

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 577.169:616.12-008.1

ВЛИЯНИЕ КАРНИТИНА ХЛОРИДА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА (II)

В. И. Звягина, О. М. Урясьев, Э. С. Бельских, Д. В. Медведев*

Рязанский государственный медицинский университет

им. академика И. П. Павлова, г. Рязань, Российская Федерация

CARNITINE CHLORIDE EFFECT ON FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA IN CONDITIONS OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS DEFICIT

V. I. Zvyagina, O. M. Uryasiev, E. S. Belskikh, D. V. Medvedev*

Ryazan State Medical University named after I. P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation

Цель. Изучить воздействие карнитина хлорида на функциональное состояние митохондрий и содержание эндогенного карнитина в условиях L-NAME индуцированного снижения синтеза оксида азота (II).

Материалы и методы. 24 крысы линии Wistar были разделены на группу контроля, группу, получавшую L-NAME в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней внутривенно, и группу, получавшую L-NAME по аналогичной схеме на фоне введения карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг в течение 21 дня. У животных исследовались активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), супероксиддисмутазы (СОД), концентрации лактата, оксида азота (II), карнитина (общий, свободный, связанный) и незтерифицированных жирных кислот в митохондриях кардиомиоцитов крыс.

Результаты. L-NAME в дозе 25 мг/кг приводил к снижению концентрации метаболитов NO (на 21,5 %, $p < 0,05$) и лактата (на 56 %, $p < 0,05$) в митохондриях миокардиоцитов, вместе с тем повышал содержание незтерифицированных жирных кислот (на 290 %, $p < 0,05$), общего карнитина (на 162 %, $p < 0,05$) и активность всех трех измеряемых оксидоредуктаз в митохондриях тканей сердца по сравнению с показателями животных контрольной группы (ЛДГ на 160 %, $p < 0,05$; СДГ на 109 %, $p < 0,05$).

© Звягина В. И., Урясьев О. М., Бельских Э. С., Медведев Д. В., 2015

e-mail: ed.bels@yandex.ru

тел: 8 920 979 68 46

[Звягина В. И. – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО; Урясьев О. М. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедры факультетской терапии с курсами эндокринологии, клинической фармакологии, профессиональных болезней и фармакотерапии ФДПО; Бельских Э. С. (*контактное лицо) – ординатор кафедры факультетской терапии с курсами эндокринологии, клинической фармакологии, профессиональных болезней и фармакотерапии ФДПО; Медведев Д. В. – ассистент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО].

$p < 0,05$; СОД на 133 %, $p < 0,05$). Предварительное введение карнитина хлорида приводило к достоверному значительному приросту активности СДГ (на 163 %, $p < 0,05$) и СОД (на 376 %, $p < 0,05$), увеличению концентрации метаболитов NO (на 437 %, $p < 0,05$) и лактата (на 62 %, $p < 0,05$), а также к уменьшению концентрации жирных кислот (на 37 %, $p < 0,05$), общего карнитина (на 35 %, $p < 0,05$) и активности ЛДГ (на 50 %, $p < 0,05$).

Выводы. Предварительное назначение хлорида карнитина в дозе 300 мг/кг перед введением L-NAME в дозе 25 мг/кг нормализует гомеостаз карнитина, предотвращает снижение концентрации метаболитов NO и снижает концентрацию неэтерифицированных жирных кислот, а также достоверно повышает активность СОД и СДГ в митохондриях кардиомиоцитов крыс.

Ключевые слова. Карнитин, оксид азота (II), митохондриальная патология.

Aim. To study the effect of carnitine chloride on functional state of mitochondria and endogenous carnitine content in conditions of L-NAME-induced decrease in nitric oxide synthesis (II).

Materials and methods. Twenty four Wistar rats were divided into the following groups: the control group, the group with intraperitoneal introduction of L-NAME in the dose of 25 mg/kg for 7 days and the group receiving L-NAME by the analogous scheme against the background of introduction of carnitine chloride in the dose of 300 mg/kg for 21 days. The animals experienced the study of lactate dehydrogenase (LDG), succinate dehydrogenase (SDG), superoxide dismutase (SOD), lactate, nitric oxide (II), carnitine (total, free, bound) and nonetherified fatty acid concentrations in the rat cardiomyocyte mitochondria.

