

©Звягина, Бельских

КАРНИТИНА ХЛОРИД СНИЖАЕТ СТЕПЕНЬ ВЫРАЖЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ И СПОСОБСТВУЕТ УТИЛИЗАЦИИ ЛАКТАТА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИЕЙ ЭПИДИДИМИСА КРЫС

В.И. Звягина, Э.С. Бельских*

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 9; *эл почта: vizvyagina@yandex.ru

Гипергомоцистеинемия — фактор риска многих заболеваний, в том числе нарушений репродуктивной функции у мужчин. L-карнитин используется в медицинской практике с целью коррекции нарушенных биоэнергетических состояний; установлены его эффекты, связанные с улучшением показателей сперматозоидов у пациентов с идиопатическими формами бесплодия. Однако влияние экзогенного L-карнитина на уровень гомоцистеина в тканях половых желез как фактора риска нарушения фертильности до настоящего времени остаётся практически не исследованным. Целью нашей работы было изучение активности ферментов биоэнергетики митохондрий придатка яичка, динамики изменения цитоплазматического и митохондриального уровня лактата и активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), содержания общего карнитина, а также оксидативного статуса этих клеток в условиях окислительного стресса, вызванного гипергомоцистеинемией, и оценка влияния карнитина хлорида на эти показатели на фоне введения метионина самцам крыс линии Wistar. При введении метионина животным в течение трёх недель в дозе 3 г/кг развивалась тяжёлая форма гипергомоцистеинемии с концентрацией гомоцистеина сыворотки крови более 100 мкмоль/л. При этом было обнаружено снижение активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки: тканевом дыхании (сукцинатдегидрогеназы, СОД) и окислительном фосфорилировании (H^+ -АТФазы) в головке и хвосте эпидидимиса. Изменение метаболизма лактата выражалось в повышении его уровня как в митохондриальной, так и в цитоплазматической фракциях головки и митохондриальной фракции хвоста эпидидимиса при одновременном статистически значимом снижении активности ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях головки эпидидимиса. У самцов крыс с тяжёлой гипергомоцистеинемией отмечалось увеличение активности митохондриальной СОД и усиление карбонилирования митохондриальных белков в головке и хвосте придатка яичка. Моделирование гипергомоцистеинемии на фоне назначения карнитина хлорида приводило к различной реакции клеток исследуемых тканей гомогената головки и хвоста эпидидимиса. В головке эпидидимиса карнитина хлорид способствовал повышению концентрации лактата в митохондриальной фракции и снижению концентрации лактата в цитоплазматической фракции, а также повышению активности ЛДГ, ассоциированной с митохондриальной фракцией. Эти изменения сопровождалось повышением активности H^+ -АТФазы в головке придатка яичка, что свидетельствовало о стимуляции карнитина хлоридом транспорта лактата внутрь митохондрий и использовании его как энергетического субстрата в условиях окислительного стресса, вызванного гипергомоцистеинемией. В тканях хвоста отмечались изменения, которые носили защитный характер и были связаны с уменьшением образования окислительно-модифицированных белков.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия; карнитин; лактат; эпидидимис; окислительный стресс; митохондрии

DOI: 10.18097/PBMC20216704338

ВВЕДЕНИЕ

Метионин является важной незаменимой аминокислотой в организме человека, для её метаболизма требуется наличие витаминов: пиридоксина, фолиевой кислоты, кобаламинов и витаминоподобного вещества — холина. Нарушения обмена этой аминокислоты приводят к тяжёлым последствиям, которые во многом связаны с накоплением в организме гомоцистеина. Гомоцистеин в высоких концентрациях может оказывать прямое или опосредованное повреждающее действие на клетки. Механизмы этого действия разнообразны, но в основном они связаны со способностью гомоцистеина спонтанно окисляться кислородом в присутствии ионов металлов переменной валентности и вызывать развитие окислительного стресса [1].

До настоящего времени исследователями отмечается, что патогенез окислительного стресса, связанного с мужским бесплодием, изучен недостаточно, хотя сама проблема мужского бесплодия является глобальной, наиболее актуальной для стран Центральной и Восточной Европы, где затрагивает до 12% мужчин от всей популяции [2-4]. По результатам статистических исследований, в 30-40% мужского бесплодия не удаётся выявить истинную причину, что затрудняет подбор оптимальной терапии [2, 3, 5]. Поэтому большой интерес вызывает новая потенциальная терапевтическая мишень для терапии нарушений фертильности — уровень гомоцистеина. По данным Aitken и соавт. [5], концентрация гомоцистеина была значительно повышена в сперме пациентов с диагностированным бесплодием. При этом у пациентов в семенной плазме

отсутствовал дефицит фолатов, который является одним из значимых факторов для повышения уровня гомоцистеина в тканях, а спермограммы в 18 из 20 случаев были нормозооспермическими в соответствии с критериями ВОЗ 2010 года [5]. Гиперпродукция гомоцистеина сопровождалась увеличением маркеров окислительного стресса, в том числе повышением уровня образования активных форм кислорода (АФК) митохондриями сперматозоидов [5].

Вместе с тем, установленная патогенетическая взаимосвязь нарушений фертильности и окислительного стресса, определяющегося как в сперматозоидах, так и в тканях репродуктивных желез, позволяет рассматривать назначение антиоксидантов как одно из возможных терапевтических направлений [3, 4]. Однако результаты исследований, посвящённых применению антиоксидантов в лечении бесплодия, не всегда демонстрируют клиническую эффективность. Вероятно, это обусловлено различными механизмами, приводящими к состоянию окислительного дистресса и потребностью в более специфичном назначении антиоксидантов. В этой связи исследователями отмечается необходимость в проведении дополнительных исследований, которые смогут уточнить показания для назначения тех или иных видов антиоксидантов [3, 4].

