

УДК 577.164.17:[577.112.386:612.11] — 092.9

Изменения в фонде серосодержащих соединений плазмы крови и печени крыс при ингибировании фолатного цикла метотрексатом

Новгородская Я. И., Курбат М. Н.

Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

Реферат. Однократное и повторяющееся введение метотрексата (МТХ) вызывает дисбаланс уровней серосодержащих аминокислот и аминотиолов, а также серина и глицина в плазме крови и печени крыс. Однократное введение МТХ только через 24 ч вызывает снижение концентрации цистеина и повышение — глутатиона, но не таурина в печени крыс. Последствиями введения однократной дозы МТХ является гипергомоцистеинемия и нарушение соотношений уровней серина и глицина в печени крыс через 7 сут. Введение МТХ через день в течение 7 и 21 сут вызывает обеднение пула аминотиолов плазмы крови и обогащение их пула в печени крыс. На 7-е и 21-е сут в печени крыс повышается концентрация гомоцистеина и основных продуктов γ -глутамильного цикла (цистеинилглицина, γ -глутамилцистеина и глутатиона), однако уровень таурина повышается только на 7-е сут. Таким образом, ингибирование фолатного цикла изменяет соотношения метаболических путей в обмене низкомолекулярных серосодержащих соединений, не содержащих фолатзависимых реакций: превращения цистеина, конечные этапы синтеза таурина.

Ключевые слова: серосодержащие аминокислоты, печень, плазма крови, метотрексат.

Введение. Интерес к изучению метаболизма серосодержащих аминокислот при патологии, в том числе при дефиците фолатов, на протяжении последних лет постоянно растет. Антагонисты фолиевой кислоты нарушают не только синтез пуринов, пиримидинов, но и взаимопревращения гомоцистеина и метионина, серина и глицина. В то же время остаются неизученными механизмы формирования пула гомоцистеина (Hcy) и других серосодержащих соединений в тканях крыс в условиях фолатного дефицита. Пул Hcy тесно связан с доступностью или скоростью образования его предшественников, а также со скоростью его расходования в процессе транссульфурирования. Доступность цистеина для транспорта аминокислот в клетку γ -глутамильным циклом определяется полностью или частично формированием и доступностью фонда Hcy в соответствующей ткани. Это может играть существенную роль в формировании метаболического дисбаланса в тканях при патологии печени, учитывая ключевую роль печени в превращениях серосодержащих аминокислот.

Цель работы — сравнительный анализ влияния различной кратности и сроков введения ингибитора фолатного цикла метотрексата на уровни низкомолекулярных серосодержащих соединений (HCC), а также серина и глицина в плазме крови и печени крыс.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 48 крысах-самцах. В первой серии экспериментов животным опытных групп вводили метотрексат (МТХ) через день в дозе 0,1 мг/кг в течение 7 и 21 сут, во второй серии опытов МТХ вводили однократно в той же дозе на сроки 24 ч и 7 сут. Животные контрольных групп получали эквивалентное количество 0,9 % раствора NaCl. После декапитации извлекали печень, плазму крови отделяли центрифугированием при 2000 g. Методом обращенно-фазной ВЭЖХ в тканях определяли концентрации цистеиновой (CA) и цистеинсульфиновой кислот (CSA), серина (Ser), глицина (Gly), гипотаурина (HrTau), таурина (Tau), метионина (Met), цистатионина (Ctn), гомоцистеиновой кислоты (HCA) [1], цистеина (Cys), гомоцистеина (Hcy), цистеинилглицина (CysGly), γ -глутамилцистеина (gGluCys) и глутатиона (GSH) [2].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 с применением методов параметрической и непараметрической статистики с учетом контроля нормальности распределения с использованием критерия Колмогорова — Смирнова с поправкой Лиллифорса: в случае нормального распределения, отличия между независимыми выборками оценивали с исполь-

зованием *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок и данные представлены в виде среднего и средней ошибки среднего ($M \pm m$); при отклонении распределения от нормального применяли медианный тест Манна – Уитни, данные выражали в виде медианы, нижней и верхней квартили ($Me [Q_{25}; Q_{75}]$). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В плазме крови контрольной группы крыс в наибольших концентрациях присутствовали Ser, Gly и Tau, в наименьших — CA, CSA, HCA, Ctn и HpTau (таблица 1). При 7 и 21 сут ингибирования фолатного цикла наблюдалось повышение уровней Gly, Met и Tau, а также снижение — Ctn в плазме крови, что может указывать на торможение транссульфирования Hcy. На основании того, что МТХ может ингибировать не только фолатзависимые реакции, но и другие ферменты, например, метионинадензилтрансферазу (МАТ), можно предположить, что повышение уровня Met связано именно с ингибированием МАТ. В синтезе Met из Hcy существенную роль играют также фолатнезависимые реакции реметилирования Hcy из бетаина и метилметионина. Уровень Tau повысился в 2,5 раза по сравнению с контролем, а уровень Met — в 1,5 раза, что указывает на более значимую роль транссульфирования Hcy, чем реметилирования.

