

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЗВЯГИНА Валентина Ивановна

РОЛЬ КАРНИТИНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МИТОХОНДРИЙ В
УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДЕФИЦИТА NO (II) И
ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

1.5.4. Биохимия

Научный консультант:
доктор биологических наук
Шумаев Константин Борисович

Рязань – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Современные представления о функционировании митохондрий и путях регуляции их метаболизма в норме и патологии	19
1.2. Формирование АФК и их роль в функционировании митохондрий	29
1.3. NO как активная форма кислорода и его роль в функционировании митохондрий	37
1.4. Влияние гипергомоцистеинемии на метаболизм митохондрий.....	46
1.5. Значение L- карнитина для функционирования митохондрий	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
2.1. Объект наблюдений	63
2.2. Экспериментальные модели.....	64
2.3. Получение материала для исследования	67
2.3.1. Гомогенаты тканей.....	67
2.3.2. Субклеточное фракционирование и получение митохондриальной фракции	68
2.4. Методы определения концентрации метаболитов и активности ферментов ..	68
2.4.1. Определение концентрации белка.....	68
2.4.2. Определение концентрации метаболитов оксида азота	69
2.4.3. Определение концентрации общего и свободного L-карнитина в плазме крови, тканях.....	70
2.4.4. Определение концентрации лактата	71
2.4.5. Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ)	72
2.4.6. Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ).....	72
2.4.7. Определение активности СОД.....	74
2.4.8. Определение активности Н ⁺ -АТФазы	76
2.4.9. Определение концентрации общего гомоцистеина.....	78
2.4.10. Определение синтазы оксида азота I методом ИФА (организм: человек/крыса)	78

2.4.11. Оценка окислительной модификации белков	79
2.5. Статистическая обработка результатов	81
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	82
3.1. Изменения функционирования митохондрий при воздействии модуляторов синтеза оксида азота	82
3.1.1. Характеристика экспериментальных моделей	82
3.1.2. Изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс в условиях экспериментального дефицита NO, вызванного введением L-NAME в дозах 25 мг/кг и 200 мг/кг	83
3.1.3. Воздействие L-аргинина как субстрата NO-синтазы на биохимические показатели в сыворотке крови, митохондриях и цитоплазме клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс на фоне экспериментального дефицита оксида азота	95
3.1.4. Содержание фракций эндогенного карнитина в сыворотке крови, митохондриях и цитоплазме клеток сердца, печени, эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота изолированно и в сочетании с L-аргинином	109
3.1.5. Влияние экзогенного карнитина на функционирование митохондрий в тканях сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота	120
3.2. Изменения функционирования митохондрий при гипергомоцистеинемии ..	143
3.2.1. Характеристика экспериментальной модели	144
3.2.2. Изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина	145
3.2.3. Воздействие L-аргинина на биохимические показатели сыворотки крови, цитоплазмы и митохондрий клеток сердца, печени и эпидидимиса в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии	154
3.2.4. Воздействие экспериментальной гипергомоцистеинемии на содержание фракций эндогенного карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях	

клеток сердца, печени, эпидидимиса изолированно и в комбинации с L-аргинином	166
3.2.5. Воздействие карнитина хлорида на функционирование митохондрий в тканях сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальной гипергомоцистеинемии.....	173
3.3. Сравнительная оценка функциональной активности митохондрий при экспериментальном дефиците NO и гипергомоцистеинемии	191
3.4. Взаимосвязь между уровнем карнитина и метаболитов оксида азота в исследуемых тканях, а также содержанием гомоцистеина в сыворотке крови при изученных патологических состояниях	202
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	209
ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ДАЛЬНЕЙШАЯ РАЗРАБОТКА ТЕМЫ	220
ВЫВОДЫ	222
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	225
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	226
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	228

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Митохондрии являются жизненно важными органеллами эукариотических клеток. Помимо производства энергии и клеточного дыхания, они выполняют и другие ключевые функции, в том числе сигнальные. Митохондрии модулируют клеточный метаболизм, генез активных форм кислорода (АФК), апоптоз, обеспечивают адаптацию к различным стрессам и участие в процессе роста, деления и гибели клеток. Любое нарушение регуляции данных процессов может приводить к возникновению митохондриальной дисфункции. В настоящее время ее значение в развитии широкого диапазона метаболических и дегенеративных заболеваний, старения, патогенеза злокачественных образований, нарушений фертильности, иммунопатологических процессов становится все более очевидной [19, 74, 358]. При этом изучение митохондриальной биологии в нативных физиологических или патологических контекстах, а не в клеточных культурах остается актуальным вопросом [221].

Содержание фракций карнитина (общего, свободного и связанного с различными ацильными остатками) представляет собой компонент, который имеет важное значение для поддержания нормального функционирования митохондрий и участвующий в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма к неблагоприятным воздействиям.

К основным функциям L-карнитина принято относить транспорт остатков жирных кислот внутрь митохондрий, где они окисляются с высвобождением энергии [308]. Наряду с этим, недавно установлено, что L-карнитин может предупреждать развитие митохондриальной дисфункции, ассоциированной с оксидативным стрессом, вызванным различными повреждающими агентами, к которым может относиться и гомоцистеин, однако, механизмы этого остаются неизученными [184, 321, 322, 340]. Накопившиеся научные данные свидетельствуют о том, что активность митохондрий может модулироваться как АФК, так и

оксидом азота (NO)[304, 326]. При окислительном же или нитрозативном стрессе уровни АФК и активных форм азота выходят за пределы физиологического диапазона, что приводит к нарушению редокс-сигнализации и изменению основных функций как митохондрий, так и клетки в целом [155].

Большое значение в регуляции митохондрий придается оксиду азота (II) NO. Это подтверждается и наличием в этих органеллах ферментов его синтеза - NO-синтаз. Увеличение содержания NO в митохондриях вызывает ингибирование тканевого дыхания и, как следствие, окислительного фосфорилирования и инициирует синтез АТФ за счет реакций субстратного фосфорилирования. Кроме того, NO в митохондриях регулирует процессы свободнорадикального окисления. В последние годы появились экспериментальные работы, демонстрирующие взаимосвязь между нарушением NO-сигнализации и развитием митохондриальной дисфункции в условиях изменения гомеостаза карнитина [187], что стало предпосылкой для исследования роли L-карнитина в функционировании митохондрий и перспектив целенаправленного его использования в фармакотерапии заболеваний.

Для более полного изучения регуляторной роли NO в митохондриях важным является исследование факторов, способных оказывать влияние на уровень генерации NO. Одним из них является повышенный уровень гомоцистеина, повреждающее действие которого связывают с активацией окислительного стресса, ведущего к повреждению эндотелия и развитию эндотелиальной дисфункции [149]. При этом системные эффекты, связанные с гомоцистеин - индуцированной митохондриальной дисфункцией в других типах клеток и тканях остаются малоизученными [147, 148].

Прогресс в развитии митохондриально-ориентированной терапии в настоящее время замедлен из-за неполного понимания биологии энергетики клетки и сложных процессов её регуляции [319]. Метаболическое направление лечения митохондриальной дисфункции, позволяющее уменьшить выраженность симптомов заболеваний, пока является малоэффективными [99, 342, 355]. В связи с этим, перспективными представляются исследования, сфокусированные на

применении митохондриально-ориентированных антиоксидантов, способных корректировать сдвиги, вызванные в организме окислительным повреждением и нарушением генерации оксида азота II.

Степень разработанности темы

За последние несколько лет опубликованы работы, в которых предполагается, что снижение митохондриального дыхания и увеличение выработки АФК необязательно сопровождаются проявлениями патологии, а являются адаптационной реакцией митохондрий на возможные негативные воздействия [162]. Причем это касается не только самих АФК, но и других веществ, способных влиять на их образование.

Так, ранее считалось, что лактат вырабатывается как конечный продукт анаэробного гликолитического метаболизма, который экспортируется из тканей и используется для глюконеогенеза в печени. В настоящее время появилось большое количество публикаций, уточняющих это мнение. Так, в связи с этим, George A. Brooks отмечает, что изменение концентрации лактата в клеточных компартментах является одной из форм физиологического сигналинга клеток [82]. Сдвиг в уровне лактата способен 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 [82, 83, 84], поэтому изучение данного аспекта является важным и актуальным на сегодняшний день.

Также большое значение в регуляции функций митохондрий придается оксиду азота (II), образуемому в результате метаболизма L-аргинина при участии NO-синтаз (NOS). Накапливающиеся научные данные свидетельствуют о том, что активность митохондрий может модулироваться оксидом азота (NO) [209, 241, 273]. Являясь ключевым мессенджером в биологических системах, NO опосредует большую часть своей функции посредством активации сигнального

пути циклической гуанилатциклазы и S-нитрозилирования множества белков, участвующих в клеточном функционировании [314].

В этом отношении представляется перспективным исследование функций митохондрий в условиях, связанных также с изменением биодоступности NO (II). Среди факторов, нарушающих регуляторные эффекты NO (II) в настоящее время установлена роль гомоцистеина для митохондрий эндотелия [120, 336]. При этом системные эффекты, связанные с гомоцистеин-индуцированной митохондриальной дисфункцией, остаются малоизученными.

В литературных данных отмечается тесная связь между концентрацией карнитина и функциональным состоянием эндотелия, одним из показателей которого является уровень оксида азота (II) (NO) [187]. Нарушение гомеостаза карнитина может приводить к снижению NO-сигнализации и развитию эндотелиальной дисфункции, хотя механизмы этого взаимодействия остаются неизвестными. Изучение этого вопроса имеет большое значение для уточнения функциональной роли карнитина, его взаимодействия с оксидом азота (II) при различных патологических состояниях и перспектив целенаправленного использования карнитина в фармакотерапии заболеваний.

Таким образом, исследование взаимосвязи активности митохондриальных ферментов, характеризующих функциональное состояние митохондрий, содержания карнитина, лактата и окислительно модифицированных белков с уровнем продукции оксида азота (II) при состояниях, ассоциированных с индуцированным окислительным стрессом, а также поиск факторов, способных оказывать корректирующее воздействие на указанные патологические процессы, представляется актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение. Разработка данного направления способна расширить понимание механизмов действия карнитина и демонстрирует перспективность изучения возможностей его применения в качестве митохондриально-ориентированного антиоксиданта и вещества, способствующего сохранению уровня NO.

Цель исследования: изучить состояние и механизмы изменения

митохондриальной активности и оценить роль карнитина в различных тканях в условиях экспериментально измененной генерации оксида азота и повышенного содержания гомоцистеина.

Задачи исследования:

1. Исследовать изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс в условиях дефицита NO, вызванного метиловым эфиром N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME) и его коррекции субстратом NO-синтаз – L-аргинином.

2. Оценить содержание общего эндогенного карнитина и его фракций в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени, эпидидимиса при экспериментальном дефиците NO и на фоне совместного применения L-аргинина и L-NAME.

3. Изучить влияние экзогенного карнитина на биохимические показатели сыворотки крови, митохондрий и цитоплазмы клеток сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота.

4. Оценить изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина и проанализировать влияние L-аргинина в этих условиях.

5. Исследовать содержание фракций эндогенного карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени, эпидидимиса при экспериментальной гипергомоцистеинемии, а также воздействие на него L-аргинина.

6. Изучить влияние экзогенного карнитина на биохимические показатели сыворотки крови, митохондрий и цитоплазмы клеток сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

7. Сопоставить изменения изучаемых показателей в митохондриях тканей сердца, печени и эпидидимиса, происходящие при экспериментальном дефиците NO и гипергомоцистеинемии. Провести анализ взаимосвязи между уровнем

карнитина и метаболитов оксида азота, а также содержанием гомоцистеина в сыворотке крови в исследуемых экспериментальных моделях.

Научная новизна исследования

Установлено, что дефицит NO, опосредованный введением L-NAME, сопровождается снижением активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах: СДГ и H⁺-АТФазы, что наиболее выражено при использовании высокой дозы L-NAME – 200 мг/кг. Также в этих условиях увеличивается содержание окислительно-модифицированных белков и уменьшается активность супероксиддисмутазы (СОД) митохондрий эпидидимиса. Показано, что наиболее чувствительными к воздействию L-NAME оказались ткани головки эпидидимиса.

Впервые выявлено, что подавление генерации NO ведет к снижению общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов крыс, в митохондриях подобные изменения были зафиксированы только в головке эпидидимиса; введение L-аргинина совместно с L-NAME предупреждает снижение эндогенного уровня общего карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях в клетках исследуемых органов, что было более выражено на фоне использования L-NAME в дозе 200 мг/кг.

Впервые обнаружен ранее неизвестный феномен того, что назначение карнитина хлорида в условиях экспериментального L-NAME-опосредованного дефицита NO приводит к снижению уровня молочной кислоты в цитоплазме клеток печени, головки эпидидимиса, при дозе L-NAME 200 мг/кг также и в сердце. При этом уровень лактата в митохондриальной фракции возрастает в сердце, печени и головке эпидидимиса. Карнитина хлорид способствует повышению концентрации лактата в митохондриях головки эпидидимиса и в условиях гипергомоцистеинемии.

Показано, что экзогенный L-карнитин уменьшает дефицит синтеза NO при совместном введении с L-NAME и предотвращает истощение резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий

сердца и хвоста эпидидимиса, однако значимо не влияет на суммарное изменение окислительной модификации белков.