Ранее нами было продемонстрировано, что моделируемая гипергомоцистеинемия (ГГЦ) приводит к значительному снижению концентрации внутриклеточного L-карнитина в кардиомиоцитах крыс, а назначение карнитина хлорида способно снижать выраженность ГГЦ [6]. Несмотря на то, что L-карнитин до настоящего времени активно исследуется как антиоксидант, способный связывать АФК и защищать клетки от окислительного стресса, тем самым способствуя улучшению качества сперматозоидов, механизмы его биологических эффектов остаются не до конца изученными [3, 7].

Хорошо известна роль L-карнитина как кофактора карнитин-пальмитоил трансфераз (КПТ I и II), необходимого для получения энергии сперматозоидами от β -окисления жирных кислот [7, 8]. Кроме того, L-карнитин играет ключевую роль в созревании сперматозоидов в мужском репродуктивном тракте. Инициация подвижности сперматозоидов происходит параллельно с увеличением концентрации L-карнитина в просвете эпидидимиса, при этом эпидидимальная плазма содержит самые высокие уровни L-карнитина по сравнению с другими тканями организма человека [8].

Важно отметить, что для созревания сперматозоидов большую роль играет обеспечение энергетических потребностей не только за счёт β -окисления жирных кислот, но и путём гликолиза [8]. В настоящее время установлено, что в присутствии кислорода конечным продуктом гликолиза являются пируват и молочная кислота. Ранее считалось, что лактат в основном вырабатывается как конечный продукт анаэробного гликолитического метаболизма, который экспортируется из тканей и используется

лишь в печени для глюконеогенеза. Однако относительно недавно было продемонстрировано, что достаточно низкий процент (около 25%) лактата метаболизируется через глюконеогенез, значительное же его количество используется в качестве энергетического субстрата для производства пирувата и потребления митохондриями различных типов клеток [9, 10].

Лактат транспортируется через клеточные мембраны с помощью монокарбоксилатных транспортеров (MCTs), его превращение в пируват осуществляется ферментом лактатдегидрогеназой (ЛДГ), при этом для сперматозоидов характерна специфическая изоформа ЛДГ-C4. Реакция сопровождается восстановлением NAD; это приводит к изменению окислительно-восстановительного статуса клеток и изменению уровня генерации АФК [9, 11]. Хорошо известно, что в умеренных количествах АФК выполняют регуляторную функцию, в то время как избыточное образование АФК повреждает структуры клетки и фактически считается причиной многих патологических состояний [12]. Изменение концентрации лактата в клеточных компартментах является одной из форм физиологического сигналинга клеток [10]. Изменение концентрации лактата способно приводить к изменению редокс-статуса, продукции АФК, влиять на уровень цитоплазматического кальция и ряд других факторов, что может быть задействовано в многочисленных адаптивных реакциях, итогом которых становится интенсификация процессов митохондриального биогенеза и митохондриального окисления лактата, направленных на поддержание адекватного уровня продукции АТФ [10].

Таким образом, исследование процессов митохондриального окисления лактата клетками тканей эпидидимиса в условиях моделирования ГГЦ может дополнить представления об адаптивных механизмах репродуктивной системы, а изучение влияния карнитина хлорида на уровень гомоцистеина и процессы митохондриальной биоэнергетики позволит оценить потребность в назначении карнитина при нарушениях фертильности связанных с ГГЦ. В связи с этим целью нашей работы было изучение динамики изменения цитоплазматического и митохондриального уровня лактата и активности ЛДГ, ферментов биоэнергетики митохондрий придатка яичка, а также окислительного статуса этих клеток в условиях окислительного стресса, вызванного ГГЦ, а также оценка влияния карнитина хлорида на эти показатели на фоне введения метионина.

МЕТОДИКА

Исследование проведено на 41 крысах-самцах линии Wistar. Крыс содержали в условиях вивария, для кормления животных использовали корм "Чара" ("Ассортимент-Агро", Россия), содержащий 0,7% метионина-цистина в пересчёте на сухое вещество, витамины группы В, в том числе В₆ — 28 мг/кг, В₉ — 64 мг/кг, В₁₂ — 0,13 мг/кг.

Все животные были разделены на 5 групп:

Крысы первой группы (n=8) служили контролем. Они получали суспензионную основу, состоящую из воды, твина-80 (“Вектон”, Россия) и крахмала (“Вектон”), без применения метионина в течение 21 дня внутрижелудочно с помощью зонда. Поилки наполнялись обычной питьевой водой.

Крысам второй группы (n=9) (группа ГГЦ) в течение 21 дня внутрижелудочно с помощью зонда вводили 25% суспензию метионина (“Sigma-Aldrich”, США) 2 раза в сутки в дозе 1,5 г метионина на 1 кг массы тела, дополнительно вместо питьевой воды животные получали 1% водный раствор метионина при свободном доступе к питьевой воде [13]. Средний выпиваемый объем раствора метионина в сутки составил 17,2 мл (15,5 мл; 18,1 мл). Из эксперимента была исключена 1 крыса, по причине неразвившейся тяжелой формы ГГЦ (концентрация гомоцистеина в сыворотке крови составляла менее 100 мкмоль/л).

Третья группа (n=8) (группа ГГЦ + карнитина хлорид). Животным этой группы по аналогичной схеме моделировали тяжелую ГГЦ, но дополнительно ежедневно 1 раз в сутки в течение 21 дня внутрижелудочно в промежутке между приемами метионина вводили карнитина хлорид (“Российский кардиологический научно-производственный комплекс”, Россия) в дозе 300 мг/кг, разведенный 1:1 физиологическим раствором.

Четвертая группа (n=8) Животные этой группы получали ежедневно 1 раз в сутки в течение 21 дня внутрижелудочно карнитина хлорид (“Российский кардиологический научно-производственный комплекс”) в дозе 300 мг/кг, разведенный 1:1 физиологическим раствором.

