

А.В. Иванов¹, А.А. Московцев^{1,2}, Е.А. Мартынова¹, Г.Д. Савина², Б.П. Лузянин¹, А.А. Кубатиев¹

Общие аминотиолы плазмы крови крыс при внутрибрюшинном и подкожном введении гомоцистеина

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8

² Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последиplomного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123836, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

В настоящей работе показаны изменения общего содержания основных аминотиолов плазмы крови (цистеина, глутатиона, цистеинилглицина и гомоцистеина) крыс при моделировании гипергомоцистеинемии путем ежедневного внутрибрюшинного (0,6 мкмоль/г массы тела) и подкожного (0,12 мкмоль/г массы тела) введения гомоцистеина. За две недели внутрибрюшинного введения наблюдался значительный рост содержания цистеина (с ~40 до 180 мкМ) и повышение уровня глутатиона (с 10–15 до 30 мкМ) и цистеинилглицина (с 1,5 до 4,5 мкМ), а также падение уровня гомоцистеина с 300 до 200–250 мкМ на 2-й неделе эксперимента. Изменения содержания общих аминотиолов при подкожном введении носили подобный характер, но были менее выражены. В данном случае наблюдался стабильный уровень гомоцистеина (~70 мкМ) и повышение цистеина до 60 мкМ на 2-й неделе. Эти данные отражают дозозависимые процессы адаптации организма к условиям гипергомоцистеинемии, заключающиеся в способности к усиленному метаболизму гомоцистеина, сохраняя низкий, но коррелирующий со степенью и длительностью гипергомоцистеинемии, уровень глутатиона.

Ключевые слова: аминотиолы, гомоцистеин, цистеин, цистеинилглицин, глутатион, ДТНБ, ВЭЖХ, гомоцистеинемия

A.V. Ivanov¹, A.A. Moskovtsev^{1,2}, E.A. Martynova¹, G.D. Savina², B.P. Luzyanin¹, A.A. Kubatiev¹

Total aminothiols of rat plasma under intraperitoneal and subcutaneous introduction of Homocysteine

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

² Russian medical academy of postdegree education, 2/1, Barrikadnaya st., 123836, Moscow, Russia

In the presented work a variation of total aminothiols (cysteine, glutathione, cysteinylglycine and homocysteine) in blood plasma have been shown at modelling hyperhomocysteinemia by daily intraperitoneal (0.6 mkmol/g body weight) and subcutaneous (0.12 mkmol/g body weight) introduction of homocysteine. During two weeks of the intraperitoneal introduction a significant concentration growth (from ~40 to 180 mkM) of cysteine was observed. We also observed a moderate change of concentration levels for glutathione (from 10–15 to 30 mkM) and cysteinylglycine (from 1,5 to 4,5 mkM). The homocysteine level has decreased from 300 to 200–250 mkM at second week of experiments. Experimental results with subcutaneous introduction were similar. In this case a stable homocysteine level (~70 mkM) and increase of cysteine level (to 60 mkM) was observed at second week. These data reflect dose-depended processes of organism adaptation to hyperhomocysteinemia, i.e. reinforced capability for homocysteine metabolism and at the same time retention low glutathione level which correlates with hyperhomocysteinemia degree and duration.

Key words: aminothiols, homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, DTNB, HPLC, hyperhomocysteinemia

Состояние гипергомоцистеинемии (ГГЦ), т.е. повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови, является независимым фактором риска осложнений многих сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Для экспериментального моделирования ГГЦ у животных применяются различные подходы [6, 10, 14], которые можно разбить

на две группы: метионин- и гомоцистеинопосредованные ГГЦ в зависимости от того, какую аминокислоту вводят животному или включают в его рацион. Метионин является предшественником гомоцистеина (Гцис) и в процессе своего превращения отдает метильную группу в ходе реакций так называемого метионинового цикла [5]. Поэтому метаболические эффекты при введении метионина и Гцис наряду с общими чертами несут в себе и отличия [12]. Также немаловажную роль играют

Для корреспонденции: Иванов Александр Владимирович, науч. сотр. лаб. функциональной протеомики и метабомики ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: ivanov_av82@mail.ru

генетические и возрастные метаболические особенности животного [1]. Показано, что на метиониновой диете у молодых крыс, в отличие от взрослых, не возникает ГГЦ и не наблюдается гипометилирования ДНК [13]. В данной работе мы индуцировали ГГЦ путем внутрибрюшного и подкожного введения Гцис молодым крысам (7 недель в начале эксперимента). Определение концентрации общего аминокислотного профиля плазмы крови проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием, используя химическую дериватизацию дитиобиснитробензойной кислотой (ДТНБ) [9].