Results. L-NAME in the dose of 25 mg/kg led to decrease in NO metabolite (by 21,5 %, $p < 0,05$) and lactate (by 56 %, $p < 0,05$) concentrations in myocardiocyte mitochondria; at the same time, it increased nonetherified fatty acid (by 290 %, $p < 0,05$) and total carnitine (by 162 %, $p < 0,05$) content as well as activity of all the three measured oxidoreductases in mitochondrial cardiac tissues as compared to the control animal indices (LDG by 160 %, $p < 0,05$; SDG by 109 %, $p < 0,05$; SOD by 133 %, $p < 0,05$). Preliminary introduction of carnitine chloride induced reliable significant growth of SDG (by 163 %, $p < 0,05$) and SOD (by 376 %, $p < 0,05$) activity, rise in NO metabolite (by 437 %, $p < 0,05$) and lactate (by 62 %, $p < 0,05$) concentrations, as well as to fall in fatty acid (37 %, $p < 0,05$) and total carnitine (by 35 %, $p < 0,05$) concentrations and LDG activity (by 50 %, $p < 0,05$).

Conclusions. Preliminary administration of cortinine chloride in the dose of 300 mg/kg before introduction of L-NAME in the dose of 25 mg/kg normalizes carnitine homeostasis, prevents decrease in NO metabolite concentration, declines nonetherified fatty acid concentration and significantly elevates SOD and SDG activity in the rat cardiomyocyte mitochondria.

Key words. Carnitine, nitric oxide (II), mitochondrial pathology.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с накоплением информации о митохондриях и их роли в клеточном метаболизме широко обсуждается значение митохондриальной патологии в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, легочная гипертензия, гипертоническая болезнь и хроническая сердечная недостаточность [11, 17].

Существует значительное число точек приложения, воздействие на которые способно изменить метаболические процессы в митохондриях и во всей клетке в целом: регуляция активности дыхательной цепи

и карнитиновый гомеостаз, антиоксидантная система митохондрий, изменение активности NO-синтаз, влияние на концентрацию внутриклеточного кальция [2, 10, 12, 17]. Поэтому в настоящее время весьма актуальной проблемой является изучение и разработка фармако-терапевтических подходов для нормализации работы митохондрий клеток различных тканей в условиях снижения синтеза NO и моделей сосудистых заболеваний, – митохондриально-ориентированная терапия [11].

Одним из перспективных веществ данной группы является карнитина хлорид, относящийся к группе препаратов, обладающих метаболическим типом действия. Кар-

нитин (γ -триметил- β -гидроксипутробетанин) участвует в митохондриальном метаболизме и играет ключевую роль в окислении жирных кислот и энергетическом обмене. В дополнение к транспорту свободных жирных кислот через внутреннюю мембрану митохондрий карнитин модулирует их скорость окисления и участвует в регуляции жизненно важных клеточных функций, таких как апоптоз [3].

Карнитиновый пул взрослого человека в среднем составляет от 15 до 20 гр. и поддерживается как эндогенным синтезом, так и поступлением с пищей, преимущественно из мяса и молочных продуктов. Общий пул карнитина в организме представлен свободным карнитином и его эфирами, образующимися в реакциях, катализируемых карнитинацилтрансферазами [15]. Концентрация карнитина и ацилкарнитина может изменяться в зависимости от диеты либо в условиях патологических состояний, таких как, например, сахарный диабет [18], сердечно-сосудистые заболевания [11, 14].

Таким образом, использование карнитина хлорида может быть перспективным в лечении и профилактике хронических состояний и заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией, но необходимы дальнейшие исследования для наиболее полной оценки возможностей данного препарата.

Цель исследования – изучить воздействие карнитина хлорида на функциональное состояние митохондрий и карнитиновый гомеостаз в условиях L-NAME-индуцированного снижения синтеза оксида азота (II).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 24 крысах-самцах линии Вистар массой 230–270 г. Крысы были разделены на 3 группы, каждая из которых включала 8 животных. Крысам первой группы ежедневно в течение 7 дней

1 раз в сутки внутрибрюшинно вводился L-NG-нитроаргинина метиловый эфир (L-NAME) (производство «Sigma») – неселективный ингибитор NO-синтазы в дозе 25 мг/кг, второй – ежедневно на фоне введения карнитина хлорида (производство ФГУ «РКНПК» Минздрава России – ЭПМБП) в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно в течение 21 дня 1 раз в сутки вводился L-NAME в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней, начиная с 14-го дня введения карнитина хлорида, третья группа являлась контрольной, животным этой группы назначался 0,9%-ный раствор NaCl 1 раз в день внутрибрюшинно в течение 21 дня. Выбор доз осуществлялся на основе литературных данных [9, 13].