Пятая группа (n=8) служила группой сравнения для группы 4. Крысам этой серии ежедневно 1 раз в сутки в течение 21 дня внутрижелудочно вводили питьевую воду в объеме, равном расчетному объему раствора карнитина хлорида.

Выведение животных из эксперимента осуществляли утром, на следующий день после последнего введения препаратов. Крыс умерщвляли под эфирным рауш-наркозом при сохраненном дыхании и сердцебиении путем обескровливания пересечением брюшной аорты. Исследования проводили в сыворотке крови, головке и хвосте эпидидимиса. Ткани гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,001 М ЭДТА и 0,02 М трис-буфер, pH 7,4 используя гомогенизатор Potter S (“Sartorius”, Германия) с зазором между пестиком и стенкой сосуда 0,16–0,24 мм. Полученный гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию: при 800 g осаждали неразрушенные клетки и ядра, далее при 14000 g — митохондрии и при 20000 g — лизосомы [14]. Митохондриальную фракцию ресуспендировали в среде выделения, не содержащей ЭДТА. Для разрушения мембран добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 0,02%. В дальнейшем исследовании использовали:

– сыворотку крови, в которой определяли концентрацию гомоцистеина;

– цитоплазматическую фракцию, лишённую лизосом для определения содержания белка, общего карнитина, молочной кислоты и активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ);

– митохондриальную фракцию, где измеряли окислительную модификацию белков (ОМБ), концентрацию лактата, общего карнитина, активность ЛДГ, СДГ, H⁺-АТФазы и супероксиддисмутазы (СОД).

Концентрацию общего гомоцистеина определяли иммуноферментным анализом с помощью коммерческого набора “Axis Shield” (Великобритания). Содержание белка в пробах измеряли по методу Лоури с помощью набора реагентов (НПЦ “Эко-сервис”, Россия), уровень лактата — лактатоксидазным методом с помощью набора “Diasys” (Германия) и активность ЛДГ — по снижению концентрации NADH в реакции восстановления пирувата с помощью коммерческого набора “Diasys”. Активность H⁺-АТФазы определяли методом Боданского по содержанию неорганического фосфата после остановки реакции [15]. Активность СДГ оценивали по реакции восстановления гексацианоферрата (III) калия [14]. Активность СОД исследовали при помощи метода, основанного на торможении реакции аутоокисления кверцетина [16].

Концентрацию карнитина в митохондриях и цитоплазме тканей эпидидимиса крыс определяли по методу Wan и Hubbard, основанному на образовании свободного KoASH, реагирующего неэнзиматически с 5,5-дитиобис-2-нитробензоатом (DTNB) с образованием окрашенного 5-тио-2-нитробензоата, интенсивность окраски которого измеряли спектрофотометрически при $\lambda=410$ нм [17].

Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали методом Levine в модификации, который основан на реакции взаимодействия иминогрупп и карбонильных групп окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с формированием 2,4-динитрофенилгидразонов, обладающих определённым спектром поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Общее количество продуктов ОМБ оценивали по суммарной площади под кривой спектра (S ОМБ, СП ОМБ). Кроме того, рассчитывали резервно-адаптационный потенциал митохондриальных белков как долю в % суммарной площади под спектром абсорбции света спонтанной ОМБ к площади ОМБ, индуцированной с помощью реакции Фентона (последняя принималась за 100%) — S ОМБ, СП/МК. Чем ниже доля продуктов спонтанного окисления, тем выше резервно-адаптационный потенциал [18].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью StatSoft Statistica 10.0. Соответствие выборок нормальному распределению проверяли посредством критерия Шапиро-Уилка. Так как распределение величин исследуемых показателей во всех выборках отличалось от нормального, результаты представляли в виде медианы [первый квартиль; третий квартиль] (Me [Q1, Q3]).

Для выявления различий между независимыми группами 1-3 использовали критерий Краскела-Уоллиса, а для последующего попарного сравнения — критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Для выявления различий между независимыми группами 4 и 5 использовали критерий Манна-Уитни. При сравнении по разным показателям одних и тех же групп животных поправка на множественные сравнения не применялась. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Назначение метионина животным по описанной выше схеме приводило к значительному повышению концентрации гомоцистеина в сыворотке крови (табл. 1) и превышало 100 мкмоль/л, что свидетельствовало о развитии у крыс тяжёлой формы ГГЦ. Кроме того, у животных, которым вводили метионин, отмечено повышение уровня молочной кислоты как в цитоплазматической, так и в митохондриальной фракциях головки, а также в митохондриях хвоста эпидидимиса (табл. 2, 3). Активность ЛДГ статистически значимо снижалась только в субклеточных фракциях головки придатка яичка. Уменьшение активности СДГ и H^+ -АТФазы в митохондриальной фракции головки и хвоста придатка яичка косвенно указывало на снижение энергопродукции. Концентрация общего карнитина при моделировании ГГЦ была значительно снижена

как в цитоплазме, так и в митохондриях головки и хвоста придатка яичка по сравнению с показателями контрольной группы.

Обнаруженные изменения активности митохондриальных ферментов и снижение концентрации общего карнитина в совокупности указывали на развитие вторичной митохондриальной дисфункции клеток тканей эпидидимиса. Это согласуется с результатами работ, демонстрирующих, что увеличение уровня цитоплазматического лактата приводит к ингибированию карнитинпальмитоилтрансферазы-1 (КПТ-1) как через активацию рецептора гидроксикарбоновой кислоты-1 (HSCAR-1), так и через снижение pH цитоплазмы, повышающей K_m КПТ-1 [19, 20].