Таблица 1 — Содержание НСС и их дериватов в плазме крови крыс первой серии экспериментов, мкмоль/л

Показатель	Контроль	МТХ через день в течение 7 сут	МТХ через день в течение 21 сут
CA	0,15 ± 0,036	0,22 ± 0,036	0,32 ± 0,042*
CSA	0,12 ± 0,013	0,27 ± 0,078	0,20 ± 0,037
HCA	0,11 ± 0,044	0,07 ± 0,011	0,05 ± 0,009
Ser	157,1 ± 13,57	238,2 ± 21,00*	194,6 ± 11,75
Gly	156,4 ± 11,64	485,73 ± 33,855*	379,6 ± 19,56*
HpTau	1,03 ± 0,234	0,81 ± 0,125	0,60 ± 0,065
Tau	108,5 ± 6,19	275,7 ± 12,04*	270,2 ± 25,01*
Met	29,4 ± 0,89	44,1 ± 2,66*	42,0 ± 2,26*
Ctn	0,79 ± 0,138	0,40 ± 0,031*	0,38 ± 0,034*

* Статистически достоверные различия в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

При 7-суточном ингибировании фолатного цикла, кроме указанных выше изменений, повышался уровень Ser, а через 21 сут наблюдалась лишь тенденция к его повышению, что может указывать на активацию также серинсульфгидразной реакции. С другой стороны для синтеза тимина из урацила необходим N⁵,N¹⁰-метилентетрагидрофолат, уровень которого зависит от активности дегидрофолатредуктазы, а также от активности серингидроксиметилтрансферазы, которая переносит одноуглеродный фрагмент от Ser на тетрагидрофолат с образованием Gly, но МТХ может ингибировать и метилен тетрагидрофолатредуктазу [3]. Это объясняет одновременное повышение уровней Ser и Gly на 7-е и 21-е сут в плазме крови. На фоне повышения уровня Met уровень Hcy снижался.

Нами ранее установлено, что плазма крови интактных крыс богата Cys и GSH, а длительное введение МТХ вызывает снижение в плазме крови уровней интермедиатов γ -глутамильного цикла. Степень выраженности дисбаланса SH-содержащих соединений коррелировала с длительностью введения МТХ. При введении МТХ через день в течение 7 и 21 сут в плазме крови снижались уровни Cys, gGluCys, CysGly и GSH, а через 21 сут, кроме этого, снижался уровень Hcy [4].

Печень и плазма крови контрольной группы содержала в достаточно высоких концентрациях Ser, Gly и Tau (таблица 2).

Таблица 2 — Содержание НСС и их дериватов в печени крыс первой серии экспериментов, нмоль/г ткани

Показатель	Контроль	МТХ через день в течение 7 сут	МТХ через день в течение 21 сут
CA	9,6 ± 1,16	11,0 ± 1,18	14,5 ± 1,06*
CSA	7,9 ± 0,90	7,9 ± 0,86	9,0 ± 1,66
HCA	54,0 ± 6,26	56,5 ± 9,56	44,1 ± 4,86
Ser	1172,6 ± 196,48	1041,3 ± 92,04	860,6 ± 192,15

Окончание табл. 2

Показатель	Контроль	MTX через день в течение 7 сут	MTX через день в течение 21 сут
Gly	4391,1 ± 297,03	4219,3 ± 383,66	4095,9 ± 270,98
HpTau	145,5 ± 14,90	103,3 ± 9,61	75,9 ± 13,20*
Tau	1865,7 ± 154,14	4227,1 ± 807,11*	1688,7 ± 128,84
Met	44,7 ± 2,62	42,8 ± 3,64	38,5 ± 3,55
Ctn	6,7 ± 1,14	10,3 ± 1,05*	8,0 ± 1,36
Cys	404,1 ± 28,42	444,9 ± 54,66	547,8 ± 52,06*
Hcy	1,4 ± 0,17	1,8 ± 0,25*	2,5 ± 0,40*
CysGly	102,3 ± 5,87	157,4 ± 18,46*	194,0 ± 16,29*
gGluCys	31,8 ± 1,20	71,2 ± 11,66*	73,1 ± 7,12*
GSH	4004,3 ± 183,03	7566,6 ± 891,64*	7744,5 ± 613,04*