Работа с животными проводилась 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. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Из ткани сердца с помощью гомогенизатора Potter S получали гомогенат и выделяли из него митохондрии методом дифференциального центрифугирования [6]. Осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в растворе, содержащем 0,25 М сахарозы, 0,001 М ЭДТА, 0,05 М трис-буфер, и далее использовали для определения активности митохондриальных ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), СОД 2, а также для измерения концентрации метаболитов NO, лактата, карнитина и жирных кислот. Общее содержание белка по методу Лоури, лактата и ЛДГ в пробах измеряли с помощью стандартизированных

диагностикумов DiaSyS Diagnostic Systems. Активность СДГ определяли с помощью метода, основанного на определении восстановленного гексацианоферрата [6]. Активность митохондриальной Mn-зависимой СОД исследовали при помощи метода, основанного на торможении реакции аутоокисления кверцитина [4]. Определение метаболитов NO проводили с помощью метода в модификации В. А. Метельской на ИФ-анализаторе StatFax 3200 [5]. Концентрацию карнитина в митохондриях определяли по методу L. Wan и R. W. Hubbard, основанному на образовании свободного КоASH, неэнзиматически реагирующего с 5,5-дитиобис-2-нитробензоатом с образованием окрашенного 5-тио-2-нитробензоата, интенсивность светопоглощения которого измеряли спектрофотометрически при $\lambda = 410$ нм [16]. Карнитиновый гомеостаз исследовали, измеряя количество общего, свободного карнитина, количество связанного карнитина (оценивалось по разнице между ними), а также определяя соотношение «связанный карнитин/общий карнитин», %. Для выявления различий между независимыми группами использовали *U*-критерий Манна–Уитни, который рассчитывали с помощью программы StatPlus 2009. Уровень отличий рассматривался как статистически значимый при вероятности ошибки $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из результатов, приведенных в таблице, следует, что L-NAME в дозе 25 мг/кг достоверно приводил к снижению концентрации метаболитов NO и лактата, вместе с тем достоверно повышалось содержание неэтерифицированных жирных кислот, общего карнитина и активность всех трех измеряемых оксидоредуктаз в митохондриях тканей сердца по сравнению с показателями животных контрольной группы.

Сопутствовавший увеличению концентрации жирных кислот (в 3,9 раза) прирост концентрации общего карнитина (в 2,43 раза) при снижении доли связанного карнитина (с 55 до 13 %) указывает на низкую активность процессов, связанных с β -окислением жирных кислот, в первую очередь, переноса ацильных групп с ацил-SКоА на карнитин. Интенсивность процессов окисления жирных кислот регулируется соотношением HSKoA/ацетил-SКоА. При смещении этого соотношения в сторону ацетил-SКоА происходит образование малонил-SКоА, ингибирующего карнитинпальмитоилтрансферазу-I (КПТ-I) и, как следствие, торможение процессов β -окисления с целью сохранения оптимальной активности ЦТК (ацетил-SКоА – аллостерический регулятор активности цитратсинтазы). КПТ-I – это фермент, ответственный за перенос жирных кислот из цитоплазмы клетки на карнитин с образованием ацил-карнитина, который, в свою очередь, переносится с помощью карнитинацилкарнитинтранслоказы в митохондриальный матрикс [3].

Митохондриальная ЛДГ – составная часть митохондриального лактат-окисляющего комплекса, обеспечивающего дегидрирование лактата и одновременно транспорт образующегося пирувата в митохондрию. Повышение активности этого фермента (в 2,6 раза) при замедлении β -окисления жирных кислот и снижении концентрации лактата (в 2,28 раза) указывает на интенсификацию потребления лактата митохондриями в качестве источника энергии, что, возможно, являлось следствием компенсаторной реакции, направленной на поддержание уровня окислительно-восстановительных процессов [7].