При развившейся тяжёлой форме ГГЦ у исследуемых животных происходило значительное нарастание ОМБ как в головке, так и в хвосте эпидидимиса (в 3,8 и 4,4 раза соответственно). Введение метионина способствовало также статистически значимому снижению резервно-адаптационного потенциала только в головке эпидидимиса, что, возможно, указывало на более низкую устойчивость головки придатка яичка крысы к окислительному повреждению. У животных на фоне ГГЦ отмечено статистически значимое повышение активности СОД в головке и хвосте придатка яичка в 3,3 и 3,4 раза относительно группы животных, получивших только суспензионную основу (табл. 4, 5).

Таблица 1. Содержание общего гомоцистеина в сыворотке крови крыс

Показатели/Группы	Суспензионная основа (1)	ГГЦ (2)	ГГЦ + Карнитина хлорид (3)
Концентрация общего гомоцистеина, мкмоль/л	5,8 [5,6; 6,8]	291,7 [277,4; 334,4] ↑ ₁₋₂ в 50,3 раз ($p_{1-2}=0,001$)	72,7 [49,35; 93,98] ↓ ₂₋₃ в 4 раза ($p_{2-3}=0,001$) ↑ ₁₋₃ в 12,5 раз ($p_{1-3}=0,001$)

Таблица 2. Концентрация L-карнитина, лактата и ЛДГ в субклеточных фракциях, полученных из гомогенатов головки эпидидимиса

Показатели/Группы	Суспензионная основа (1)	ГГЦ (2)	ГГЦ + Карнитина хлорид (3)
Цитоплазма			
Концентрация белка, мг/мл	2,80 [2,43; 3,08]	3,44 [2,84; 4,18]	1,96 [1,80; 2,27]
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	23,74 [19,30; 25,74]	28,92 [27,15; 32,9] ↑ ₁₋₂ +21,82% ($p_{1-2}=0,0074$)	22,92 [21,18; 24,48] ↓ ₂₋₃ -20,75% ($p_{2-3}=0,0028$; $p_{1-3}=0,9581$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	169,90 [158,14; 182,83]	135,83 [118,95; 142,54] ↓ ₁₋₂ -20% ($p_{1-2}=0,002$)	150,66 [137,95; 157,23] ↓ ₁₋₃ -11,32% ($p_{1-3}=0,024$; $p_{2-3}=0,0831$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	147,35 [141,11; 159,44]	56,95 [43,98; 61,24] ↓ ₁₋₂ в 2,59 раз ($p_{1-2}=0,001$)	68,61 [61,82; 80,19] ↑ ₁₋₃ +20,47% ($p_{1-3}=0,001$; ($p_{2-3}=0,041$))
Митохондрии			
Концентрация белка, мг/мл	2,78 [2,54; 3,03]	1,97 [1,80; 2,19]	2,42 [2,06; 2,99]
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	11,21 [10,30; 16,55]	29,60 [25,40; 31,17] ↑ ₁₋₂ в 2,64 раз ($p_{1-2}=0,001$)	41,88 [35,09; 47,10] ↑ ₂₋₃ в 1,41 раз ($p_{2-3}=0,0054$) ↑ ₁₋₃ в 3,74 раз ($p_{1-3}=0,001$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	33,04 [25,53; 36,73]	19,19 [13,27; 25,57] ↓ ₁₋₂ в 1,72 раз ($p_{1-2}=0,0136$)	34,13 [29,99; 37,56] ↑ ₂₋₃ в 1,78 раз ($p_{2-3}=0,0039$; $p_{1-3}=0,5635$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	89,61 [86,91; 102,55]	24,89 [22,93; 26,00] ↓ ₁₋₂ в 3,6 раз ($p_{1-2}=0,001$)	32,46 [26,19; 41,53] ↓ ₁₋₃ в 2,76 раз ($p_{1-3}=0,001$; $p_{2-3}=0,1036$)

КАРНИТИН, ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ И УТИЛИЗАЦИЯ ЛАКТАТА

Таблица 3. Концентрация L-карнитинина, лактата и ЛДГ в субклеточных фракциях, полученных из гомогенатов хвоста эпидидимиса

Показатели/Группы	Суспензионная основа (1)	ГГЦ (2)	ГГЦ + Карнитина хлорид (3)
Цитоплазма			
Концентрация белка, мг/мл	2,81 [2,31; 3,15]	3,48 [2,79; 4,03]	2,01 [1,87; 2,53]
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	21,25 [16,15; 24,40]	32,69 [24,92; 36,44] ($p_{1-2}=0,041$)	23,45 [22,10; 22,14] ($p_{1-3}=0,4309$; $p_{2-3}=0,1036$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	61,85 [51,76; 71,66]	62,62 [57,76; 66,58] ($p_{1-2}=0,4948$)	53,63 [48,88; 58,82] ($p_{1-3}=0,0406$; $p_{2-3}=0,1563$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	145,65 [141,21; 180,34]	32,69 [30,41; 33,25] \downarrow_{1-2} в 4,46 раз ($p_{1-2}=0,001$)	40,62 [36,87; 45,42] \uparrow_{2-3} в 1,24 раз ($p_{2-3}=0,0014$) \downarrow_{1-3} в 3,59 раз ($p_{1-3}=0,001$)
Митохондрии			
Концентрация белка, мг/мл	4,08 [3,38; 4,66]	2,38 [2,27; 2,42]	3,61 [3,01; 3,88]
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	10,94 [8,07; 16,45]	38,15 [27,41; 43,09] \uparrow_{1-2} в 3,49 раз ($p_{1-2}=0,001$)	27,48 [19,07; 33,64] \uparrow_{1-3} в 2,51 раз ($p_{1-3}=0,0039$; $p_{2-3}=0,1563$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	21,09 [13,03; 27,48]	15,58 [12,97; 17,92] ($p_{1-2}=0,2701$)	12,53 [8,35; 20,15] ($p_{1-3}=0,1036$; $p_{2-3}=0,5635$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	85,20 [74,8; 94,13]	21,05 [20,88; 24,5] \downarrow_{1-2} в 4,05 раз ($p_{1-2}=0,001$)	28,89 [20,51; 38,47] \downarrow_{1-3} в 2,95 раз ($p_{1-3}=0,001$; $p_{2-3}=0,2271$)