Выявлено, что гипергомоцистеинемия опосредованная метиониновой нагрузкой приводит к снижению концентрации метаболитов NO как в сыворотке крови, так и в митохондриях исследуемых органов. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается повышением уровня окислительно модифицированных белков с сопутствующим увеличением активности СОД в митохондриях сердца, печени, головки и хвоста эпидидимиса крыс.

Получены новые данные о возможности L-аргинина уменьшать степень выраженности гипергомоцистеинемии и корректировать вызванное индукторами окислительного стресса нарастание содержания окислительно модифицированных белков митохондрий.

Впервые обнаружено, что при тяжелой форме гипергомоцистеинемии происходит значительное снижение уровня общего, свободного и связанного карнитина во всех исследуемых фракциях и органах.

Впервые продемонстрировано, что назначение карнитина хлорида на фоне моделируемой гипергомоцистеинемии предупреждает повышение уровня гомоцистеина в сыворотке крови и сопровождается нарастанием концентрации метаболитов оксида азота во всех исследуемых фракциях и органах, за исключением хвостовой части эпидидимиса.

Обнаружено наличие сильной положительной взаимосвязи между уровнем NO и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, между содержанием NO и концентрацией свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме головки эпидидимиса. Выявлено, что между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови и в митохондриальной фракции сердца и головки эпидидимиса обнаружена сильная, а в печени и хвосте средняя отрицательная корреляционная связь.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленные в процессе данного исследования результаты расширяют фундаментальные знания о биологической роли L-карнитина в условиях сниженной генерации NO, индуцированной применением конкурентного ингибитора NO-синтаз - L-NAME и гипергомоцистеинемией, вызванной метиониновой нагрузкой.

Выявленные в исследовании схожие паттерны изменений активности митохондриальных ферментов и содержания карнитина, лактата и окислительно-модифицированных белков под действием неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME и гомоцистеина позволяют предположить, что изменение метаболизма NO создает предпосылки для нарушения редокс-регуляции митохондрий различных тканей.

Описанные протективные эффекты L-карнитина, связанные с его способностью уменьшать степень выраженности гипергомоцистеинемии и увеличивать утилизацию лактата в качестве энергосубстрата митохондриями в условиях ограничения β -окисления жирных кислот, возможностью повышать уровень метаболитов NO на фоне экспериментального снижения генерации NO, способностью уменьшать окислительную модификацию белков и повышать активность СОД дополняют представления о его биологической роли и могут быть использованы для разработки новых подходов терапевтической коррекции различных патологических состояний.

Полученные в ходе диссертационного исследования данные указывают на то, что L-аргинин также способен уменьшать повышенный уровень гомоцистеина, опосредованный длительным введением метионина в высокой дозе, и проявлять антиоксидантные свойства, уменьшая выраженность окислительного дистресса.

Таким образом, выявлены убедительные предпосылки для изучения возможности использования L-карнитина в качестве терапевтического средства, при состояниях, связанных с развитием вторичной митохондриальной дисфункции, ассоциированной с дефицитом синтеза NO (II).

Методология и методы исследования

Исследование носило экспериментальный характер и выполнялось путем моделирования патологий, сопровождающихся снижением генерации NO (II) и гипергомоцистеинемией с последующим развитием окислительного стресса. В дальнейшем была выполнена оценка состояния энергетического обмена, маркеров интенсивности окислительной модификации белков, баланса карнитина и уровня метаболитов оксида азота. Также, в работе назначался L-аргинин в качестве субстрата NO-синтазы для возможного повышения генерации NO. Для уточнения роли L-карнитина на фоне моделей экспериментального дефицита оксида азота и гипергомоцистеинемии применялся карнитина хлорид. Объектом исследования являлись конвенциональные половозрелые крысы Wistar. Содержание животных, постановка и выведение из эксперимента, а также получение материалов для исследований полностью соответствовало нормативным документам, принятым комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 16 от 08.12.2018). При выполнении аналитической части работы использовались биохимические методы: колориметрия, спектрофотометрия, иммунохимические методы, применялось дифференциальное центрифугирование.

Обработка полученных результатов проводилась с использованием прикладных программ: Microsoft Office Excel 2013, «StatSoft Statistica 10.0», «GraphPad Prism 9.0». Подготовка иллюстраций и графиков осуществлялась с помощью интернет-ресурса «BioRender.com», приложения «GraphPad Prism 9.0».

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также используются в работе Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская

клиническая больница № 11», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница», а также внедрены в производство ЗАО «ЭКОлаб».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспериментальная модель снижения генерации NO, опосредованная индуцированным L-NAME ингибированием NO-синтаз у крыс, связана с увеличением окислительного повреждения белков и уменьшением интенсивности тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца, головки и хвоста эпидидимиса; введение L-аргинина на фоне L-NAME препятствует накоплению окислительно модифицированных белков и способствует сохранению интенсивности тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях исследуемых органов.

2. При опосредованном L-NAME дефиците NO снижается содержание общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов, в митохондриях - снижение уровня карнитина отмечаются только в головке эпидидимиса. Введение аргинина предупреждает снижение общего карнитина в сыворотке крови, цитоплазме клеток и митохондриях всех исследуемых органов.

3. Использование L-карнитина на фоне экспериментального дефицита NO, вызванного L-NAME в дозе 200 мг/кг, приводит к повышению уровня метаболитов NO в митохондриях всех исследуемых органов и способствует росту концентрации лактата в митохондриях сердца и печени.

4. Экспериментальная модель тяжелой гипергомоцистеинемии, развивающаяся при метиониновой нагрузке, сопровождается уменьшением уровня метаболитов NO и увеличением содержания окислительно модифицированных белков в митохондриях сердца, печени и головки эпидидимиса. Введение L-аргинина снижает степень выраженности гипергомоцистеинемии и предупреждает окислительную модификацию белков митохондрий исследуемых органов крыс.

5. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается значительным уменьшением уровня общего, свободного и связанного карнитина во всех исследуемых фракциях и органах. Применение L-аргинина на фоне сниженной генерации NO при гипергомоцистеинемии предотвращает снижение уровня эндогенного общего карнитина в сыворотке крови и митохондриальной фракции изучаемых органов.

6. Применение экзогенного L-карнитина в условиях тяжелой формы экспериментальной гипергомоцистеинемии, приводит к уменьшению ее выраженности и увеличению содержания метаболитов NO в изучаемых тканях, при сопутствующем повышении уровня митохондриального лактата в головке эпидидимиса.

7. Между уровнем метаболитов NO и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, содержанием метаболитов NO и концентрацией свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме клеток головки эпидидимиса существует сильная положительная корреляционная взаимосвязь. Между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови, митохондриях сердца и головки эпидидимиса обнаружена сильная отрицательная корреляционная связь.

8. На основании проведенных исследований выдвигается предположение о протекторной роли L-карнитина, способствующей как поддержанию уровня метаболитов NO в условиях модели L-NAME-опосредованного дефицита NO и гипергомоцистеинемии, так и снижению содержания гомоцистеина в модели гипергомоцистеинемии, вызванной метиониновой нагрузкой.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов работы обусловлена достаточным количеством экспериментальных наблюдений, корректностью выполнения моделирования, применением современных биохимических методов исследования, способов статистической обработки и обоснования полученных результатов и выводов.

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на: IX Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем здравоохранения» (Астрахань, 2013); Всероссийской научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Экспериментальная и клиническая фармакология: научные чтения» (Рязань, 2013); XII Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, 2013); Международной научно-практической конференции «Медицинские науки: прошлое, настоящее, будущее» (Уфа, 2014); 10-й юбилейной Международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Абхазия, 2014); XXIII Международной конференции и дискуссионном научном клубе «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Крым, Ялта-Гурзуф, 2015); XIV Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при патологии и адаптации. Дни молекулярной медицины на Дону» (Ростов-на-Дону, 2015); Всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием, посвященная 150-летию ак. Н.П. Кравкова «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2015); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: Новое в коагулологии. Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени И.П. Павлова, посвященной 65-летию работы университета на Рязанской земле (Рязань, 2015); VII Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2015); Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика Е.А. Строева» (Рязань, 2016); Межрегиональной научно-практической конференции: «Мужское здоровье: новые аспекты актуальной медицинской проблемы» (Рязань, 2017); 11-й

международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук – основа формирования современной медицины» (Астрахань, 2018); X Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Витебск 2018); V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Орехово-Зуево, 2018); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований и клинической практике. Традиции и перспективы» (Тюмень, 2019); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященная Году науки и технологий «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Электрогорск, 2021 года); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е. А. Строева» (Рязань, 2022); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященная Году педагога и наставника «Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее» (Орехово-Зуево, 2023);

Личный вклад соискателя

Участие автора представленной работы заключалось в формировании идеи, анализе литературных данных по планируемой теме, организации исследования, создании дизайна исследования, постановке целей и задач, выполнении экспериментальной части работы, статистической обработке полученных данных, интерпретации результатов, подготовке публикаций по диссертационной работе, формулировке научных положений и выводов. В целом, личное участие автора составляет около 90%. Соавторы исследований указаны в публикациях.

Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ и за счет бюджетных средств ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Иных финансовых и других конфликтных интересов получения вознаграждения ни в какой форме от фирм-производителей лабораторного и диагностического оборудования нет.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 40 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 14 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 7 – в изданиях, индексируемых в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus.

Объём и структура диссертации

Диссертация представлена на 270 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, практических рекомендаций, выводов, списка условных сокращений, списка литературы, содержит 78 рисунков и 35 таблиц. Список литературы включает 364 источника, из них 34 отечественных и 330 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о функционировании митохондрий и путях регуляции их метаболизма в норме и патологии

Митохондрии играют жизненно важную роль в клеточном гомеостазе. В них функционирует механизм окислительного фосфорилирования, связанный с аэробной генерацией АТФ, и обеспечивающий 90% потребности клетки в энергии. Также они являются хабом для множества метаболических путей, таких как β -окисление жирных кислот и циклы Кребса, синтеза мочевины. Кроме того, митохондрии обладают важной биосинтетической активностью, принимают участие во внутриклеточном метаболизме Ca^{2+} и передаче сигналов, регулируют термогенез, генерируют большинство клеточных активных форм кислорода (АФК) и служат иницирующим звеном для программированной клеточной смерти (апоптоза) [296]. Таким образом, очевидно, что митохондрии являются одними из первых, реагирующих на различные стрессорные воздействия, нарушающие гомеостаз клетки и организма.

Сложная сигнальная сеть позволяет им оценивать изменения внутренней и внешней окружающей среды и соответствующим образом регулировать свои биоэнергетические, термогенные, окислительные и/или апоптотические реакции, направленные на восстановление гомеостаза. Стойкое нарушение функций митохондрий - митохондриальная дисфункция все чаще рассматривается в качестве компонента как острых, так и хронических аллостатических состояний [210, 236].

Именно митохондрии в первую очередь отвечают за удовлетворение энергетических потребностей в жизненно важных тканях путем окисления большого количества субстратов, которые становятся доступными в результате мобилизации энергии из запасяющих веществ, в условиях, вызванных различными неблагоприятными факторами [138]. Кроме того, митохондрии контролируют реакцию на лихорадку, модулируя термогенез, уравнивают

иммунный ответ на инфекцию, регулируя судьбу пораженных клеток и формируя ответную реакцию на окислительный стресс в цитопротекторных, защитных или сигнальных целях [211, 272]. Несмотря на повышающиеся возможности применяемых методов, то, как митохондрии реализуют свои адаптивные возможности, остается малоизученным процессом и это в целом и явилось предпосылкой для выполнения данного научного эксперимента.

Митохондриальный ответ на изменившиеся клеточные потребности включает сеть ядерных и митохондриальных сигнальных путей (Рисунок 1), направленных на: (1) повышение производительности митохондрий за счет привлечения большего количества митохондрий (биогенез) и/или увеличения их объема; (2) усиление экспрессии субъединиц окислительного фосфорилирования; (3) точное регулирование разобщения дыхательной цепи с последующим выделением энергии в виде тепла; (4) облегчение передачи сигнала в ядра и других внутриклеточных органелл; (5) генерирование АФК для передачи сигналов или защиты; и (6) индуцирование апоптотического каскада в зависимости от природы стрессового фактора [138].

Фундаментальным процессом, лежащим в основе широко изученных клеточных адаптаций, является транскрипционная регуляция геномных элементов или изменения экспрессии генов. Это включает в себя либо активацию, либо подавление определенных генов или группы генов, которые кодируют белки, а те, в свою очередь, определяют и поддерживают функционирование клетки [212].

Скоординированная индукция генов, участвующих в энергетическом метаболизме, требует регуляции транскрипции как в митохондриальной, так и в ядерной ДНК, которая регулируется двумя факторами транскрипции: TFAM и TFB, последний, имеет две изоформы, TFB1 и 2. Они инициируют только транскрипцию генов, кодируемых мтДНК, и дают начало 13 эндогенным митохондриальным белкам [100, 140].