Повышение активности СДГ (в 2,1 раза) в группе животных, получающих 25 мг/кг L-NAME, указывает на интенсификацию процессов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования по сравне-

нию с показателями контрольных животных. Это косвенно подтверждается приростом активности СОД (в 2,33 раза), главной задачей которого является нейтрализация избыточно образующихся АФК при усилении

клеточного дыхания [12, 17]. Ингибирование митохондриальной NO-синтазы, что подтверждается снижением концентрации метаболитов NO, также способствует усилению процессов клеточного дыхания [1, 8].

Изменение показателей митохондрий ткани сердца в условиях моделирования L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции и коррекции ее карнитина хлоридом (медиана [квартиль 1; квартиль3])

Показатель	Группа животных, получавших		
	0,9%-ный NaCl внутрибрюшинно	25 мг/кг L-NAME внутрибрюшинно	25 мг/кг L-NAME внутрибрюшинно + 300 мг/кг карнитина хлорида
Концентрация метаболитов NO, мкмоль/мг белка	65 [64; 79]	51 [36; 59]*	274 [189; 300]**
Лактат, мкмоль/мг белка	276 [244; 420]	121 [92; 124]*	196 [181; 228]**
Жирные кислоты, мкмоль/мг белка	11 [10; 13]	43 [41; 46]*	27 [25; 29]**
ЛДГ, Ед/г белка	10 [7; 13]	26 [25; 27]*	13 [11; 14]**
СДГ, нмоль сукцината/мин на мг белка	54 [33; 73]	113 [105; 149]*	297 [250; 396]**
СОД, оптическая плотность, у.е./мг белка	0,18 [0,13; 0,26]	0,42 [0,37; 0,87]*	2 [1,06; 2,65]**
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	51 [49; 54]	134 [132; 215]*	87 [70; 110]**
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	23 [22; 26]	116 [110; 220]*	50 [34; 68]**
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	28 [25; 30]	18 [14; 23]*	37 [25; 53]**
Соотношение карнитин связанный/карнитин общий	0,55 [0,46; 0,56]	0,13 [0,10; 0,15]*	0,43 [0,35; 0,49]**

Примечание: * – достоверные результаты ($p < 0,05$) группы животных, получавших L-NAME 25 мг/кг, относительно контрольной группы; ** – достоверные результаты между группой животных, получающих 300 мг/кг карнитина хлорид + 25 мг/кг L-NAME, и группой крыс, получающих 25 мг/кг L-NAME.

Таким образом, митохондрии сердца крыс способны компенсировать метаболические сдвиги, развивающиеся в условиях семидневной модели дефицита синтеза NO, индуцированного L-NAME в дозе 25 мг/кг, за счет оптимального использования кислорода и лактата вместо жирных кислот в качестве источника энергии. Однако при этом имеет место значительный рост концентрации свободных жирных кислот в матриксе митохондрий – разобщителей клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, и снижение доли связанного карнитина,

что косвенно указывает на снижение концентрации HSKoA и определенный предел в увеличении активности ферментов ЦТК и ДЦ для повышения интенсивности синтеза АТФ.

Введение L-NAME на фоне предварительного введения карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг не вызывало снижения концентрации метаболитов оксида азота в митохондриях миокардиоцитов, а способствовало значительному их приросту (в 5,31 раза) относительно контрольной группы, что указывает, с одной стороны, на компенсатор-

ный сдвиг, направленный на сдерживание активности ДЦ, с другой – на нивелирование эффекта неселективного ингибирования синтаз NO.

Не происходило резкого снижения доли связанного карнитина (43 %, она оставалась на контроле – 55 %), концентрация лактата снижалась в значительно меньшей степени (в 1,4 раза), концентрация же жирных кислот была на 37 % ниже, чем у группы животных с L-NAME, но не достигала значений контрольной группы. Уровень общего карнитина был ниже на 35 % относительно группы с L-NAME, но на 70 % выше, чем у животных группы контроля, аналогичная тенденция наблюдалась в изменении уровня свободного карнитина (снижалась на 57 %, но выше контроля на 54 %).

