использовании этих аминокислот, но эффект от Ser значительно выше, чем от Gly. Ser и Gly – источники одноуглеродных групп и, в конечном счете, 5-метилтетрагидрофолата, а последний является поставщиком метильных групп для превращения Hcy в Met. Однако показано, что дополнительное введение Met в пищу крысам вызывает снижение активности метионинсинтазы и повышение – метионинаденозилтрансферазы, бетаингомоцистеин-метилтрансферазы, цистатионин-β-синтазы в печени [5]. Следовательно, причиной низкого уровня Gly может быть его расходование на синтез Ser, и поэтому первая реакция транссульфурирования в печени преобладает над реметилированием в условиях длительной метиониновой нагрузки.

Повышение уровней Hcy и продукта его окисления HCA в печени крыс может являться причиной окислительного стресса, в пользу чего может свидетельствовать повышение уровня общего GSH. Нами показано, что на фоне гипергомоцистеинемии в печени крыс возникают локальные структурные изменения микроциркуляторного русла, фиброгенез, дистрофические изменения в гепатоцитах, которые затрагивают в основном ядерный аппарат и митохондрии [2].

В печени, как и в плазме крови крыс, отмечалось повышение уровня HpTau, однако изменения были более выражены в печени (в 12,1 раза), чем в плазме (в 5,2 раза). Отмечалась тенденция к повышению уровня Tau, однако при этом уровень CSA увеличился 1,5 раза. Причиной такого явления, вероятно, является снижение активности гипотауриндегидрогеназы и цистеинсульфинатдекарбоксилазы. Лимитирующим скорость синтеза Tau в печени крыс после нагрузки метионином являлся путь декарбоксилирования SA.

При анализе корреляций между показателями плазмы крови и печени крыс были выявлены положительные связи между уровнями Hcy плазмы с уровнями Ctn и HpTau печени ($R=0,76$ и $0,74$ соответственно), Met плазмы с уровнями Ctn, HpTau и Tau печени ($R=0,88$; $0,81$ и $0,76$) и отрицательные связи между уровнями Hcy плазмы с уровнями Ser и Gly печени ($R= -0,93$ и $-0,95$), Met плазмы с уровнями Ser и Gly печени ($R= -0,74$ и $-0,76$) в опытной группе, в контрольной же группе эти связи отсутствовали. Интересно, что значимая корреляционная связь между уровнем Hcy плазмы и его уровнем в печени как в контрольной, так и в опытной группе крыс отсутствовала.

Выводы

1. Длительная метиониновая нагрузка вызывает снижение содержания Ser и Gly в плазме крови и печени крыс, а также повышение уровней Hcy, HCA, Ctn, CSA, HpTau и GSH в печени, Met, Hcy, HpTau и Tau в плазме крови крыс.
2. Повышение уровня Hcy в печени, вероятно, не связано с повышением его уровня в плазме крови контрольной и опытной групп крыс. Кровь, возможно, не является источником Hcy печени, по крайней мере, после длительной метиониновой нагрузки.
3. Синтез Tau как в печени, так и в плазме, преимущественно, осуществляется по пути декарбоксилирования цистеиновой кислоты.

Литература (references)

1. Медведев Д.В., Звягина Д.В., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2014. – №4. – С. 42-46. [Medvedev D.V., Zvyagina D.V., Fomina M.A. *Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik im. akademika I.P. Pavlova*. I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald. – 2014. – N4. – P. 42-46. (in Russian)]
2. Новгородская Я.И., Кравчук Р.И., Островская О.Б., Курбат М.Н. Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – Т.3, №1. – С. 93-98. [Novogrodskaya Ya.I., Kravchuk R.I., Ostrovskaya O.B., Kurbat M.N. *Gepatologiya i gastroenterologiya*. Hepatology and Gastroenterology– 2019. – V.3, N1. – P. 93-98. (in Russian)]
3. Finkelstein J.D., Martin J.J. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess // Journal of Biological Chemistry. – 1986. – V.261, N4. – P. 1582-1587.

4. Fiorucci S. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis // *Hepatology*. – 2005. – V.42, N3. – P. 539-548.
5. Fukada S., Shimada Y., Morita T., Sugiyama K. Suppression of methionine-induced hyperhomocysteinemia by glycine and serine in rats // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2006. – V.70, N10. – P. 2403-2409.
6. Ganu R.S. Molecular characterization and analysis of the porcine betaine homocysteine methyltransferase-2 genes // *Gene*. – 2011. – V.473, N2. – P.133-138.
7. Huang Z.Z. Changes in methionine adenosyltransferase during liver regeneration in the rat // *American Journal of Physiology*. – 1998. – V.275, N1. – P. G14-G21.
8. Ji C. Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in Hepg2 cells and primary mouse hepatocytes // *Hepatology*. – 2007. – V.46, N5. – P. 1586-1596.
9. Look M.P. Is the increase in serum cystathionine levels in patients with liver cirrhosis a consequence of impaired homocysteine transsulfuration at the level of gamma-cystathionase? // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 2000. – V.35, N8. – P. 866-872.
10. Yao K. Effects of several unusual sulfur-containing amino acids on rat liver cystathionine-gamma-lyase // *Physiological chemistry and physics*. – 1975. – V.7, N5. – P. 401-408.

Информация об авторах

Новгородская Яна Иосифовна – аспирант, младший научный сотрудник НИЛ УО «Гродненский государственный медицинский университет». E-mail: yananovogrodskaya@mail.ru

Дорошенко Евгений Михайлович – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ УО «Гродненский государственный медицинский университет». E-mail: dgi03@mail.ru

Курбат Михаил Николаевич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий НИЛ УО «Гродненский государственный медицинский университет». E-mail: vwmisha@mail.ru