* Статистически достоверные различия в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

Концентрации CA, CSA, HCA, Ctn и Met были относительно низкими по сравнению с другими исследованными соединениями. Уровень Hcy в печени крыс контрольной группы был низок по сравнению с его уровнем в плазме крови. Введение MTX на протяжении 7 сут вызывало в печени крыс повышение уровней Ctn и Hcy, а также продуктов γ -глутамильного цикла. У крыс, получавших MTX 21 сут, наблюдалось значимое повышение уровня CA и снижение уровня HpTau в печени крыс, что также указывает на ингибирование заключительной реакции синтеза Tau. Уровни низкомолекулярных аминокислот продолжали расти. Плазменный уровень GSH может зависеть от его уровня в печени, а его транспорт могут регулировать гормоны [5]. В нашем исследовании наблюдался высокий уровень GSH в печени и низкий — в плазме, что может указывать на нарушение транспорта последнего из клетки.

Во второй серии экспериментов установлено, что однократное введение MTX через 24 ч вызывает повышение уровней Ser и GSH, а также снижение уровней Cys и CysGly в печени крыс (таблица 3).

Таблица 3 — Содержание НСС и их дериватов в печени крыс второй серии экспериментов, нмоль/г ткани

Показатель	Контроль	Однократно MTX на 24 ч	Однократно MTX на 7 сут
CA	11,45 ± 1,579	9,70 ± 1,139	11,00 ± 1,62
CSA	7,94 ± 1,271	8,39 ± 1,109	5,33 ± 0,566
HCA	75,3 ± 7,96	76,2 ± 3,36	75,0 ± 5,59
Ser	1509,2 ± 186,31	2142,0 ± 146,86*	911,7 ± 78,11*
Gly	4525,9 ± 127,34	4936,6 ± 301,13	3560,9 ± 114,41*
HpTau	138,0 ± 17,68	162,1 ± 8,07	151,3 ± 21,8
Tau	2516,9 [1768,8; 3249,0]	1699,2 [1573,1; 1893,7]	3494,2 [2753,6; 3946,4]
Met	41,3 ± 1,46	41,86 ± 2,997	35,2 ± 2,27
Ctn	20,8 ± 2,55	19,5 ± 2,73	25,2 ± 2,39
Cys	249,4 ± 46,44	130,1 ± 14,20*	222,8 ± 17,84
Hcy	1,04 ± 0,087	1,27 ± 0,152	1,09 ± 0,110
CysGly	67,8 ± 6,05	52,1 ± 3,53*	71,7 ± 2,44
gGluCys	26,0 ± 1,66	25,4 ± 1,44	32,0 ± 1,69*
GSH	2755,4 ± 104,08	3561,7 ± 98,36*	2929,7 ± 155,77

* Статистически достоверные различия в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

Уровни Hcy и Gly значимо не изменялись, но при этом повышался уровень Ser и снижался уровень Cys, поэтому можно предположить, что MTX при данном режиме дозирования не нарушает транссульфирование Hcy, а активирует синтез Ser из Cys в обратной серинсульфидразной реакции.

Снижение концентрации Cys также может быть обусловлено его расходом на синтез GSH, поддерживающего и регулирующего окислительно-восстановительный статус клетки. В пользу этого свидетельствует то, что повышение уровня GSH сопровождалось истощением CysGly. Через 7 сут после однократного введения MTX снижались уровни Ser и Gly, но повышался уровень gGluCys. Это может быть связано с восстановлением активности транссульфурирования. Уровни конечных продуктов метаболизма Met (Cys, Tau и GSH) на этом сроке соответствовали контролю, но повышался также уровень промежуточного дипептида в синтезе GSH — gGluCys — тиол-редокс-регулятора, который выполняет антиоксидантную, противовоспалительную, нейро- и гепатопротекторную функции [6, 7].