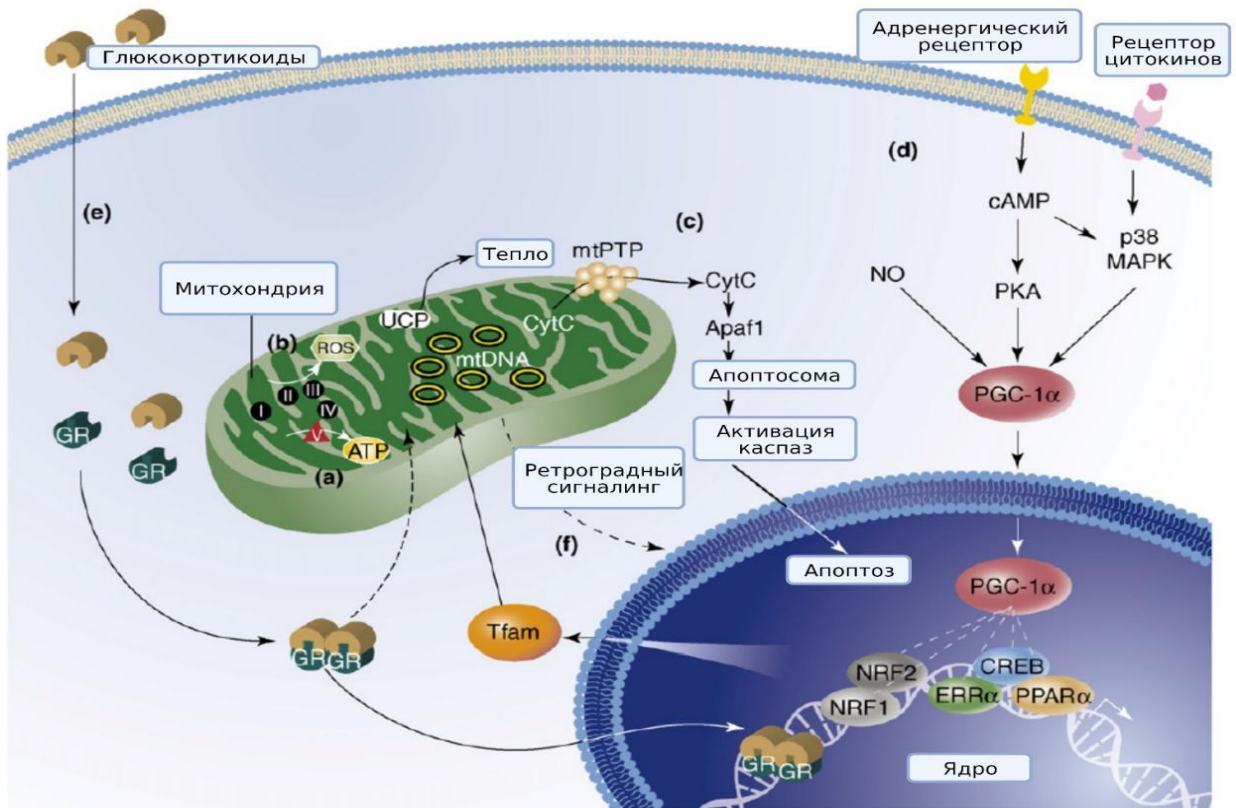


Рисунок 1 – Функции митохондрий и сигнальная сеть (цит. по: Manoli S.A., 2007) [210]

Регуляция ядерных генов, кодирующих приблизительно 1500 мигрирующих белков, которые модулируют разнообразные функции митохондрий, достигается семейством коактиваторов рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR). Наиболее изученным членом этого семейства является PPAR-коактиватор 1α (PGC-1α). Предполагается, что пути, регулирующие экспрессию ядерных кодируемых митохондриальных факторов, сходятся в PGC-1α, поэтому его называют главным регулятором митохондриального биогенеза [271].

Воздействие различных стрессоров, таких как холод, голодание, физические упражнения и т.д. активирует PGC-1α несколькими сигнальными путями, включая β-адренергический (β3/cAMP), Ca²⁺-зависимый (кальциневрин А и кальций–кальмодулин-зависимой протеинкиназы, CaMK), оксида азота (NO/цГМФ) и AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) пути [210, 282]. Исследования показали, что PGC-1α может быть использован в различных тканях

с различными коактиваторами для индуцирования изменений в окислении липидов, энергетическом гомеостазе, массе митохондрий и чувствительности к инсулину [116, 207, 254, 258].

Так, фактор транскрипции, PGC-1 α может связываться с такими мишенями, как PPAR α , PPAR β/δ и PPAR γ , которые координируют экспрессию митохондриальных генов и косвенно способствуют транспорту и утилизации жирных кислот [196].

PGC-1 α способен активировать группу факторов транскрипции, включая ядерные респираторные факторы 1 и 2 (Nrf-1 и-2), которые контролируют экспрессию генов, кодирующих субъединицы цитохрома с и цитохром-с оксидазы [129, 142]. Nrf2 принадлежит к семейству белков, которые связывают последовательности ДНК, богатые гуанином и аденином. Nrf1 управляет экспрессией ядерных генов процесса окислительного фосфорилирования, а также экспрессией ядерных кодируемых факторов, участвующих в митохондриальной транскрипции, импорте и сборке белка [343]. Сайты связывания Nrf2 также идентифицированы в нескольких других митохондриальных генах, включая субъединицы OXPHOS, механизм импорта митохондриальных белков и митохондриальные факторы трансляции [143]. В регуляции митохондриальных генов участвуют и другие факторы транскрипции, среди них эстроген-родственный рецептор α (ERR α), рецепторы щитовидной железы, глюкокортикоидов и ретиноидов, белок, связывающийся с цАМФ - чувствительным элементом (CREB) и транскрипционный фактор *yin yang 1* (YY1) [295], которые вместе вносят значительный вклад в регуляцию митохондриального биогенеза и путей окисления жирных кислот [249, 271].

Адаптация к стрессу, или аллостаз требует энергии: энергозависимые ферментативные реакции, транскрипция и трансляция, обеспечивающие экспрессию генов и синтез белка, высвобождение и обратный захват нейротрансмиттеров, биосинтез гормонов, симпатическую активацию, поведенческую адаптацию и долгосрочную структурную перестройку органов и

тканей - все это функционирует, и в какой-то степени регулируется уровнем клеточной энергии.

Для достижения взаимосвязи энергетического состояния и клеточного поведения, информация о клеточной среде преобразуется через механизмы сигнальной трансдукции в метаболические промежуточные продукты (ацетил КоА, α -кетоглутарат, сукцинат, НАД⁺) и АФК, которые достигают ядра [49, 301], где митохондриальные метаболические промежуточные продукты взаимодействуют с геномом и способствуют активации или подавлению экспрессии генов двумя основными способами.

Во-первых, метаболиты влияют на взаимодействие факторов транскрипции и коактиваторов со специфическими генетическими элементами, которые воздействуют на формирование транскриптов (матричная РНК, мРНК) [144]. Например, во время гипоксии митохондрии перемещаются ближе к ядру, где происходит закисление среды посредством производства АФК, что способствует активации гипоксии-индуцируемого фактора - 1 α (HIF-1 α) [255]. Дефицит энергопродукции также активирует специфические сенсоры уровня цитоплазматической АТФ (mTORC1, AMPK) и их последующие транскрипционные коактиваторы (например, PGC-1 α), и факторы транскрипции (например, PPAR γ), которые оказывают дальнейшее влияние на экспрессию ядерных генов.

Во-вторых, для преобразования метаболических сигналов в транскрипционные изменения включаются эпигенетические модификации, вызванные ацетилированием, метилированием, фосфорилированием, сукцинированием, убиквитинированием и др., составляющие основу эпигенетического «кода» [111, 200, 267, 302, 337]. Химические модификации гистонов в определенных локусах генома могут либо подавлять, либо облегчать экспрессию данных генов, в зависимости от природы, местоположения и конкретных комбинаций эпигенетических меток.

Интересно, что метаболические промежуточные продукты, которые являются субстратами или кофакторами для эпигенетических модификаций,

получены из цикла Кребса и других метаболических путей в митохондриях [39, 205]. Например, цитрат, который продуцируется митохондриальным ферментом цитратсинтазой, экспортируется из митохондрий в цитоплазму. Там цитрат трансформируется в ацетил-КоА АТФ-цитрат-лиазой, а затем служит субстратом для ацетилирования гистонов [66]. Нормальный митохондриальный метаболизм необходим для ацетилирования гистонов, а также функции NF-1 α и пролиферации клеток [327]. С другой стороны, удаление эпигенетических меток также требует митохондриальных субстратов. Реакции деметилирования гистонов и ДНК могут протекать только в присутствии кофактора α -кетоглутарата [173], также метаболического промежуточного звена цикла Кребса.

Интересна также роль лактата как метаболического сигнала в адаптивном ответе митохондрий. В настоящее время она остается все еще малоизученной *in vivo*. Исторически сложилось так, что, когда в органах, тканях и клеточных компартментах наблюдались высокие уровни лактата, это интерпретировалось только с точки зрения дефицита кислорода для поддержания процессов анаэробного дыхания и энергопродуцирующей функции митохондрий.

К сожалению, взгляд на лактат лишь как на побочный продукт метаболических реакций в настоящее время вводит в заблуждение относительно физиологической роли лактата, поскольку наблюдаемые события на самом деле являются реакцией напряжения на стресс [82]. Величина и диапазон скоростей выработки и накопления лактата, а также соотношение лактат/пируват и окислительно-восстановительных процессов в клетках являются физиологически значимыми. Перемещение лактата между клетками-производителями и клетками-потребителями выполняет по меньшей мере три цели: 1) основной источник энергии; 2) основной глюкогеногенный предшественник; и 3) сигнальная молекула. Важно также отметить, что лактат (а не пируват) поступает в митохондриальный ретикулум для поддержания энергетического гомеостаза клеток путем окислительного фосфорилирования АДФ [84]. С этой целью на внутренней стороне внешней митохондриальной мембраны присутствует специальный митохондриальный комплекс окисления лактата (mLOC), который содержит

несколько основных компонентов его окисления: монокарбоксилатный транспортер¹ (MCT¹), мембранный шаперон-базигин (BSG или CD147), ЛДГ и цитохромоксидазу [23, 83]. Окисление митохондриального лактата до пирувата осуществляется в митохондриальном межмембранном пространстве. Вопрос о том, протекает ли окисление лактата в матриксе митохондрий, остается в настоящее время открытым. G. Brooks et al. (2020) не исключает такой возможности, В. Glancy (2021) считает, что такая реакция термодинамически не выгодна, а повышение лактата в матриксе митохондрий способствует рассеиванию митохондриального потенциала и инициации активации окислительного фосфорилирования [82, 217].

Когда интенсивность аэробных процессов в клетке высока, лактат, вырабатываемый клетками-производителями, секретируется в интерстиций и кровотоков, откуда он может достигать различных клеток-реципиентов, таких как сердце, печень, почки и мозг. В различных тканях лактат действует путем различных воздействий: окислительно-восстановительной регуляции клеток, генерации АФК, аллостерического связывания и лактилирования гистонов, путем ингибирования липолиза в жировой ткани через связывание рецептора гидроксикарбоновой кислоты 1 (HSCAR-1) и активацию CREB и поглощение жирных кислот митохондриями тканей через малонил-КоА и КПП₁ [82]. Однако механизмы, с помощью которых изменения лактатных состояний влияют на установление различных функциональных адаптивных состояний, в значительной степени нехарактерны. Посттрансляционные модификации гистонов создают код, который функционирует как ключевой датчик метаболизма и отвечает за преобразование метаболических изменений в стабильные паттерны экспрессии генов. Так, исследование метаболитов при аденокарциноме протоков поджелудочной железы показало, что полученный из опухоли лактат, способствует увеличению продукции α -кетоглутарата мезенхимальными стволовыми клетками [180], который необходим при деметилировании гистонов и ДНК. Кроме того, было обнаружено, что лактат является эндогенным ингибитором гистондеацетилазы - HDAC [179]. Добавление лактата снижает

содержание ядер и активность HDAC, а также метилирование и уплотнение хроматина [179]. В настоящее время подтверждается идея о том, что поступление лактата, связанное с эпигенетическим перепрограммированием, ассоциировано с исходами болезненных состояний, таких как прогрессирование рака и лекарственная устойчивость [181].

Таким образом, лактат является основой метаболической регуляции *in vivo*, и является не только источником энергии, но и может также запускать несколько тканеспецифических механизмов, которые способны приводить к активации различных сигнальных путей.

Как обсуждалось выше, эволюционно сформировалась сложная система контроля качества митохондрий, которая действует для элиминации дисфункциональных органелл и обеспечения целостности митохондрий. Если эти меры контроля качества не способны восстанавливать гомеостаз митохондриального белка (протеостаз), в качестве последней линии защиты могут быть активированы пути апоптоза [50, 146]. Все эти процессы интегрированы в клеточную сеть, которая обеспечивает сохранение здоровой популяции митохондрий и поддержание биоэнергетического потенциала.

Митохондрии существуют как отдельные органеллы, так и тесно связанные сети, которые постоянно трансформируются посредством слияния и деления, что помогает им обеспечивать сохранение здоровой популяции митохондрий и поддержание биоэнергетического потенциала [31].