Таблица 4. Уровень митохондриальных ферментов и маркеров оксидативного стресса, полученных из гомогенатов головки эпидидимиса

Показатели/Группы	Суспензионная основа (1)	ГГЦ (2)	ГГЦ + Карнитина хлорид (3)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	70,30 [32,72; 93,09]	20,78 [11,15; 24,44] \downarrow_{1-2} в 3,38 раз ($p_{1-2}=0,0054$)	20,48 [11,32; 27,95] \downarrow_{1-3} в 3,43 раз ($p_{1-3}=0,010$; $p_{2-3}=0,9581$)
Активность H^+ -АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	26,23 [21,43; 44,40]	14,77 [11,51; 18,58] \downarrow_{1-2} в 1,78 раз ($p_{1-2}=0,001$)	20,28 [17,60; 23,03] \uparrow_{2-3} в 1,37 раз ($p_{2-3}=0,001$) \downarrow_{1-2} в 1,78 раз ($p_{1-3}=0,001$)
Активность СОД, УЕ/мг белка	1,73 [1,27; 2,06]	5,65 [3,57; 7,27] \uparrow_{1-2} в 3,26 раз ($p_{1-2}=0,002$)	5,17 [4,47; 6,13] \uparrow_{1-2} в 2,99 раз ($p_{1-2}=0,001$; $p_{2-3}=0,9581$)
S ОМБ, СП ОМБ на мг белка	3,56 [3,04; 5,67]	13,52 [11,31; 16,30] \uparrow_{1-2} в 3,79 раз ($p_{1-2}=0,001$)	12,26 [9,21; 16,91] \uparrow_{1-3} в 3,44 раз ($p_{1-3}=0,0027$; $p_{2-3}=0,7132$)
S ОМБ, СП/МК, %	34,01 [30,45; 42,10]	80,69 [70,56; 90,38] \uparrow_{1-2} в 2,37 раз ($p_{1-2}=0,001$)	54,89 [45,10; 76,51] \downarrow_{1-3} в 1,61 раз ($p_{1-3}=0,0074$; $p_{2-3}=0,041$)

Примечание. Здесь и в таблицах 5-7: S ОМБ, СП ОМБ — площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ митохондрий; S ОМБ, СП/МК ОМБ, СП/МК — отношение площади под кривой спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ к металл-катализируемой ОМБ.

Таблица 5. Уровень митохондриальных ферментов и маркеров оксидативного стресса, полученных из гомогенатов хвоста эпидидимиса

Показатели/Группы	Суспензионная основа (1)	ГГЦ (2)	ГГЦ + карнитина хлорид (3)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	56,38 [39,34; 93,56]	14,77 [10,03; 21,48] \downarrow_{1-2} в 3,82 раз ($p_{1-2}=0,0054$)	17,51 [9,50; 27,69] \downarrow_{1-3} в 3,22 раз ($p_{1-3}=0,0074$; $p_{2-3}=0,9581$)
Активность H^+ -АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	20,13 [15,58; 27,18]	9,52 [6,90; 11,13] \downarrow_{1-2} в 2,11 раз ($p_{1-2}=0,00074$)	10,63 [9,04; 11,49] \downarrow_{1-3} в 1,89 раз ($p_{1-3}=0,004$; $p_{2-3}=0,4309$)
Активность СОД, УЕ/мг белка	2,71 [1,90; 2,96]	9,09 [6,85; 10,80] \uparrow_{1-2} в 3,35 раз ($p_{1-2}=0,0014$)	4,30 [3,26; 6,95] \uparrow_{1-3} в 1,58 раз ($p_{1-3}=0,0014$; $p_{2-3}=0,041$)
S ОМБ, СП ОМБ на мг белка	2,71 [1,90; 2,96]	12,00 [9,00; 13,22] \uparrow_{1-2} в 4,43 раз ($p_{1-2}=0,001$)	2,98 [2,52; 4,96] \downarrow_{2-3} в 4,03 раз ($p_{2-3}=0,002$; $p_{1-3}=0,4948$)
S ОМБ, СП/МК, %	42,60 [22,38; 51,05]	46,79 [44,26; 55,22] ($p_{1-2}=0,1893$)	10,49 [8,67; 15,09] \downarrow_{2-3} в 4,46 раз ($p_{2-3}=0,001$) \downarrow_{1-3} в 4,06 раз ($p_{1-3}=0,0027$)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о развитии в митохондриях тканей эпидидимиса выраженного окислительного стресса, который приводит к активации защитных реакций, что находит отражение в увеличении активности СОД и приросте концентрации митохондриального лактата. Вместе с тем, обнаруженные признаки митохондриальной дисфункции и выраженный прирост окислительно-модифицированных белков указывали на недостаточность процессов адаптации тканей придатка яичка к условиям тяжелой ГГЦ.

Назначение карнитина хлорида на фоне моделирования ГГЦ сопровождалось снижением уровня гомоцистеина сыворотки крови (в 4 раза) и увеличением содержания общего карнитина в цитоплазме клеток хвоста эпидидимиса. При этом уровень общего карнитина в митохондриях статистически значимо не отличался от показателей животных с ГГЦ.