Цель работы — изучение изменений аминокислотного профиля плазмы крови при экспериментальной гипергомоцистенемии.

Методика

Оборудование. Хроматограф Perkin Elmer series 200 (двухканальный градиентный насос, дегазатор, термостат колонок, петлевой инжектор 100 мкл, УФ-детектор и АЦП NCI 900), центрифуга Elmi CM-50, вакуумный концентратор Eppendorf Concentrator plus, термошейкер Eppendorf Thermomixer compact, деионизатор воды Millipore Simplicity 185 с картрижем Simprakor 1.

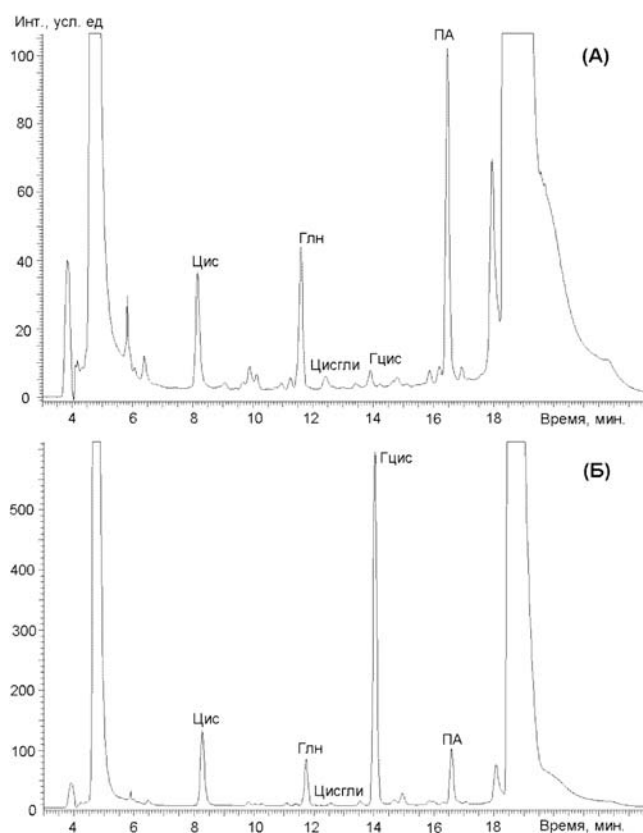


Рис. 1. Хроматограммы: А — образец плазмы крови интактной крысы; Б — после внутрибрюшного введения Гцис

Реактивы. Ацетонитрил Криохром сорт 0; муравьиная кислота (Fluka) для ВЭЖХ-МС; ДТНБ (Sigma); этанол-ректификат 96,3%; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 98—100,5% (Panreac); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 98—101% (Panreac); D-пеницилламин (ПА) от Sigma; DL-Дитиотреитол >99,5% (ДТТ) от Fluka; L-цистеин 97% (Цис) от Aldrich, цистеинилглицин >85% (Цисгли) от Sigma; глутатион 99% (Глн) от Sigma-Aldrich; DL-гомоцистеин >95% (Sigma); трифторуксусная кислота 99% (ТФУ) от Sigma-Aldrich.

Работа с животными. Самцы крыс линии Вистар возрастом 7 нед. Все крысы были распределены на 3 экспериментальные группы по 5 животных в каждой. В 1-й группе крыс гомотиостеин вводили внутрибрюшинно, во 2-й — подкожно, из расчета 0,6 и 0,12 мкмоль гомотиостеина на 1 г массы тела соответственно, один раз в день. Животным контрольных групп вводили соответствующий объем физиологического раствора.