В плазме крови через 24 ч после однократного воздействия антагониста фолиевой кислоты статистически значимых изменений не наблюдалось, кроме повышения уровня HpTau ($1,20 \pm 0,262$ до $1,92 \pm 0,159$ мкмоль/л, здесь и далее $p < 0,05$). В печени последний имел лишь тенденцию к повышению. Через 7 сут после однократного введения MTX в плазме крови значительно повышались уровни Hcy ($14,0 \pm 2,14$ до $25,2 \pm 3,19$ мкмоль/л) и gGluCys ($4,2 [3,6; 5,3]$ до $5,3 [5,2; 5,6]$ мкмоль/л), что также указывает на вовлечение MTX в нарушение реметилирования либо транссульфурирования, а также функционирования γ -глутамильного цикла.

Заключение. Однократное и повторяющееся введение метотрексата вызывает дисбаланс уровней серосодержащих аминокислот и аминотиолов, а также серина и глицина в плазме крови и печени крыс. Однократное введение метотрексата только через 24 ч вызывает снижение концентрации цистеина и повышение — глутатиона, но не таурина в печени крыс. Последствиями введения однократной дозы метотрексата является гипергомоцистеинемия и нарушение соотношений уровней серина и глицина в печени крыс через 7 сут.

Введение метотрексата через день в течение 7 и 21 сут вызывает обеднение пула аминотиолов плазмы крови и обогащение их пула в печени крыс. На 7-е и 21-е сутки в печени крыс повышается концентрация гомоцистеина и основных продуктов γ -глутамильного цикла (цистеинилглицина, γ -глутамилцистеина и глутатиона), однако уровень таурина повышается только в сроке 7 сут. Таким образом, ингибирование фолатного цикла способно изменять соотношения метаболических путей в обмене ССА, не содержащих фолатзависимых реакций: превращения цистеина, конечные этапы синтеза таурина.

Литература

1. Дорошенко, Е. М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е. М. Дорошенко, В. А. Снежицкий, В. В. Лелевич // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. — 2017. — Т. 15, № 5. — С. 552–553.
2. Дорошенко, Е. М. Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминотиолов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е. М. Дорошенко, Я. И. Новгородская // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2020. — Т. 9, № 1–2. — С. 135–143.
3. PharmGKB summary: methotrexate pathway / T. S. Mikkelsen [et al.] // Pharmacogenet. Genomics. — 2011. — Vol. 21, № 10. — P. 679–686.
4. Новгородская, Я. И. Влияние антагониста фолиевой кислоты метотрексата на концентрации серосодержащих соединений в плазме крови крыс / Я. И. Новгородская, М. Н. Курбат // Весн. Гродз. дзярж. ўн-та імя Янкі Купалы. Серыя 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. — 2018. — Т. 8, № 2. — С. 133–140.
5. Sies, H. Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline / H. Sies, P. Graf // Biochem. J. — 1985. — Vol. 226, № 2. — P. 545–549.
6. Gamma-glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor / R. Quintana-Cabrera [et al.] // Nat. Commun. — 2012. — Vol. 3. — P. 718.
7. γ -glutamylcysteine exhibits anti-inflammatory effects by increasing cellular glutathione level / Y. Yang [et al.] // Redox Biology. — 2019. — Vol. 20. — P. 157–166.

Changes in the pool of sulfur-containing compounds of blood plasma and liver of rats at inhibition of the folate cycle by methotrexate

Novogrodskaya Ya. I., Kurbat M. N.

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

We found both single and repeated administration of methotrexate (MTX) to cause an imbalance of the levels of sulfur-containing amino acids and aminothiols, as well as serine and glycine, in the blood plasma and liver of rats. A single administration of MTX only for 24 hours causes a decreased level of cysteine and increased level of glutathione, but not taurine in rat liver. The consequences of the single administration of MTX are hyperhomocysteinemia and impaired interconversion of serine and glycine in rat liver after 7 days. Administration of MTX every other day for 7 and 21 days causes a depletion of the pool of blood plasma aminothiols and enrichment of their pool in the liver of rats. On 7th and 21 day increase concentration of homocysteine and the main products of the γ -glutamyl cycle (cysteinylglycine, γ -glutamylcysteine and glutathione) in the rat liver, while the level of taurine increased only at 7 days. Thus, inhibition of the folate cycle is able to change the ratio of metabolic pathways in the metabolism of low molecular weight sulfur-containing compounds not containing folate-dependent reactions: cysteine conversion pathways, final stages of taurine synthesis.

Keywords: sulfur-containing amino acids, liver, blood plasma, methotrexate.

Поступила 18.11.2020