Экспериментальная ГГЦ на фоне введения крысам карнитина хлорида приводила к различной реакции клеток исследуемых тканей гомогената головки и хвоста эпидидимиса. Карнитина хлорид способствовал снижению уровня молочной кислоты в цитоплазматической фракции головки эпидидимиса и, наоборот, повышению её в митохондриальной фракции. Активность ЛДГ в митохондриальной фракции головки эпидидимиса также статистически значимо возрастала. Активность H^+ -АТФазы статистически значимо увеличивалась относительно группы ГГЦ, в то время как изменения активности СДГ не было выявлено.

Активность СОД и уровень ОМБ в тканях головки эпидидимиса были сопоставимы с показателями животных с моделируемой ГГЦ.

Таким образом, повышение активности H^+ -АТФазы и ЛДГ в митохондриальной фракции свидетельствовало о том, что назначение карнитина хлорида способствовало более эффективной адаптации клеток головки придатка яичка в условиях стресса.

В хвостовой части эпидидимиса нами не было обнаружено статистически значимых отличий от серии с ГГЦ в уровне лактата и активности ЛДГ в цитоплазматической фракции, хотя прослеживалась тенденция к их снижению. В митохондриальной фракции также не было найдено значимых отличий в концентрации молочной кислоты, активности ЛДГ, СДГ и H^+ -АТФазы.

В серии моделирования ГГЦ на фоне применения карнитина хлорида в хвосте эпидидимиса уровень ОМБ был сопоставим с показателями контрольной группы, а активность СОД — несколько выше. Резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков статистически значимо повышался как относительно животных с ГГЦ, так и контрольной группы. Таким образом, в хвосте придатка яичка антиоксидантный эффект карнитина проявился более выраженно по сравнению с головкой.

У животных группы 4 (получавших только карнитина хлорид) обнаружено статистически значимое снижение концентрации общего карнитина

в митохондриальной фракции хвоста и головке эпидидимиса, при этом его концентрация в цитоплазматической фракции статистически значимо не отличалась от группы сравнения (животных группы 5) (табл. 6, 7). Имело место увеличение активности СОД в головке на 20,2%. Уровень гомоцистеина сыворотки крови в группе животных 4 (6,9 [6,5; 7,4] мкмоль/л) статистически значимо не отличался ($p_{5,4}=0,916$) от показателей группы животных 5 (7,0 [6,1; 7,2] мкмоль/л). Другие исследуемые биохимические показатели статистически значимо не изменялись.

Исходя из полученных результатов, было сделано предположение, что использование карнитина хлорида в лечении мужского бесплодия может быть целесообразно в связи с его несколькими вероятными механизмами воздействия на окислительный дистресс. Так, применение карнитина хлорида в условиях моделирования тяжелой формы ГГЦ позволило установить эффект, связанный с уменьшением выраженности ГГЦ. Вероятный механизм снижения концентрации гомоцистеина может быть связан с образованием эфиров карнитина с метаболитами метионина и их выведением в системный кровоток с последующей экскрецией почками [6]. Таким образом, удаление избыточного метионина будет предупреждать развитие осложнений, связанных с нарушением его метаболизма [21]. Также к значимым механизмам, уменьшающим выраженность окислительного стресса, вероятно, можно отнести как прямые антиоксидантные эффекты L-карнитина — непосредственное связывание АФК, так и обусловленные активацией Nrf-2 и p38 MAPK [7, 22].

Повышение ЛДГ активности в митохондриальной фракции головки эпидидимиса на фоне назначения карнитина хлорида позволяет предположить, что L-карнитин также важен для реализации метаболической гибкости, связанной с переключением митохондрий на использование лактата в качестве энергосубстрата, в условиях ограниченного использования жирных кислот.

Из литературных данных также известно, что наиболее высокая экспрессия МСТ 1 отмечается именно в головке эпидидимиса и снижается по мере прохождения по эпидидимису к его хвостовой части [19, 23]. Данная закономерность, возможно, обуславливала отсутствие статистически значимых различий в хвосте придатка яичка на фоне применения карнитина хлорида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При моделировании тяжелой ГГЦ в цитоплазматической и митохондриальной фракциях головки и хвоста эпидидимиса наблюдалось изменение метаболизма лактата, что выражалось в увеличении его уровня как в митохондриальной, так и в цитоплазматической фракциях головки и митохондриях хвоста придатка яичка, при одновременном статистически значимом снижении активности ЛДГ субклеточных фракций головки эпидидимиса.

КАРНИТИН, ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ И УТИЛИЗАЦИЯ ЛАКТАТА

Таблица 6. Оценка влияния карнитина хлорида на показатели головки эпидидимиса интактных животных

Показатели/Группы	Группа сравнения (5)	Здоровые животные + Карнитина хлорид (4)
Цитоплазма		
Концентрация белка, мг/мл	2,47 [2,20; 2,84]	2,78 [2,48; 3,02]
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	28,61[22,43; 33,1]	33,21[27,85; 37,55] ($p_{5-4}=0,227$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	151,84 [126,7; 185,86]	130,04[119,64; 151,46] ($p_{5-4}=0,318$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	141,34 [130,90; 150,54]	153,92 [136,39; 174,62] ($p_{5-4}=0,1563$)
Митохондрии		
Концентрация белка, мг/мл	1,95 [1,71; 2,08]	1,65 [1,22; 1,91]
Уровень лактата, мкмоль/г белка	13,79 [10,06; 19,07]	20,04 [11,87; 25,06] ($p_{5-4}=0,128$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	105,4 [86,22; 119,78]	114,03 [88,7; 170,8] ($p_{5-4}=0,564$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	114,33 [98,79; 141,59]	73,35 [65,89; 77,1] ↓ в 1,56 раз ($p_{5-4}=0,00136$)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	30,75 [24,4; 42,53]	34,5 [28,1; 49,37] ($p_{5-4}=0,3184$)
Активность H^+ -АТФазы, мкмоль фосфата/мг белка в час	24,8 [21,73; 34,58]	29,8 [20,5; 39,83] ($p_{5-4}=0,793$)
Активность СОД, УЕ/мг белка	32,94 [31,82; 35,64]	39,6 [34,35; 49,37] ↑ на 20,2% ($p_{5-4}=0,031$)
S ОМБ, СП ОМБ	6,68 [6,24; 7,78]	7,66 [7,47; 10,64] ($p_{5-4}=0,104$)
S ОМБ, СП/МК	51,9 [42,13; 58,91]	51,9 [42,13; 58,91] ($p_{5-4}=0,372$)