Раствор D,L-гомотиостеина для инъекций готовили на стерильном физиологическом растворе. Длительность введения гомотиостеина определялась кинетикой развития ответа на стресс, ранее уточненной в ходе предварительно проведенных экспериментов, в которых было установлено, что пик острого ответа приходился на 4-е — 5-е сут. На 4-е, 9-е и 14-е сут. эксперимента через 1 ч после введения раствора Гцис часть крыс декапитировали гильотиной согласно требованиям международных правил работы с животными, взята кровь, которую центрифугировали на скорости 200 г в течение 10 мин.

Пробоподготовка. Кровь крысы центрифугировали при 3000 г 3 мин и отбирали плазму крови. К 200 мкл плазмы добавляли по 40 мкл 0,25 мМ ПА (внутренний стандарт); 100 мМ ДТТ; воды/калибровочного раствора и 80 мкл 0,2 М Na-фосфатного буфера с pH 7,4. Смесь инкубировали 10 мин при 60°C. Затем добавляли 400 мкл EtOH и 400 мкл 50 мМ ДТНБ в EtOH, инкубировали 10 мин при 24°C, после 30 мин при 4°C и центрифугировали 10 мин при 15000 г. Супернатант (400 мкл) отбирали и испаряли досуха под вакуумом ~3 ч при 60°C. Высушенный образец растворяли в воде (334 мкл) и центрифугировали 15 с при 10000 г для осаждения нерастворимого остатка.

ВЭЖХ. Для разделения компонентов использовали две, соединенные последовательно колонки (Agilent Eclipse XDB-C18 150 мм*4,6 мм /5 мкм и Agilent Hypersil BDS-C18 150 мм*4,6 мм /5 мкм). Температуру колонок поддерживали на уровне 35°C, а элюентов на уровне 24°C. Объем инъекции составлял 100 мкл (полное заполнение петли инжектора).

Поток — 0,75 мл/мин. Элюент А: 0,04% ТФУ в 0,2 М Na-фосфатном буфере рН 6,6; Элюент Б: ацетонитрил. Элюция происходила при прямом градиенте Б от 3,5 до 10% за 12 мин, промывка колонок 2,5 мин 60% Б, после линейное снижение Б от 60 до 3,5% за 1 мин и регенерация колонок 12 мин 3,5% Б. Сигнал определяли по поглощению при 330 нм.

Обработка данных. Первичную обработку (интегрирование хроматографических пиков) осуществляли в TotalChrom v.6.2, построение калибровочных графиков в Microsoft Excel 1997. Для определения концентрации аминоктиолов использовали соотношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта. Калибровку сигнала проводили путем анализа образцов плазмы с добавлением известного количества аналитов и регрессионного анализа.

Результаты и обсуждение

Временные рамки эксперимента были обусловлены ранее полученными собственными данными о быстроте ответа на стресс в виде экспрессии белков теплового шока в печени, согласно которым, пик острого ответа приходился на 4—5-е сут.

На рис. 1 приведены примеры хроматограмм плазмы крови после обработки ДТНБ. Время выхода производного Цис составляло 8,1 мин, Глн — 11,6 мин, Цисгли — 12,5 мин, Гцис — 13,9 мин, ПА — 16,5 мин. У группы интактных животных наблюдались следующие показатели: Цис — 18—40 мкМ, Гцис — 1,1—2,4 мкМ, Глн — 12—18 мкМ, Цисгли — 2—2,8 мкМ. При этом в ходе эксперимента наблюдалась тенденция к увеличению содержания аналитов в плазме крови.

При внутрибрюшинном введении Гцис наблюдается значительное возрастание концентрации общего цистеина до 140—180 мкМ (рис. 2А), при этом эффект наиболее выражен на 9-е и 14-е сут. введения Гцис. При подкожном введении также наблюдается повышение уровня общего Цис, но в меньшей степени (~70 мкМ на 14-е сут. введения). При введении Гцис как подкожно, так и внутрибрюшинно концентрация его в плазме крови существенно возрастает до 30—40 и 200—300 мкМ соответственно (рис. 2Б). При этом в последнем случае наблюдается временное снижение уровня Гцис. Эти данные указывают на то, что в организме животных происходит активация