Эта сеть, по существу, состоит из кодируемых ядром белков, экспрессия которых зависит от соответствующей связи между митохондриями и ядром, так называемой митоядерной связи, которая позволяет митохондриям сигнализировать о своем метаболическом и физическом состоянии ядру (и наоборот) и способствовать эффективному ответу для поддержания жизнеспособности митохондрий, клеток и организмов [37, 210, 272, 292]. Существует несколько типов механизмов передачи сигналов, которые координируют эту связь: антероградный (сигналы, посылаемые из ядра в митохондрии) и ретроградный (сигналы, посылаемые из митохондрий в ядро)

сигнальные пути, интегрированная реакция на стресс и неклеточно-автономная коммуникация.

Антероградный сигнальный путь активируется множеством сенсоров, которые обнаруживают изменения в метаболических условиях клетки и позволяют митохондриям адаптировать свою биоэнергетическую и биосинтетическую продукцию к различным потребностям клетки. Это требует активации нескольких закодированных в ядре 12 факторов транскрипции и коактиваторов, которые индуцируют экспрессию генов мтДНК и регулируют ядерно-кодируемый митохондриальный протеом (Рисунок 2).

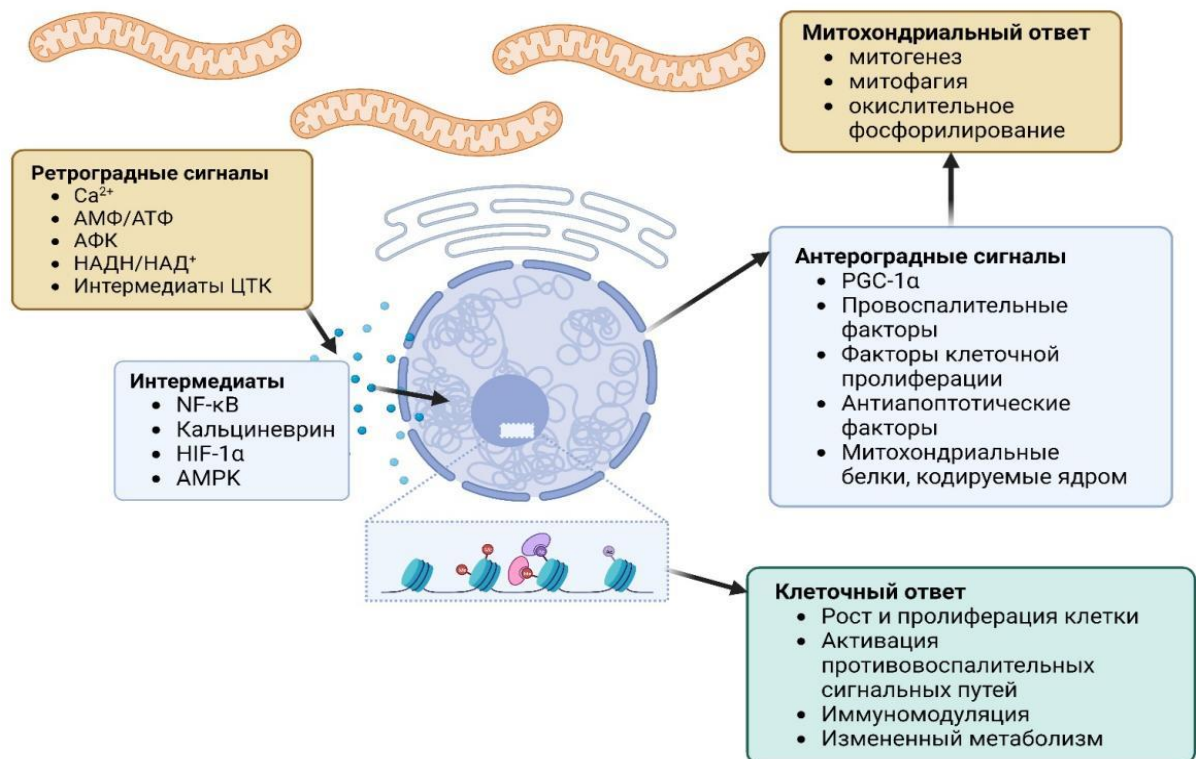


Рисунок 2 – Передача сигналов от митохондрий к ядру и наоборот

(цит. по: Walker B.R., 2022) [354] Рисунок выполнен с помощью

BioRender.com.(Лицензионное соглашение SY25SLSI3W)

В то же время окислительный стресс может быть следствием митохондриальной дисфункции, когда количество патологических митохондрий превышает некоторый порог - threshold effect, при этом активируется

ретроградная сигнализация для передачи ядру сигналов о метаболическом и функциональном состоянии митохондрий [224].

Этот адаптивный ответ индуцирует организованную экспрессию ядерных генов и активацию альтернативных метаболических путей в попытке восстановить митохондриальный гомеостаз и избежать дальнейших нарушений всего клеточного метаболизма. Существование митохондриального ретроградного сигнала, по-видимому, зависит от снижения мембранного потенциала митохондрий и продукции АФК [165, 354]. Фактически ряд метаболитов, продуцируемых или контролируемых митохондриями, включая АТФ, ацетил-КоА, НАД⁺ и АФК, могут регулировать транскрипцию ядерных генов [50, 354]. Таким образом, эти метаболиты могут запускать различные ретроградные сигнальные пути, которые, в свою очередь, активируют клеточные процессы, способствующие восстановлению митохондриального гомеостаза и стимулирующие клеточное выживание.

Интегрированная стрессовая реакция (ISR) представляет собой общую клеточную реакцию, модулирующую глобальный синтез белка. Хотя ISR не рассматривается как типичный ретроградный ответ, некоторые исследователи сообщали о его активации в ответ на дефекты митохондрий [281]. Этот сигнальный путь также запускается стрессовыми стимулами, такими как реакция на UPR_{mt} (mitochondrial unfolded protein response), дефицит питательных веществ и метаболический дефицит [103, 112]. Эти стрессоры воспринимаются различными киназами, которые сходятся на фосфорилировании α -субъединицы эукариотического фактора инициации трансляции 2 (eIF2 α), который интегрирует сигналы для уменьшения процессов, потребляющих АТФ, таких как синтез белка, и для облегчения экспрессии набора ядерных генов с целью восстановления клеточного гомеостаза [272, 350].

Внеклеточно-автономная коммуникация. Как обсуждалось выше, митохондриальная дисфункция способна вызвать ретроградный ответ митохондрий в форме UPR_{mt} [225], который, в свою очередь, может инициировать вторичные реакции UPR_{mt} в клетках / тканях пострадавших от

первоначального стрессового события. Например, у *C. elegans* индукция UPR_{mt} в нервной системе активирует ту же реакцию в кишечнике [118]. Дюрье и его коллеги выдвинули гипотезу, что распространение этого ответа на дистальные ткани происходит с помощью растворимых факторов, обозначенных как "митокины" [118]. В итоге, было продемонстрировано, что ряд митокинов вырабатывается и секретируется в ответ на митохондриальный стресс, и некоторые из этих митокинов кодируются в ядре и экспрессируются в ответ на UPR_{mt} [118, 225, 360]. К ним относятся: Фактор роста фибробластов (FGF) 21 [131] и Фактор дифференцировки роста (GDF) 15 [137]. Митокины действуют эндокринным, паракринным и аутокринным образом на различные органы-мишени и способствует множеству эффектов, включая устойчивость к ожирению, вызванному диетой, улучшенную толерантность к глюкозе и потерю веса [67]. На клеточном уровне митокины, по-видимому, обладают общей способностью защищать от апоптоза и АФК, тем самым повышая жизнеспособность клеток [67, 130, 137, 146, 192].

Таким образом, можно сказать, что митохондрии действуют как внутриклеточные процессоры стрессовых сигналов, способные генерировать различные мультисистемные паттерны стресс-реакций и запускать адаптивные механизмы функционирования митохондрий или в критических ситуациях инициировать программируемую клеточную смерть.

1.2. Формирование АФК и их роль в функционировании митохондрий

Как активные формы кислорода (АФК), так и активные формы азота (АФА) в совокупности составляют свободные радикалы и выполняют двойную роль для живой системы. При умеренной или низкой концентрации они оказывают благотворное воздействие и участвуют в различных физиологических функциях, таких как иммунная (то есть защита от патогенных микроорганизмов), выполняют ряд клеточных сигнальных путей, контролируют митогенный ответ и

окислительно-восстановительную регуляцию, участвуют в регуляции программируемой гибели клеток [163, 361].

Но при более высокой концентрации как АФК, так и АФА генерируют окислительный и нитрозативный стресс, вызывая потенциальное повреждение биомолекул. Окислительный и нитрозативный стресс также может развиваться и при дефиците ферментативных и не ферментативных антиоксидантов. В настоящее время предложены термины: «окислительный эустресс» и «окислительный дистресс» [237, 305, 306, 307]. Окислительный эустресс отражает адаптивные клеточные реакции, вызываемые АФК, тогда как последний термин относится к продукции АФК за пределами полезного физиологического диапазона, приводящего к повреждению клеток и развитию заболеваний.

Важно отметить, что при нынешнем уровне знаний трудно оценить различие между физиологической передачей сигнала (эустрессом) и патологической сигнализацией (дистрессом).

АФК образуются в результате одноэлектронного переноса от окислительно-восстановительного донора к молекулярному кислороду (O_2). При этом первоначально формируется анионный свободнорадикальный супероксид, который может быть преобразован в перекись водорода при участии супероксиддисмутазы. Гидроксильный радикал - это еще одна АФК, которая может образовываться, например, путем катализируемого металлом окисления перекиси водорода [305].

Комплексы I и III дыхательной цепи часто рассматриваются как основные места производства mtROS [72, 76, 114, 270, 347], но более поздние исследования показывают, что по меньшей мере десять других митохондриальных ферментов также вносят свой вклад в образование АФК, включая комплекс II [311]. Вполне вероятно, что различные участки производства mtROS играют различную сигнальную роль, и первичные участки производства могут изменяться при различных физиологических условиях [299, 311].

Считается, что основной функцией комплекса II является поддержание восстановленного состояния интегрального мембранного Q пула [260].

Полностью восстановленный КоQ, как было показано, функционируют в качестве антиоксиданта, защищая митохондриальные липиды и белки от повреждения конститутивно синтезируемых активных форм кислорода, в то время как полувосстановленная форма (семиубихинон) является проокислителем и генератором свободных радикалов [97]. С другой стороны, комплекс II может выступать в качестве супрессора или энхансера генерации АФК другими комплексами дыхательной цепи [166, 216]. Его деятельность регулируется концентрацией сукцината [41, 163], а так как комплекс II напрямую связывает дыхательную цепь и цикл трикарбоновых кислот, то промежуточные продукты цикла Кребса - особенно оксалоацетат, могут выступать как эндогенные ингибиторы комплекса II [97]. Активация же комплекса II наблюдается при 1) увеличении образования ацетил-КоА, который будет содействовать устранению накопившегося оксалоацетата, и, в свою очередь, снимать ингибирование комплекса II. И (2) ингибировании комплекса I, при этом соотношение НАДН / НАД⁺ будет сдвигаться в сторону НАДН₂ и оксалоацетат не сможет быть получен из малата [97].

Механизмы того, как определенные дегидрогеназы в митохондриальном матриксе могут образовывать супероксид, еще недостаточно изучены [75], но, тем не менее, в литературе имеется большое количество работ, указывающих на возможность образования окислителей митохондриальными ферментами. К ним относятся 2-оксоглутарат и пируватдегидрогеназные комплексы (АФК продуцируют участки, содержащие дигидролипоат) [85, 348], глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, аконитаза, длинноцепочечная дегидрогеназа жирных кислот, дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью [202], НАДФ⁺-оксидазы [297], белок р66^{shc}. [318].

Являясь инициаторами, преобразователями или модификаторами клеточных реакций, свободные радикалы занимают значительное место в сложной системе передачи информации к клеточным мишеням.

В настоящее время достоверно известно о, по крайней мере, двух механизмах, посредством которых АФК инициируют клеточную сигнализацию, а

именно, 1) изменения внутриклеточного редокс-состояния и 2) модификация белковых молекул [159].

Механизм поддержания митохондриального редокс-статуса в физиологических условиях можно представить следующим образом: образование O_2^- напрямую зависит от (1) Δp , локальной концентрации O_2 и соотношений окислительно–восстановительных донорно-акцепторных пар НАДН/НАД⁺ и пула кофермента (КоQH₂/КоQ) [232]. В условиях, когда клеточный спрос на АТФ равен его производству, митохондриальный Δp рассеивается комплексом V и, таким образом, остается относительно деполяризованным. Соотношение НАДН/НАД⁺ также снижается из-за потока восстановительных эквивалентов от НАДН в дыхательную цепь. Наконец, дыхание потребляет O_2 , снижая его локальную концентрацию. Это сочетание условий сводит к минимуму образование АФК [114]. При нарушении любого из этих условий возможность генерации АФК возрастает.