Таблица 7. Оценка влияния карнитина хлорида на показатели хвоста эпидидимиса интактных животных

Показатели/Группы	Группа сравнения (5)	Здоровые животные + Карнитина хлорид (4)
Цитоплазма		
Концентрация белка, мг/мл	2,49 [2,22; 2,92]	2,87 [2,62; 2,95]
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	22,61 [19,04; 26,69]	20,98 [19,13; 23,97] ($p_{5-4}=0,4948$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	58,03 [45,65; 66,58]	50,49 [45,67; 55,85] ($p_{5-4}=0,431$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	151,64 [148,45; 171,96]	170,89 [166,17; 185,90] ($p_{5-4}=0,1563$)
Митохондрии		
Концентрация белка, мг/мл	1,58 [1,47; 1,65]	2,14 [1,92; 2,22]
Уровень лактата, мкмоль/г белка	14,46[10,76; 19,35]	14,08 [12,11; 16,0] ($p_{5-4}=0,713$)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	31,16 [28,44; 35,9]	43,89 [36,13; 50,09] ($p_{5-4}=0,066$)
Карнитин общий, мкмоль/мг белка в пробе	83,33 [70,80; 98,03]	47,76 [44,9; 54,3] ↓ в 1,74 раз ($p_{5-4}=0,00136$)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	25,53 [21,19; 42,11]	25,14 [21,01; 37,67] ($p_{5-4}=0,713$)
Активность H^+ -АТФазы, мкмоль фосфата/мг белка в час	15,95 [13,44; 20,30]	19,14 [15,61; 20,65] ($p_{5-4}=0,431$)
Активность СОД, УЕ/мг белка	31,25 [30,14; 37,88]	38,03 [35,47; 40,55] ($p_{5-4}=0,227$)
S ОМБ, СП ОМБ	7,21 [5,51; 8,35]	5,59 [4,32; 6,36] ($p_{5-4}=0,083$)
S ОМБ, СП/МК	40,49 [34,76; 44,76]	38,03 [22,38; 45,88] ($p_{5-4}=0,6365$)

При введении метионина животным в течение трёх недель происходило значительное уменьшение концентрации общего карнитина в цитоплазматической и митохондриальной фракциях, а также снижение активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки: тканевом дыхании (СДГ) и окислительном фосфорилировании (H^+ -АТФазы) в головке и хвосте эпидидимиса.

У самцов крыс с тяжёлой ГГЦ отмечено развитие окислительного стресса в тканях эпидидимиса, что отражалось в усилении карбонилирования белков митохондрий головки и хвоста эпидидимиса, увеличении активности СОД и снижении резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации митохондриальных белков в головке эпидидимиса.

Моделирование ГГЦ на фоне назначения карнитина хлорида демонстрировало реализацию различных типов адаптивных ответов клеток головки и хвоста придатка яичка крыс. В головке эпидидимиса наблюдались процессы, связанные с поддержанием биоэнергетических процессов — увеличение уровня лактата в митохондриях при одновременном увеличении лактатдегидрогеназной активности митохондрий и повышении активности H^+ -АТФазы. В тканях хвоста отмечались изменения, которые носили защитный характер и были связаны с уменьшением образования окислительно-модифицированных белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность сотрудникам вивария Рязанского государственного медицинского университета (РязГМУ) за помощь в проведении исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено при поддержке РязГМУ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными осуществлялась в соответствии с “Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986), приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708 н “Об утверждении правил лабораторной практики”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Gomez J., Sanchez-Roman I., Gomez A., Sanchez C., Suarez H., Lopez-Torres M., Barja G. (2011) J. Bioenergetics Biomembranes, **43**, 377-386.
- Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. (2015) Reprod. Biol. Endocrinol., **13**, 37. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1
- Ali M., Martinez M., Parekh N. (2021) Andrologia, **53**(1), e13644. DOI:10.1111/and.13644
- Jung J.H., Seo J.T. (2014) Clin. Exp. Reprod. Med., **41**(3), 108-114.
- Aitken R.J., Flanagan H.M., Connaughton H., Whiting S., Hedges A., Baker M.A. (2016) Andrology, **4**(2), 345-360.
- Звягина В.И., Бельских Э.С., Урясьев О.М., Медведев Д.В., Киселева В.А., Твердова Л.В. (2018) Медицинский Вестник Северного Кавказа, **13**(1), 78-81. [Zvyagina V.I., Belskikh E.S., Uryasyev O.M., Medvedev D.V., Kiseleva V.A., Tverdova L.V. (2018) Medical News of the North Caucasus, **13**(1), 78-81.]
- Gülçin I. (2006) Life Sci., **78**, 803-811.
- Piomboni P., Focarelli R., Stendardi A., Ferramosca A., Zara V. (2012) Int. J. Androl., **35**(2), 109-124.
- Mongioi L., Calogero A.E., Vicari E., Condorelli R.A., Russo G.L., Privitera S., Morgia G., la Vignera S. (2016) Andrology, **4**(5), 800-807.
- Brooks G.A. (2020) Redox Biol., **35**, 101454. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101454
- Darr C.R., Varner D.D., Teague S., Cortopassi G.A., Datta S., Meyers S.A. (2016) Biol. Reprod., **95**(2), 34. DOI: 10.1095/biolreprod.116.140707.
- Sies H., Berndt C., Jones D.P. (2017) Annu. Rev. Biochem., **86**, 715-748.
- Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. (2014) Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова, **4**, 42-46. [Medvedev D.V., Zvyagina V.I., Fomina M.A. (2014) Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik im. akad. I.P. Pavlova. - I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald, **22**(4), 42-46.]
- Прохорова М.И. (ред.) (1986) Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен), Издательство Ленинградского университета, Л, 327 с. [Prokhorova M.I. (ed.) (1986) Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism), Leningrad University Press, L, 327 p.]
- Серебров В.Ю., Суханова Г.А. (ред.) (2008) Биоэнергетика клетки. Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 79-82. [Serebrov V.Yu., Sukhanova G.A. (eds.) (2008) Bioenergetics of the cell. Tomsk: Siberian State Medical University, 79-82.]
- Костюк В.А., Потанович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) Вопросы медицинской химии, **36**(2), 88-91. [Kostjuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. (1990) Voprosy Medicinskoj Khimii, **36**(2), 88-91.]
- Wan L., Hubbard R.W. (1998) Clin. Chem., **44**(4), 810-816.
- Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. (2014) Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации. ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава. - Рязань: РИО РязГМУ, 60 с. [Fomina M.A., Abalenihtina J.V. (2014) Sposob kompleksnoj ocenki soderzhaniya produktov okislitel'noj modifikacii belkov v tkanjah i biologicheskikh zhidkostjakh: metodicheskie rekomendacii. Ryazan: RIO RjazGMU, 60 p.]
- Brooks G.A., Arevalo J.A., Osmond A.D., Leija R.G., Curl C.C., Tovar A.P. (2021) J. Physiol., **2021**, 1-23.
- Philp A., Macdonald A.L., Watt P.W. (2005) J. Exp. Biol., **208**(24), 4561-4575.
- Martínez Y., Li X., Liu G., Bin P., Yan W., Más D., Valdivié M., Hu C.A., Ren W., Yin Y. (2017) Amino Acids, **49**(12), 2091-2098.