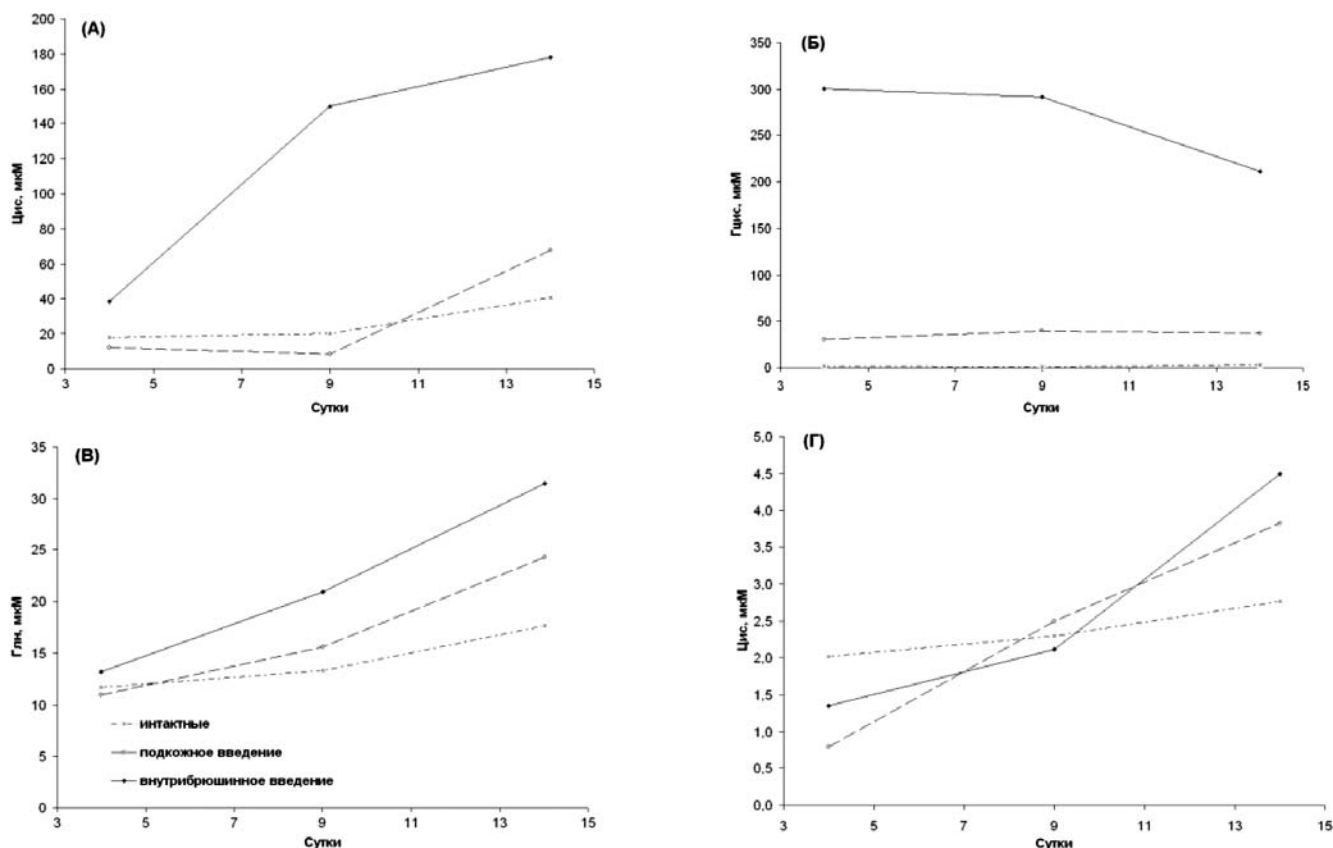


Рис. 2. Аминоктиолы плазмы крови при внутрибрюшинном и подкожном введении Гцис: А — цистеин; Б — гомоцистеин; В — глутатион; Г — цистеинилглицин

адаптационных механизмов регуляции метаболизма Гцис, направленных на снижение его содержания. Существует несколько путей утилизации Гцис внутри клетки: реметилование до метионина с помощью метионинсинтазы или бетаин-гомоцистеин метилтрансферазы (в печени), а также деметилование по цистатион- β -синтазному пути, приводящее к образованию Цис. К_M этих ферментов распределены таким образом, что в нормальных условиях преобладает реметилование, а при повышении внутриклеточной концентрации деметилование [7]. Также в утилизации Гцис у крыс играет роль почечная экскреция [8], однако оценить её вклад в данном дизайне эксперимента не представлялось возможным. Таким образом, эффект снижения концентрации Гцис при одновременном возрастании общего Цис, по всей видимости, обусловлен работой цистатион- β -синтазного пути, при этом основная активность наблюдается в печени [7].