Значительно на фоне экзогенного введения карнитина хлорида возрастала активность СДГ (в 2,63 раза) и митохондриальной СОД (в 4,76 раза), которая, с одной стороны, обеспечивает защиту NO от АФК, а с другой – ее активность находится также в тесной зависимости от карнитинового гомеостаза, и экспрессия гена СОД повышается под влиянием карнитина [15, 17], механизм этого явления в настоящее время не изучен полностью, но считается одним из возможных механизмов антиоксидантного действия карнитина.

Таким образом, в ходе исследования были получены результаты, демонстрирующие предотвращение митохондриальной дисфункции при предварительном введении карнитина хлорида в условиях модели L-NAME, 25 мг/кг в течение 7 дней. Мы считаем целесообразным дальнейшее изучение возможности использования карнитина хлорида при заболеваниях, связанных с дефицитом синтеза оксида азота (II) и избыточным образованием АФК.

Выводы

1. L-NAME в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней снижает концентрацию митохондриального лактата и увеличивает концентрацию жирных кислот в митохондриях кардиомиоцитов крыс, что приводит к нарушению карнитинового гомеостаза.

2. Предварительное назначение карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг перед введением 25 мг/кг L-NAME нормализует карнитиновый гомеостаз, предотвращает падение концентрации метаболитов NO и снижает концентрацию незетерифицированных жирных кислот, а также достоверно повышает активность СОД и СДГ в митохондриях кардиомиоцитов крыс.

Библиографический список

1. Граник В. Г., Григорьев Н. Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств: монография. М.: Вузовская книга 2004; 360.
2. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса 2006; 400.
3. Копелевич В. М. Витаминоподобные соединения L-карнитин и ацетил-L-карнитин: от биохимических исследований к медицинскому применению. Укр. Біохім. журн. 2005; 77 (4): 30–50.
4. 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; 2: 88–91.
5. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке. Клиническая лабораторная диагностика 2005; 6: 15–18.

6. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен); под редакцией М. И. Прохоровой. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та 1982; 327.
7. *Мецержкова О. В., Чурова М. В., Немова Н. Н.* Митохондриальный лактат-окисляющий комплекс и его значение для поддержания энергетического гомеостаза клеток. Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Экологическая физиология и биохимия водных организмов: сборник научных статей. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН 2014; 1: 163–172.
8. *Осинов А. Н., Борисенко Г. Г., Владимиров Ю. А.* Биологическая роль нитрозильных комплексов гемпротеинов. Успехи биологической химии 2007; 47: 259–292.
9. *Покровский М. В., Покровская Т. Г., Кочкаров В. И., Артюшкова Е. Б.* Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота. Экспериментальная и клиническая фармакология 2008; 71(2): 29–31.
10. *Dikalov S.* Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases. Free Radic. Biol. Med. 2011; 51 (7): 1289–1301.
11. *Marcovina S. M., Sirtori C., Peracino A.* Translating the basic knowledge of mitochondrial functions to metabolic therapy: role of L-carnitine. The journal of laboratory and clinical medicine 2012; 73–84.
12. *Michael P. Murphy* How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J. 2009; 417 (1): 1–13.
13. *Rajasekar P., Palanisamy, Anuradha C. V.* Increase in nitric oxide and reduction in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat. Clin. Exp. Hypertens. 2007; 29 (8): 517–530.
14. *Sharma S., Sud N., Wiseman D. A., Carter A. L., Kumar S., Hou Y., Rau T., Wilham J., Harmon C., Oishi P.* Altered carnitine homeostasis is associated with decreased mitochondrial function and altered nitric oxide signaling in lambs with pulmonary hypertension. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 2008; 1294: 46–56.
15. *Sharma S., Sun X., Agarwal S., Rafikov R., Dasarathy S., Kumar S., Black S. M.* Role of carnitine acetyl transferase in regulation of nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial. Cells. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14 (1): 255–272.
16. *Wan L., Hubbard R. W.* Rapid assay for free carnitine measurement in plasma. Clin. Chem. 1995; 41: 159.
17. *Xiaoqiang Tang, Yu-Xuan Luo, Hou-Zao Chen, De-Pei Liu.* Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. Front. Physiol. 2014; 06: 175.
18. *Yugo Miyata, Ichihiro Shimomura.* Metabolic flexibility and carnitine flux: The role of carnitine acyltransferase in glucose homeostasis. J. Diabetes Investig. 2013; 4 (3): 247–249.

Материал поступил в редакцию 24.03.2015