22. Fan Z, Han Y, Ye Y, Liu C, Cai H. (2017) Eur. J. Pharmacol., **804**, 7-12.
23. Benesch F, Dengler F, Masur F, Pfannkuche H., Gäbel G. (2014) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., **307**(12), 1428-1437.
24. Förster L., Indra D., Rosenberger K., Zver L., Hofbauer R. (2021) Nutr. Res., **85**, 84-98.
25. Garcia C.K., Goldstein J.L., Pathak R.K., Anderson R.G., Brown M.S. (1994) Cell, **76**, 865-873.

Поступила в редакцию: 18. 05. 2021.
После доработки: 03. 06. 2021.
Принята к печати: 17. 06. 2021.

CARNITINE CHLORIDE REDUCES THE SEVERITY OF EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND PROMOTES LACTATE UTILIZATION BY MITOCHONDRIAL FRACTION OF THE RAT EPIDIDYMISS

V.I. Zvyagina, E.S. Belskikh*

Academician I. P. Pavlov Ryazan State Medical University,
9 Vysokovoltynaya str., Ryazan, 390026 Russia; *e-mail: vizvyagina@yandex.ru

Hyperhomocysteinemia is a risk factor for many diseases, including reproductive disorders in men. L-carnitine is used in medical practice to correct impaired bioenergetic conditions; in patients with idiopathic forms of infertility its effects are associated with improvement of the sperm parameters. However, the effect of exogenous L-carnitine on the level of homocysteine in the gonadal tissues, as a risk factor for impaired fertility, has not been investigated yet. The aim of this study was to investigate activity of bioenergetic enzymes in the epididymal mitochondrial fraction, the dynamics of changes in the cytoplasmic and mitochondrial lactate levels and LDH activity, the total carnitine content, as well as the oxidative status of these cells under conditions of oxidative stress caused by hyperhomocysteinemia, and to assess the effect of carnitine chloride on these parameters under conditions of methionine administration to male Wistar rats. Methionine administration to animals for three weeks at a dose of 3 g/kg, resulted in development of the severe forms of hyperhomocysteinemia with serum homocysteine concentrations exceeding 100 $\mu\text{mol/L}$. This was accompanied by a decrease in the activity of enzymes involved in the bioenergetic processes of the cell: tissue respiration (succinate dehydrogenase) and oxidative phosphorylation (H^+ -ATPase) in the epididymal head and tail. The change in lactate metabolism included an increase in its level in both the mitochondrial and cytoplasmic fractions of the epididymal head and mitochondria of the epididymal tail, and also simultaneous statistically significant decrease in LDH activity in the mitochondria and cytoplasm of the epididymal head. In male rats with severe hyperhomocysteinemia, an increase in the activity of mitochondrial SOD accompanied by an increase in the carbonylation of mitochondrial proteins in the head and tail of the epididymis was noted. Modeling of hyperhomocysteinemia under conditions of carnitine chloride of administration led to different reactions of the cells of the studied tissues assayed in the epididymal head and tail homogenate. In the epididymal head, carnitine chloride promoted an increase in the mitochondrial lactate concentration and a decrease in the cytoplasmic lactate concentration, as well as an increase in the LDH activity associated with the mitochondrial fraction. These changes were accompanied by an increase in the activity of H^+ -ATPase in the epididymal, thus suggesting that carnitine chloride stimulated lactate transport of into the mitochondria and its use as an energy substrate under conditions of oxidative stress caused by hyperhomocysteinemia. In the tail tissues, the changes were protective in nature and were associated with a decrease in the formation of oxidatively modified proteins.

Key words: hyperhomocysteinemia; carnitine; lactate; epididymis; oxidative stress; mitochondria

Funding. The study was conducted with the support of the Ryazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Received: 18.05.2021, revised: 03.06.2021, accepted: 17.06.2021.