Все больше доказательств, которые показывают, что АФК могут приводить к обратимой посттрансляционной модификации белков, регулирующих сигнальные пути [87]. В частности, H_2O_2 может окислять тиоловые группы (-SH) остатков цистеина в форму сульфеновой кислоты (-SOH), которая может прореагировать с глутатионом (GSH), с тиолами, с образованием дисульфидной связи (-SS-), или с амидами: синтезируется сульфенил амид (-SN-) [132]. Каждая из этих модификаций может изменять активность белка-мишени, тем самым нарушая функцию сигнального пути. Например, система Nrf2–Keap1 является примером физиологического сенсорно-эффекторного устройства на основе тиола, реагирующего на окислительную реакцию и играющего роль в поддержании окислительно–восстановительного гомеостаза у эукариот [247]. Keap1 функционирует, как ингибитор Nrf2, и содержит несколько остатков цистеина, которые могут быть подвержены окислению, приводящему к конформационному изменению Keap1, и предотвращению убиквитилирования Nrf2, тем самым увеличивая его стабильность и позволяя его последующую транслокацию в ядро,

где он служит фактором транскрипции для экспрессии ряда белков антиоксидантной защиты.

Фосфатазы также подвержены регулированию АФК, поскольку они обладают реакционным цистеином в их каталитическом домене, который может обратимо окисляться, что ингибирует их дефосфорилирующую активность [151, 344].

Необратимые модификации белков сопровождаются агрегацией, фрагментацией, деградацией с последующей потерей функциональной активности белка и включают в себя карбонилирование, нитрозилирование, разрыв гистидинового и триптофанового колец [203].

В частности, наиболее распространённой окислительной модификацией белков (ОМБ) является карбонилирование белка, в ходе которого образуются реакционноспособные карбонильные части белка, такие как альдегид, кетон или лактам. Их формирование возможно при помощи различных механизмов: при окислительном расщеплении белковой цепи, при окислительном дезаминировании лизина. Кроме того, атака радикалов $\text{HO}\cdot$ на боковые цепи пролина, лизина, аргинина и треонина также может приводить к образованию карбонильных групп [193].

Мишенями для карбонилирования могут служить важнейшие ферменты митохондрий, в том числе сукцинатдегидрогеназа, H^+ -АТФ-синтаза, СОД [45, 89, 134].

Измерение уровня карбонильных производных в белках является наиболее широко используемым маркером их окислительного повреждения [128, 203]. Кроме того, ОМБ имеет некоторые преимущества по сравнению с измерением других продуктов окисления из-за относительного раннего образования и достаточной стабильности карбонилированных белков [47]. Уровень карбонильных производных белка увеличивается с возрастом и повышается при некоторых патологических состояниях [16, 47, 69, 145, 316]. Поэтому изучение характера и количества образующихся окислено-модифицированных продуктов

белков может иметь прогностическое значение при лечении ряда заболеваний человека и животных, а также использоваться с профилактическими целями.

Внутриклеточные уровни АФК контролируются сложным набором систем антиоксидантной защиты, которые включают супероксиддисмутазы, каталазу, систему глутатионпероксидазы/редуктазы и систему пероксиредоксина /тиоредоксина (Рисунок 3).

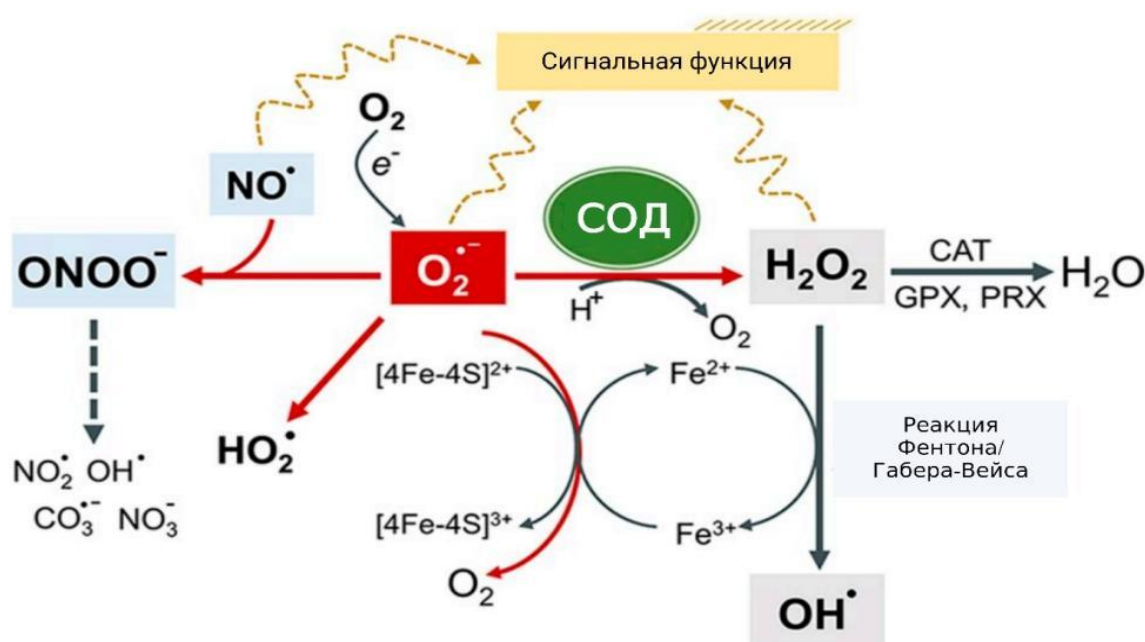


Рисунок 3 – Реакции трансформации супероксид аниона (цит. по: Wang Y., 2018) [320]

Примечание: CAT - каталаза; GPX - глутатионпероксидаза; PRX - пероксиредоксины

Первая линия защиты от митохондриальных АФК - это супероксиддисмутазы (СОД), которые дисмутируют супероксид в перекись водорода [54, 320].

Существуют три различные изоформы СОД (СОД₁, СОД₂ и СОД₃), различающиеся по клеточной локализации, тем самым контролируя специфические для каждого компартмента пулы АФК. СОД₁ (Cu/Zn СОД), является главным образом цитозольным, но также было обнаружено, что он

локализуется в межмембранном пространстве митохондрий. CO_2 (MnSOD) локализуется в митохондриальном матриксе, в то время как CO_3 находится во внеклеточном матриксе [215]. Компартиментализация различных форм СОД обеспечивает важный механизм для точного пространственного контроля гомеостаза АФК и передачи сигналов, точное значение которого еще предстоит понять [320]. Этот фермент представляет собой тетрамер, состоящий из идентичных субъединиц, каждая из которых содержит один атом марганца. Состояние ацетилирования двух остатков лизина регулирует активность фермента посредством контроля доступа супероксида к активному центру фермента [280]. Ацетилирование одного из этих лизинов ингибирует фермент и зависит от активности электронной цепи митохондрий. Ацетилирование увеличивается, когда активность митохондриальной цепи снижается [223]. Сиртуин-3, который требует NAD^+ для своей функции, осуществляет деацетилирование. Когда активность ЕТС снижается, накапливается НАДН, что, в свою очередь, снижает деацетилирование CO_2 , опосредованное сиртуином-3, и, следовательно, активность CO_2 [222].

Недавно было высказано предположение, что CO_2 передает окислительно-восстановительные сигналы, генерируемые митохондриями, в отдаленные участки цитозоля, ядра или даже за пределы клетки [223]. В присутствии CO_2 O_2^- превращается в H_2O_2 в соотношении 2:1, которая является свободно диффундирующим окислителем, и играет важную роль в качестве регулятора сигнальных систем, основанных на окислительно-восстановительных тиоловых переключателях.

Как упоминалось выше, каталаза, глутатионпероксидазы/редуктазы и система пероксиредоксина/тиоредоксина необходимы для расщепления перекиси водорода. Каталаза является важным пероксисомным антиоксидантным ферментом, который катализирует разложение перекиси водорода на воду и кислород. В дополнение к пероксисоме каталаза также была обнаружена в митохондриях сердца [251, 273], предполагается, что она также может играть роль и в контроле митохондриального пула АФК. В сердечных митохондриях мышей

каталаза отвечает исключительно за удаление H_2O_2 в не дышащих или структурно поврежденных митохондриях [279].

Глутатионпероксидазы 1 и 4 локализируются в митохондриях и используют восстановленный глутатион (GSH) для превращения перекиси водорода в воду, таким образом, окисляя GSH в глутатиондисульфид (GSSG), который затем восстанавливается обратно в GSH за счет активности глутатионредуктазы, требующей НАДФН для регенерации митохондриального пула GSH [219].

Пероксиредоксины (PRX) обладают способностью поглощать как пероксид водорода, так и пероксинитрит [5, 6, 219, 273, 286]. PRX₃ и PRX₅ находятся в митохондриях, причем PRX₃ локализована в митохондриальном матриксе, а PRX₅ - в митохондриях, пероксисомах и цитозоле. Донором водорода для восстановления H_2O_2 в данном случае является тиоредоксин 2, который поддерживает сульфгидрильные группы белков в восстановленном состоянии [54]. Сам же тиоредоксин 2 восстанавливается НАДФН-зависимой тиоредоксинредуктазой.

Митохондриальные системы, эволюционировавшие для защиты митохондрий от вырабатываемых ими АФК, могут также устранять АФК, вырабатываемые другими клеточными источниками, однако, данное предположение требует дополнительного подтверждения [166].

Таким образом, потребуются дальнейшие систематические исследования для определения взаимосвязи сигнал-реакция в каждом контексте, чтобы лучше понять сложную роль окислителей в биохимии, физиологии и патофизиологии для поиска новых мишеней, маркеров окислительного повреждения и разработки подходов к снижению патологических повреждений, вызванных АФК, при сохранении ими физиологической передачи сигналов.

1.3. NO как активная форма кислорода и его роль в функционировании митохондрий

Изучение вопроса происхождения эндогенного NO показало, что для его продукции необходим L-аргинин. Производство NO обеспечивается семейством NO-синтаз (NOS) (EC 1.14.13.39), которые в процессе функционирования образуют из L-аргинина NO и L-цитруллин, одновременно окисляя НАДФН и восстанавливая кислород до воды [10]. Оказалось, что NOS присутствуют в клетках практически всех видах тканей и по типу экспрессии их разделяют на конститутивно присутствующие в клетках cNOS и индуцибельные iNOS. Группа cNOS обычно делится на нейрональную nNOS (NOS₁) и эндотелиальную eNOS (NOS₃) по месту их основной локализации, хотя они могут располагаться и в других клетках [362]. iNOS ассоциирована в основном с макрофагами и участвует в работе иммунной системы [46], накапливаясь в этих клетках после активации их цитокинами (IFN-g, IL-1b, TNF-a) и другими агентами, однако, было продемонстрировано, что экспрессия iNOS может быть индуцирована в любом типе клеток, в ответ на соответствующий стимул [115]. Комплексное изучение NOS показало, что они являются одними из наиболее сложно устроенных и регулируемых ферментов, имеющих большое количество кофакторов. NO-синтазы существуют в клетке в виде димера и активны только в таком состоянии (Рисунок 4). В составе каждой субъединицы димера различают редуктазный, кальмодулинсвязывающий и оксигеназный домены. Редуктазный домен содержит флавины ФАД и ФМН: ФАД является первичным акцептором электронов от НАДФН, а ФМН переносит электроны от ФАД на гем оксигеназного домена, который содержит участки связывания гема, аргинина и тетрагидробиоптерина (BH₄) [328].

Считается, что кальмодулин-Ca²⁺ придает ферменту конформационное состояние, необходимое для внутреннего переноса электронов [362]. Именно различия в прочности связывания кальмодулина с димером NOS обуславливают каталитические различия изоформ: активность nNOS и eNOS сильно зависит от

концентрации Ca^{2+} , в то время как с iNOS кальмодулин связан столь прочно, что она не нуждается в добавлении Ca^{2+} .

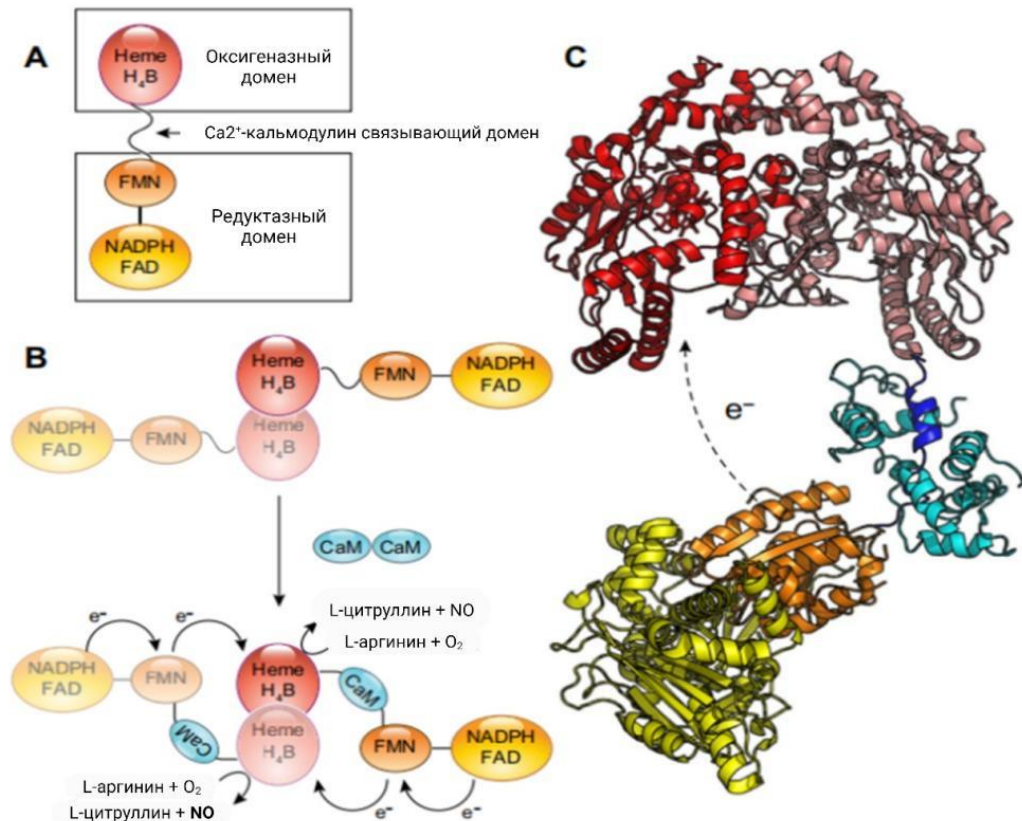


Рисунок 4 – Структура синтазы оксида азота (NOS) (цит. по: Tejero J., 2019) [328]

Примечание: А - расположение доменов в мономере NOS. Домен оксигеназы/гема (красный) соединен с доменом редуктазы гибким линкером, содержащим последовательность связывания кальмодулина (CaM). Домен редуктазы включает в себя флавиновый моноклеотид (FMN)-связывающий домен (оранжевый), который переносит электроны от NADPH/FAD к группе гема, и домен, содержащий FAD (желтый), который использует NADPH в качестве источника электронов.