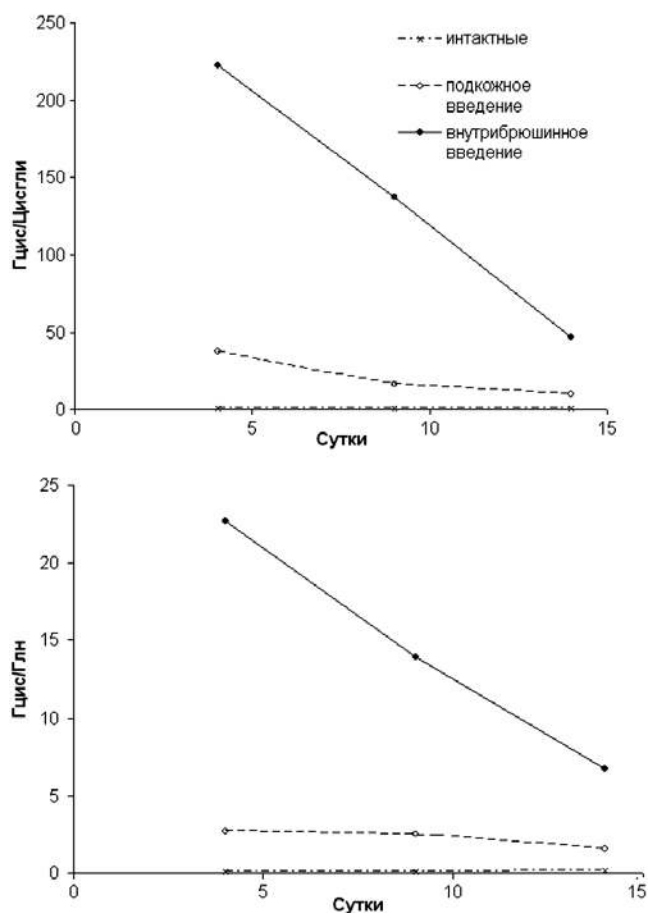


Рис. 3. Изменения соотношений гомоцистеина к цистеинилглицину и глутатиону при моделировании ГГЦ

Изменения общего Глн (рис. 2В) и Цисгли (рис. 2Г) имеют менее выраженный характер, однако за 14 сут. эксперимента наблюдалась увеличение концентрации этих метаболитов на 35—80% по сравнению с интактными животными. Интересно отметить, что соотношение Гцис/Глн и Гцис/Цисгли при внутрибрюшинном введении имело характер линейного снижения (рис. 3). Поскольку Цис является лимитирующим звеном в синтезе Глн, увеличение концентрации аминокислоты должно приводить к соответствующему повышению продукта его синтеза. Однако, наблюдаемый эффект роста метаболитов Цис значительно меньше, что можно объяснить множеством звеньев регуляции содержания Глн, поддерживающих его гомеостаз. Основным местом синтеза Глн является печень, на неё же падает основная нагрузка по деметилованию Гцис. Лимитирующим звеном тут является внутриклеточная концентрация Цис, активность глутамил-цистеин лигазы, которую ингибирует глутатион как конкурент глутамин. Уровень Глн в плазме также определяется активностями внеклеточных ферментов — γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) и цистеинилглицин дипептидазы. ГГТ служит для глутаминирования аминокислот (в том числе Цис) что является одним из путей их внутриклеточного транспорта. Конечным продуктом распада Глн является Цис, т.е. лимитирующее звено его внутриклеточного синтеза. Таким образом, Цис через отрицательную обратную связь является регулятором своего внутриклеточного захвата и его накопление в условиях гомоцистеинемии должно было вызывать возрастание уровня Цисгли и Глн в плазме. Однако на синтез Глн влияет и транспорт Цис через ASC-систему [11], которая в условиях тяжелой гипергомоцистеинемии может работать преимущественно на выброс Цис из клетки. В плазме крови Цис находится преимущественно в окисленном состоянии, связываясь с белками, образуя цистин и смешанные дисульфиды. Цистин транспортируется в клетки посредством Xc⁻ [11] системы, при этом обмениваясь на глутамат [3], который также необходим для синтеза Глн. Разница в концентрациях глутамата внутри и вне клетки является движущей силой этого процесса, поэтому при повышении плазменного глутамата (а также гомоцистеиновой кислоты) захват цистина ингибируется и синтез Глн снижается [4]. Таким образом, можно предположить, что гомеостаз Глн в данном случае обеспечивается регуляцией транспорта Цис между клетками и внеклеточной средой.