В: связывание кальмодулина (синий) способствует переносу электронов из ФМН - домена одного мономера в гем-домен другого мономера.

С: трехмерная структурная модель NOS.

Хотя удельные активности всех изоформ NOS одинаковы, при работе в организме оказывается, что sNOS синтезирует небольшие концентрации NO в течение короткого времени, а iNOS вырабатывает значительно большие концентрации NO в течение длительных периодов (до нескольких дней) [252].

Таким образом, экспрессия и активность той или иной изоформы NO может обуславливать способность выступать в качестве физиологического регулятора или же токсического агента.

Вопрос о том, генерируется ли NO в митохондриях или диффундирует в них, все еще остается открытым. Первоначальное исследование в 1995 г. выявило nNOS в митохондриях мозга и печени крыс с помощью иммуногистохимии [154], а последующие исследования - локализацию митохондриального NOS (mtNOS) во внутренней мембране митохондрий [152, 218]. Фактически mtNOS является альфа-изоформой nNOS, которая подверглась ацилированию по остатку Thr или Ser и фосфорилированию по С-концу [238]. Несмотря на более низкий молекулярный вес, mtNOS считается потенциально более активной, чем все другие цитоплазматические изоформы NOS [80].

Имеются также сообщения о том, что iNOS и eNOS могут прикрепляться к внешней мембране митохондрий и участвовать в выработке NO при некоторых условиях, таких как воспаление [242].

Существует множество факторов, которые могут влиять на активность NOS, включая концентрацию кальция, внутриклеточную локализацию и фосфорилирование NOS, а также наличие эндогенного ингибитора-асимметричного диметиларгинина (АДМА).

Накопление митохондриального кальция увеличивает фосфорилирование mtNOS в эндотелиальных клетках сосудов [213]. Известно, что eNOS, обнаруженная в сердечной мышце, фосфорилируется и активируется Akt [330], PKC [135] и AMPK [48], а также, возможно, что эти пути регулируются в митохондриях независимо от цитоплазматических сигналов. NO также контролирует собственное производство с помощью механизмов обратной связи. Например, NO дозозависимо деполяризует митохондрии, что приводит к снижению накопления кальция в них [104].

Активность NOS также зависит от доступности различных кофакторов, включая тетрагидробиоптерин, флавиномононуклеотид (ФМН), флавинадениндинуклеотид (ФАД), а также от наличия L-аргинина, субстрата для

NOS. В частности, в патологических состояниях активность eNOS может усиливаться при внешнем поступлении L-аргинина, несмотря на достаточную для работы eNOS внутриклеточную концентрацию (аргининовый парадокс). Один из механизмов, с помощью которого можно объяснить парадокс аргинина, связан с АДМА [62, 43], имея структуру, подобную аргинину, он является прямым конкурентом для связывания NOS. Более того, и АДМА, и аргинин транспортируются в клетку через катионный транспортер аминокислот (CAT, также известный как “система y^+ ”), высокоаффинный Na^+ -независимый транспортер основных аминокислот [345, 158], и поэтому также конкурируют друг с другом на этом уровне, следовательно, биодоступность NO зависит от баланса между ними [35]. Уровень АДМА в плазме крови повышается при артериальной гипертензии, гиперхолестеринемии, сахарном диабете, атеросклерозе и других патологических состояниях [61, 63, 64, 65, 262, 341]. Таким образом, несмотря на достаточный для функционирования eNOS эндогенный уровень аргинина, соотношение аргинин/АДМА будет снижаться, что и приведет к ингибированию продукции NO [60, 261].

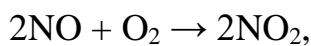
Добавление аргинина может уравновесить соотношение аргинин/АДМА, восстанавливая выработку NO [57]. Этот интересный механизм объясняет эффективность увеличения доступности аргинина, предполагая дальнейшие терапевтические варианты назначения аргинина с учетом уровня АДМА в исследуемых популяциях.

Существует несколько других потенциально значимых источников NO в митохондриях, которые не зависят от активности NOS [364]. Так, восстановление NO^{2-} в NO может катализироваться белками, обладающих нитрит-редуктазной активностью: молибден-содержащие ферменты (ксантинооксидаза, альдегидоксидаза) [240], III и IV комплексы дыхательной цепи митохондрий [243], гемпротеины (гемоглобин, миоглобин) [172, 303]. Было также показано, что благоприятными условиями для ферментативного восстановления NO^{2-} в NO являются состояния гипоксии и ацидоза [199, 214, 364].

Низкомолекулярные молекулы SNO (например, нитрозоглутатион [GSNO], цистеинил-NO [CSNO]) или S-нитрозилированные белки представляют собой другой источник митохондриального NO [12].

Наличие неспаренного электрона означает, что формально NO является свободным радикалом, однако, в отличие от большинства свободных радикалов NO относительно неактивен из-за того, что неспаренный электрон делокализован между атомами кислорода и азота. Отсутствие реакционной способности означает, что NO нелегко димеризуется и существует в основном в виде мономера, а так как он является незаряженным и липофильным, то может диффундировать в водных средах и пересекать клеточные мембраны [182].

Однако, NO способен легко реагировать с неспаренными электронами других молекул (Рисунок 5), а также вступать в реакцию с молекулярным кислородом в газовой фазе с образованием диоксида азота:



который далее с монооксидом азота образует триоксид динитрогена, хотя вероятность протекания этих реакций в биологической среде невелика [204]:



В водной среде NO реагирует с кислородом, с образованием нитрита, процесс, известный как автоокисление [335]:



Это также медленный процесс в биологических условиях, но исследования показали, что эта реакция может протекать и в гидрофобных средах, таких как клеточные мембраны, в связи с этим была выдвинута гипотеза о том, что существуют липидные микроокружения, в которых потенциальная концентрация NO может быть локально высокой [303].

Кроме того, NO способен извлекать кислород из оксигенированного гема в оксигемоглобине с образованием нитратов [71].



Кроме этого, одной из наиболее хорошо изученных является реакция NO с супероксидом O_2^- . Эта реакция приводит к образованию более

реакционноспособного пероксинитрита (ONOO^-), который, в свою очередь, способен окислять или нитрировать другие молекулы или подвергаться распаду, производя повреждающие соединения с нечетным числом электронов $\text{NO}_2 / \text{HO}^\cdot$ в виде промежуточных соединений [252].

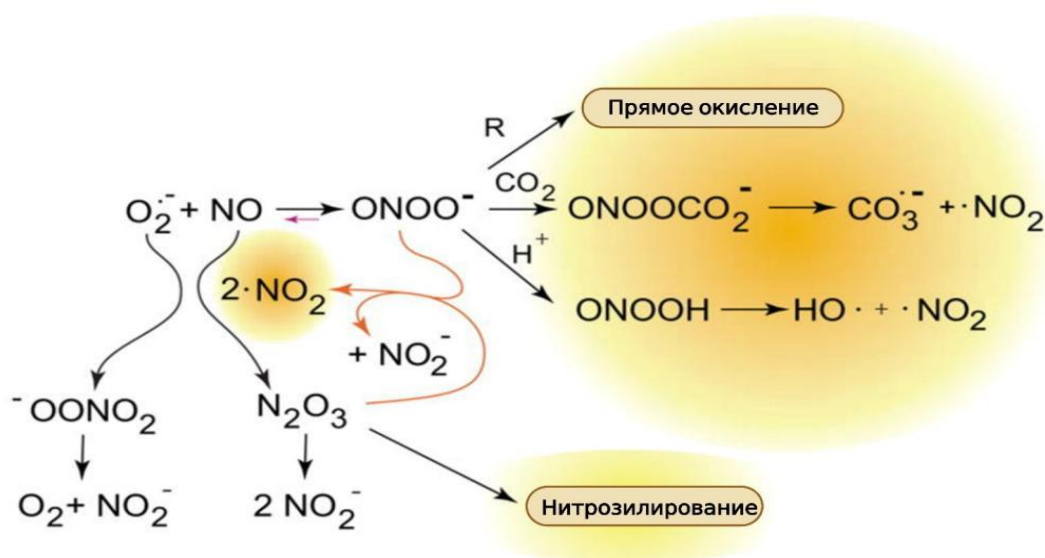


Рисунок 5 – Взаимодействие оксида азота, супероксида, пероксинитрита и диоксида азота (цит. по: Pacher.P., 2007) [252])

NO также может вступать в реакцию с тиольным радикалом и тирозильными радикалами на белках с образованием нитрозотиолов и нитрозотирозина, и перекисных радикалов липидов [71, 303, 314, 335].

NO способен образовывать координационные комплексы с переходными металлами. Большая часть биологических сигнальных свойств NO может быть объяснена его способностью образовывать нитрозильные комплексы с железом, в частности, железо-гемом. Нитрозосоединения оксигемоглобина, миоглобина и различных тиолов (S-нитрозотиолы (RSNO)), динитрозильные комплексы железа, в частности, с серосодержащими лигандами, являются депо NO [109]. С одной стороны, происходит связывание ионов железа, снижается возможность их участия в окислительных реакциях, с другой стороны, установлено, что сами эти комплексы обладают антиоксидантными эффектами: дозозависимо активируют

антиоксидантные ферменты, ингибируют перекисное окисление липидов [7, 265], что является перспективным направлением для создания лекарственных препаратов [4].

Ключевые функции NO опосредуются несколькими возможными путями, среди которых можно выделить: (а) NO-сигнализация, зависящая от растворимой гуанилатциклазы (ГЦ) и ее зависимых ферментов, этот путь называется классической NO-сигнализацией; (б) NO-связывание с цитохром-с оксидазой в митохондриях и его функциональных последствиях (менее классическая NO-сигнализация); и (в) цГМФ-независимая NO-сигнализация [204].

Эффекты NO в основном опосредованы его рецептором. Активированный каталитический домен ($\alpha\beta\gamma\text{cat}$) растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) преобразует ГТФ в цГМФ, который и формирует физиологические действия NO путем активации нижестоящих элементов сигнального пути, включая PKG (I и II), катионные каналы, управляемые цГМФ, и фосфодиэстеразы [106, 329]. Однако, некоторые ключевые функции NO опосредуются через цГМФ независимые метаболические пути, в том числе митохондриальные. В физиологических субмикромольных концентрациях наиболее выражены эффекты NO на дыхательную цепь. NO способен конкурировать с O_2 за связывание в бинуклеарном центре цитохром *c* оксидазы, что ведет к высокому сродству и обратимому ингибированию ее активности [102].

Исследования последних лет показывают, что цитохром *c* оксидаза может связывать NO либо с окисленным железом (Fe^{2+}) в геме a_3 , либо неконкурентным путем, взаимодействуя с окисленным ионом Cu^2 . Преобладание одного ингибирующего механизма над другим контролируется потоком электронов через фермент [101]. Также известно, что образующийся из NO пероксинитрит необратимо угнетает сродство цитохром *c* оксидазы к кислороду, однако этот механизм, скорее всего, не является физиологическим [239], поскольку при низких уровнях $\bullet NO$ (10-100 нМ) большая часть «потока» O_2^- будет направляться через реакцию, катализируемую СОД [218]. При длительной сверхактивации конститутивных NOS (eNOS или nNOS) или индукции iNOS $\bullet NO$ приблизится к

микромольным уровням, что приведет к более значительным потокам пероксинитрита [273]. Нитрозативное повреждение митохондрий усугубляется инактивацией MnСОД вследствие нитрования, индуцированного пероксинитритом.

Биоэнергетический стресс, возникающий после ингибирования цитохромоксидазы NO, увеличивает соотношение АМФ/АТФ, что, в свою очередь, приводит к активации АМФ-активированной протеинкиназы (АМПК), фермента, играющего центральную роль в контроле внутриклеточного энергетического метаболизма. Активированный фермент «выключает» биосинтетические пути и в то же время «включаются» катаболические пути, и, таким образом, поддерживается уровень АТФ [204].

В дополнение к влиянию на АМПК NO также модулирует клеточный метаболизм через свое воздействие на индуцируемый гипоксией фактор (HIF), который играет ключевую роль в адаптации клеток к гипоксии. [204]. HIF является α -гетеродимером двух белковых субъединиц: HIF- β не зависит от уровня O₂, тогда как α -субъединица чувствительна к его содержанию. В условиях достаточной обеспеченности O₂ субъединица HIF- α гидроксилируется по остаткам пролина и становится мишенью для действия протеасом. При дефиците кислорода α -субъединица не гидроксилируется и структура HIF стабилизируется. Оксид азота (II), с одной стороны, блокирует активный центр пролилгидроксилазы, связываясь с железом, а с другой стороны, нитрозилирует HIF1 α , что способствует стабилизации последнего [204]. HIF - транскрипционная активация индуцирует метаболическое перепрограммирование, которое способствует экспрессии генов гликолиза и таким образом, перестройке энергетического метаболизма клетки с образования АТФ в процессе окислительного фосфорилирования на субстратное фосфорилирование в гликолизе [86, 169, 298].

Среди примеров обратимой посттрансляционной модификации, которая все чаще представляется как механизм передачи сигнала NO, можно рассмотреть S-нитрозилирование (также называемое S-нитрозированием), при нем происходит

включение нитрозогруппы в тиольную SH-группу цистеина с образованием нитрозотиола (R-S-N=O) [98, 110]. В отличие от фосфорилирования этот процесс не зависит непосредственно от распознавания ферментом структуры-мишени и имеет более широкую специфичность. Уровень S-нитрозилирования может также регулироваться ингибиторами NOS [244], которые классифицируются на две категории: (1) аналоги L-аргинина (конкурентные ингибиторы) и (2) аллостерические ингибиторы NOS. К аналогам аргинина относят эндогенные метиларгинины: асимметричный диметиларгинин (ADMA); симметричный диметиларгинин (SDMA) и NG-монометил-L-аргинин (L-NMMA). Они образуются в результате высвобождения метилированных остатков аргинина из внутриклеточных белков.

Повышение уровня NO в митохондриях, вызывает митохондриальную дисфункцию посредством определенной последовательности событий: (1) обратимого ингибирования дыхания в комплексе IV, (2) усиления «утечки электронов» и образование митохондриального O_2^- , (3) образования пероксинитрита, (4) окисления, нитрования и S-нитрозилирования митохондриальных комплексов I и II и (5) инактивации комплексов I и II. Эта последовательность событий способствует изменению электрохимических градиентов, окислительно-восстановительному и биоэнергетическому гомеостазу митохондрий, открытию переходной поры проницаемости и последующей апоптотической сигнализации [245]. Следует отметить, что пероксинитрит, возникающий из экстрамитохондриальных участков, также может достигать митохондрий и вызывать окислительное повреждение [245]. Поскольку митохондрии являются основными источниками CO_2 , часть пероксинитрита будет реагировать с ним и через вторичные радикалы (рисунок 4) запускать одно электронное окисление убихинола до убисемихинона [250], процесс, который дополнительно способствует образованию митохондриального O_2^- .

Сообщалось также, что ингибирующее действие NO на комплекс IV сильно зависит от метаболического состояния митохондрий: NO ингибирует дыхание, когда митохондрии имеют низкий мембранный потенциал и комплекс IV

присутствует в основном в восстановленной форме. Важно отметить, что высокие дозы NO вызывают нитрозативный стресс, в то время как меньшие количества NO могут оказывать антиоксидантное действие [108]. Однако факторы, определяющие баланс антиоксидантного/ прооксидантного действия NO, четко не определены.

Следует также обозначить, что влияние NO на митохондрии может зависеть от типа и вида клеток из-за органоспецифической и видоспецифической изменчивости функции митохондрий [315].

Таким образом, из представленных выше данных видно, что NO действует как сигнал, регулирующий метаболическую активность, однако, до настоящего времени досконально не известно, какие нижестоящие эффекторы передачи сигналов NO, и на какие метаболические пути воздействуют. В этом отношении исследования на животных моделях с пониженным или даже отсутствием NO, получаемого из эндотелия, могут быть весьма информативными. Более того, эти он могли бы служить моделями, имитирующими заболевание, для тестирования терапевтических подходов, которые будут восполнять биоактивный NO и восстанавливать передачу сигналов, опосредованных NO.

1.4. Влияние гипергомоцистеинемии на метаболизм митохондрий

В контексте данной работы важно изучение механизма токсичности гомоцистеина (Hcy), который представляет собой серосодержащую аминокислоту, образующуюся при метаболизме метионина. Метаболический путь, участвующий в образовании Hcy (Рисунок 6), имеет большое значение из-за образования S-аденозилметионина (SAM), источника метильной группы для реакций метилирования. S-аденозилгомоцистеин (SAH), который образуется из SAM после переноса метильной группы на различные субстраты, гидролизуется с участием S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы (КФ 3.3.1.1) до Hcy и аденозина [133]. Высвобожденный Hcy может быть реметилирован до метионина с помощью фермента метионинсинтазы (КФ 2.1.1.13) и N⁵-метилТГФК в качестве

донора метильной группы, а также витамина В₁₂ (метилкобаламин) в качестве кофактора фермента. Также Нсу способен катаболизироваться до аминокислоты цистеина путем витамин В₆-зависимого транссульфирования с участием ферментов: цистатионин-β-синтазы (КФ 4.2.1.22) и цистатионин-γ-лиазы (КФ 4.4.1.1). Небольшие количества гомоцистеина могут превращаться в его тиолактон под действием метионил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1.10) [133, 208].

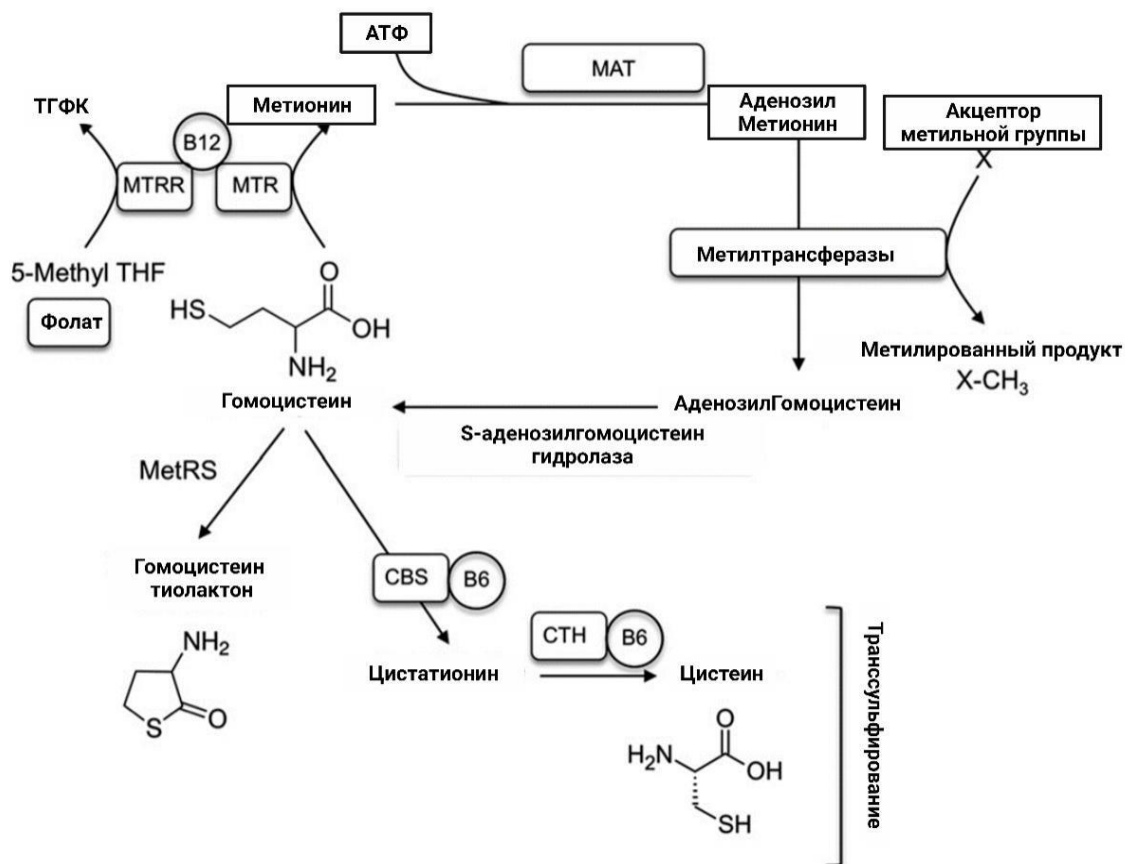


Рисунок 6 – Схематичное представление метаболизма гомоцистеина (цит.по: Aitken R.J., 2016) [160]

Примечание: MAT - метионин-аденозилтрансфераза; MetRS - метионил-тРНК-синтетаза; CBS - цистатионин β-синтаза; CTH - цистатионин γ-лиаза; MTR - метионинсинтаза; MTRR - редуктаза метионинсинтазы; 5-MethylTHF - 5-метилтетрагидрофолат

К повышению уровня гомоцистеина в крови (гипергомоцистеинемии) могут приводить генетические дефекты ферментов и/или дефицит витаминов, участвующих в метаболизме Нсу, повышенное содержание метионина в пищевых

продуктах, некоторые системные заболевания, в первую очередь, болезни почек, прием определенных лекарственных препаратов (леводопа, триметоприм, метотрексат, фибраты, теофиллин, изониазид и др.), а также вредные привычки, такие как курение [255].

Из анализа литературных источников известно, что существует несколько потенциальных механизмов токсического воздействия гомоцистеина на организм [317]. Гомоцистеин в присутствии ионов переходных металлов может генерировать супероксидные радикалы (O_2^-) и H_2O_2 путем медленного автоокисления [255]. Также гомоцистеин непосредственно способен ингибировать активность антиоксидантных ферментов, таких как тиоредоксин, гемоксигеназа-1, СОД, а также активировать НАДФ-оксидазы (NOXs) и впоследствии продуцировать супероксидный анион, вызывая накопление АФК [255]. Показано, что Hcy индуцирует увеличение утечки супероксида из дыхательной цепи (ДЦ). В физиологических условиях утечка супероксида невелика, а при ее повышении активируются окислительно-восстановительные сигнальные пути, способствующие усилению системы антиоксидантной защиты [317]. Однако дисбаланс этих процессов может увеличить концентрацию АФК в митохондриях и усилить окислительный стресс вблизи мест их образования, тем самым увеличивая дисфункцию работы ДЦ и приводя к порочному циклу образования АФК. Одним из вероятных механизмов, лежащих в основе изменений активности комплексов ДЦ и увеличения утечки АФК при HNCy, является посттрансляционная модификация белка [164]. Тиолактон Hcy, реакционноспособный метаболит Hcy, может ковалентно связываться с ϵ -аминогруппой остатков лизина в белках, и эта модификация, известная как N-гомоцистеинилирование, вызывает структурные и функциональные изменения белков [147,160,164,255]. На сегодняшний день имеется ограниченное число исследований, рассматривающих проблему N-гомоцистеинилирования митохондриальных белков. Так показано, что гомоцистеинилированный цитохром c претерпевает конформационные изменения, приводящие к активации пероксидазоподобной активности этого электронного носителя [102, 164].

В отличие от тиолактона Hcy, сам Hcy связывается с остатками цистеина в белках, образуя стабильные ковалентные дисульфидные связи. Этот процесс, известный как S-гомоцистеинилирование, также потенциально может изменять структуру и функцию белков [255], но его роль в повреждении митохондрий практически не изучена.

Еще одним фактором повреждающего действия Hcy на митохондрии является аномальная генерация оксида азота, но молекулярные механизмы, ответственные за снижение биодоступности NO при гипергомоцистеинемии, изучены не полностью. Избыточное накопление в патологических состояниях в митохондриях супероксида далее может приводить к образованию значительных количеств пероксинитрита [147]. В свою очередь, последний нитрирует и ингибирует Mn-SOD [148], тем самым предотвращая распад супероксида и поддерживая продукцию пероксинитрита [252]. Было показано, что пероксинитрит ингибирует большинство компонентов цепи переноса электронов, включая комплекс I (НАДН-дегидрогеназа) [317], комплекс II (сукцинатдегидрогеназа) [125], комплекс III (цитохром с редуктаза) [125, 239] и комплекс V(АТФ-синтетаза) [255], посредством механизмов, включающих, в различной степени, окисление цистеина, нитрование тирозина и повреждение железосернистых центров.

Также гомоцистеин за счет окисления тетрагидробиоптерина, кофермента NO-синтаз, индуцирует разобщение субъединиц NO-синтазы, что приводит к снижению выработки NO и повышению продукции O_2^- мономерами фермента [317]. Высокие уровни АФК ингибируют ферментативную активность диметиларгининдиметиламиногидролазы (DDAH), что приводит к накоплению асимметричного диметиларгинина (АДМА), являющегося ингибитором NO-синтаз. Гомоцистеин-индуцированные АФК также снижают активность транспортера L-аргинина CAT-1, субстрата для синтеза NO (II) [149]. Недостаток L-аргинина, в свою очередь, вызывает разобщение eNOS [57], что еще больше ухудшает выработку NO и увеличивает выработку АФК.