Полученные результаты указывают на адаптационные возможности организма утилизировать Гцис в условиях искусственно поддерживаемой гомоцистеинемии, сохраняя при этом уровень глутатиона на низком, но коррелирующем с дозой и длительностью введения Гцис, уровне.

Список литературы

1. **Пшенникова М.Г.** Устойчивость к повреждающим воздействиям и защитные эффекты адаптации у животных разных генетических линий // Патогенез. — 2012. — 10(1). — С. 20—26.
2. **Родионов Р.Н., Ленц С.Р.** Современные представления о гипергомоцистеинемии как факторе риска сердечно-сосудистых заболеваний // Артериальная гипертензия. — 2008. — 14(1). — С. 110—115.
3. **Bannai S.** Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts // J. Biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 2256—2263.
4. **Bannai S., Takada A., Kasuga H., Tateishi N.** Induction of cystine transport activity in isolated rat hepatocytes by sulfobromophthalein and other electrophilic agents // Hepatology. — 1986. — 6. — P. 1361—1368.
5. **Bjorke Monsen A.L., Ueland P.M.** Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence // Am. J. Clin. Nutr. — 2003. — Vol. 78. — P. 7—21.
6. **Chen C., Surowiec S.M., Morsy A.H., Ma M.** Intraperitoneal infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries // Atherosclerosis. — 2002. — Vol. 160(1). — P. 103—114.
7. **Finkelstein J.D.** Methionine metabolism in mammals // J. Nutr. Biochem. — 1990. — 1. — P. 228—237.
8. **Friedman A.N., Bostom A.G., Selhub J.** et al. The kidney and homocysteine metabolism // J. Am. Soc. Nephrol. — 2001. — 12. — P. 2181—2189.
9. **Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W.** Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. — 2001. — Vol. 758(2). — P. 207—212.
10. **Korokin M.V., Pokrovskiy M.V., Novikov O.O.** et al. A model of hyperhomocysteine-induced endothelial dysfunction in rats // Bull. Exp. Biol. Med. — 2011. — Vol. 152(2). — P. 213—215.
11. **Lu S.C.** Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies // FASEB J. — 1999. — Vol. 13(10). — P. 1169—1183.
12. **Pexa A., Boeger R.H., Henle T.** et al. Effects of moderate hyperhomocysteinaemia induced by 4 weeks methionine-enriched diet on metabolite profile and mesenteric artery function in rats // Br. J. Nutr. — 2008. — Vol. 99(5). — P. 993—999.
13. **Pogribny I.P., Prizimirska T.V., Kulik G.I.** et al. Age-related effects of methionine-enriched diet on plasma homocysteine concentration and methylation of hepatic DNA in rats // Ukr. Biokhim. Zh. — 2005. — Vol. 77(4). — P. 114—119.
14. **Robin S., Courderot-Masuyer C., Nicod L.** et al. Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats // J. Nutr. Biochem. — 2004. — Vol. 15(2). — P. 80—89.

Поступила 10.06.13

Сведения об авторах:

Мартынова Елена Александровна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ

Савина Галина Дмитриевна

Лузянин Борис Петрович, д-р хим. наук, проф., зав. лаб. функциональной протеомики и метаболомики ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Аслан Амирханович Кубатиев, акад. РАМН, проф., директор ФГБУ «НИИОПП» РАМН, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