Таким образом, имеются все предпосылки, позволяющие расценивать гипергомоцистеинемию как состояние, связанное с усилением редокс-регуляции и снижением биодоступности NO в митохондриях, и делает актуальным продолжение изучения данного патологического состояния.

1.5. Значение L- карнитина для функционирования митохондрий

Впервые карнитин был обнаружен в мясных продуктах (carnius) Гулевичем В.И. более 100 лет назад. В настоящее время очевидно, что карнитин оказался гораздо важнее для людей и всех других существ на планете, чем предполагалось в начале [352]. Подавляющей интерес к исследованиям карнитина, говорит о том, что изучение данного вещества будет продолжено в ближайшем будущем.

Обмен L-карнитина в организме человека включает три важных процесса:

- поступление экзогенного карнитина с пищей и его всасывание в кишечнике;
- синтез эндогенного карнитина с последующим транспортом через кровь к другим органам, где карнитин не образуется;
- реабсорбция из первичной мочи в почках.

L- карнитин может поступать в организм с пищевыми продуктами (около 75%) или синтезироваться эндогенно (около 25%). Основными источниками карнитина для человека являются мясные (в основном красное мясо) и молочные продукты. В среднем человек получает от 2 до 12 мкмоль карнитина на кг веса и 1-2 мкмоль /кг синтезируется эндогенно [276, 285].

Карнитин, поступающий с пищей, всасывается путем активного и пассивного транспорта через мембрану энтероцитов, причем, биодоступность пищевого карнитина варьирует от 54 до 87%, в зависимости от его содержания в продуктах, в то же время биодоступность карнитина из лекарственных препаратов составляет только 5-18% [127, 277].

Карнитин может присутствовать в организме в свободной и этерифицированной форме (ацилкарнитины). В физиологических условиях эфиры карнитина составляют около 25% от общего количества, отношение ацилкарнитин/свободный карнитин в плазме - 0,33 и ниже [285].

Биосинтез карнитина

Субстратом для биосинтеза карнитина служит 6-N-триметиллизин (ТМЛ) (Рисунок 7), который является продуктом лизосомальной или протеасомной деградации белков, содержащих N-метилированные лизины. N-метилирование представляет собой посттрансляционную модификацию, осуществляемую метилтрансферазами, которые используют S-аденозилметионин как донор метильных групп [359]. У млекопитающих такими белками являются кальмодулин, миозин, актин, цитохром с и гистоны.

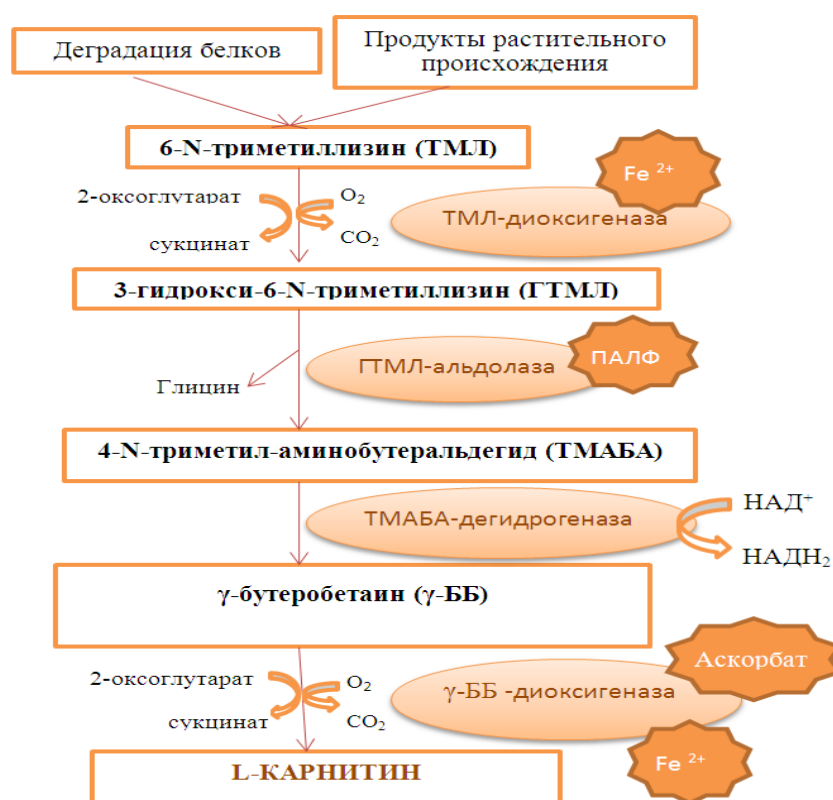


Рисунок 7 – Схема биосинтеза карнитина (цит. по: Servillo L., 2014) [359]

Однако, в последнее время, появилось мнение, что этот источник ТМЛ играет важную роль в биосинтезе L-карнитина только в условиях повышенной лизосомальной или протеасомальной деградации белка, например, при голодании [359], в абсорбтивном периоде разрушение эндогенных белков ингибируется анаболическими гормонами, преобладающими в это время в крови. Показано также, что различные растительные продукты, такие как, салат, шпинат, соя,

пшеница, кукуруза, рожь и фрукты, содержат значительные количества свободного ТМЛ, достаточного для биосинтеза карнитина [359]. Это мнение подтверждается тем, что введение крысам свободного ТМЛ активирует биосинтез карнитина [278].

Таким образом, свободный ТМЛ из растительных продуктов может быть подходящим источником для синтеза карнитина и отчасти объясняет тот факт, что концентрация L-карнитина в плазме у вегетарианцев лишь немного ниже, чем у людей, не придерживающихся этой диеты.

Далее промежуточный продукт ТМЛ превращается в гидрокситриметиллизин, который в цепи последовательных реакций, протекающих как в митохондриях, так и в цитозоле клетки превращается в γ -бутиробетаин [349]. Необходимые для этого ферменты обнаруживаются в скелетных мышцах, сердце, печени, почках и мозге [308]. Превращение γ -бутиробетаина в L-карнитин происходит в реакции гидроксирования под действием специфического фермента гидроксилазы (диоксигеназы), который присутствует в печени, почках и мозге, но его нет в скелетной и сердечной мышцах [95, 290]. Для протекания реакции необходимы кислород, 2-оксоглутарат, Fe^{2+} и аскорбиновая кислота [351].

L-карнитин проникает в клетки, которые не синтезируют карнитин, благодаря активности транспортных белков, принадлежащих к семейству переносчиков органических катионов (ОСТН). Транспорт L-карнитина осуществляется посредством активности трех транспортеров: ОСТН1 (SLC22A4), ОСТН2 (SLC22A5) и ОСТН3 (SLC22A21) [227, 325]. Наибольшим сродством к карнитину обладает ОСТН2, который действует как симпортер, перемещая ионы натрия и другие органические катионы через мембрану вместе с карнитином. ОСТН2 экспрессируется в различных тканях: в высокой концентрации обнаруживается в почках, скелетных мышцах, плаценте, сердце, простате, яичке, эпидидимисе и щитовидной железе и, в меньшей степени, в тонкой кишке, печени, легких, мозге, трахее, поджелудочной железе [174, 175, 248]. Этот же транспортер представляет собой молекулярную основу для процесса канальцевой реабсорбции

карнитина в почках, что имеет фундаментальное значение для поддержания нормального уровня карнитина в сыворотке крови (Рисунок 8). Дефекты в почечном процессе реабсорбции карнитина из-за мутации в гене OСТN2 являются причиной тяжелого системного дефицита карнитина (SCD) [201], который приводит к изменению β -окисления длинноцепочечных жирных кислот, вызывая различные симптомы, такие как миопатия, кардиомиопатия, ожирение печени и мужское бесплодие [263].

В тонкой кишке OСТN2 также играет ключевую роль в процессе поглощения карнитина из рациона [161].

Считается, что изоформа OСТN1 вносит меньший вклад в транспорт карнитина, чем OСТN2, из-за его низкого сродства к карнитину. OСТN1 локализуется в митохондриальной мембране в непосредственной близости от КПТ I, ограничивающего скорость фермента для карнитин зависимого окисления жирных кислот. Данная локализации транспортера позволяет предложить, что OСТN1 действует на митохондриальный приток и отток эфиров карнитина и ацилкарнитина, что указывает на то, что OСТN1 в основном участвует в поддержании внутриклеточного гомеостаза карнитина [198]. Предполагается, что другая изоформа - OСТN3, играет роль в поглощении карнитина яйцками, а также в опосредованной почечной реабсорбции карнитина [198] и в отличие от активности OСТN2, не требует градиента ионов натрия (Рисунок 8) [227].

Другим транспортером, который, по-видимому, специфичен для ядер, является транспортер карнитита 2 - СТ2 (SLC22A16). СТ2 характеризуется высоким сродством к карнитину, специфически экспрессируется в яйчках [230] и, вероятно, отвечает за транспорт карнитина в придаток, где его концентрация примерно в 2000 раз выше, чем в крови [230].

Еще одним белком, способным транспортировать карнитин в клетки, является транспортер нейтральных и основных аминокислот АТВ0+ [233, 313], кодируемый геном SLC6A14. Этот белок относится к большому суперсемейству транспортеров SLC6, которое включает в себя транспортеры ряда нейротрансмиттеров, аминокислот и осмотически активных соединений, все эти

транспортеры требуют для своей активности как ионов натрия, так и ионов хлора [79]. АТВ0 + транспортирует все аминокислоты, кроме кислых аминокислот - аспартата и глутамата, но имеет самое высокое сродство к лейцину, в то время как его сродство к карнитину очень низкое [233].

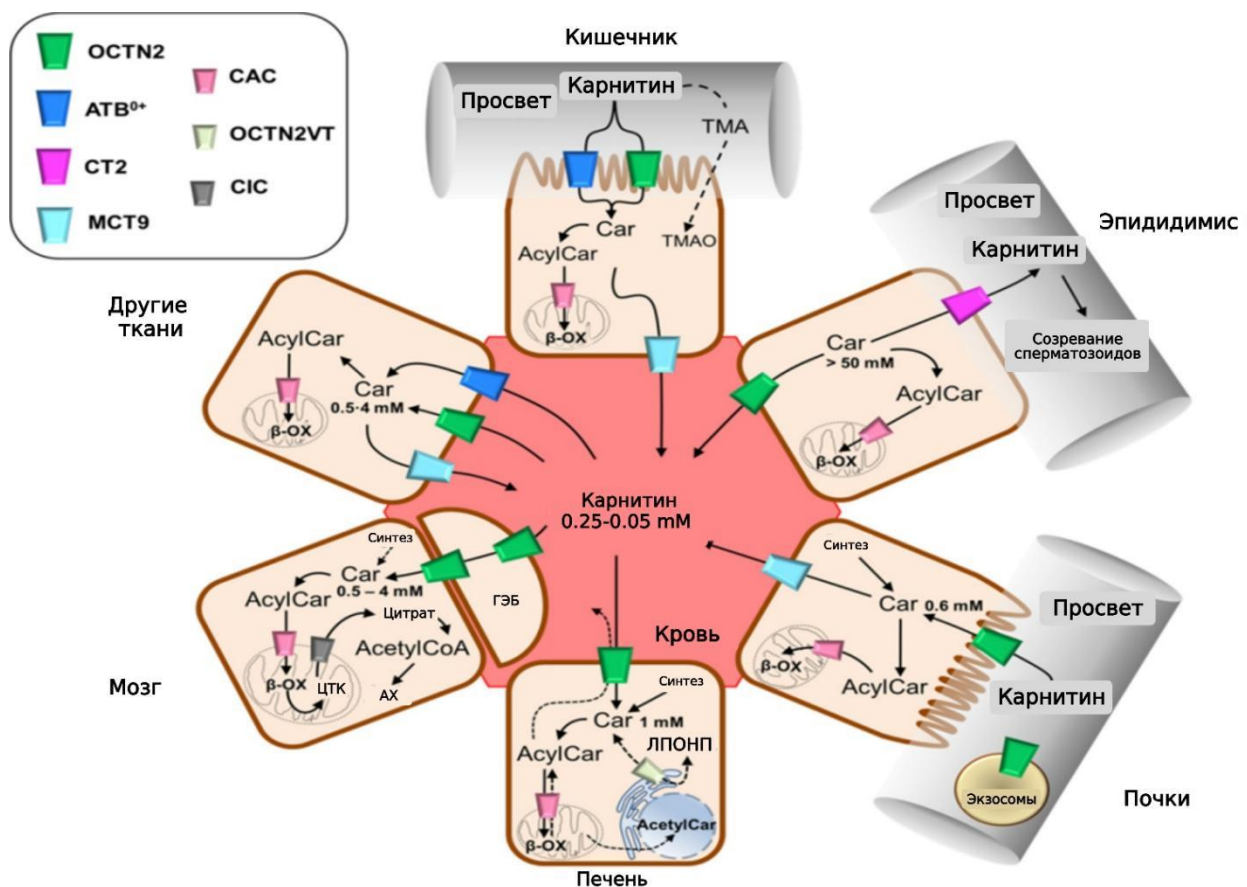


Рисунок 8 – Схематическое представление трафика карнитина (цит. по: Console L., 2020) [93]

Примечание: Движение карнитина (Car) описано непрерывными стрелками; пунктирные стрелки указывают на транспортировку некоторых других субстратов, таких как производные карнитина и триметиламин (ТМА), которые косвенно участвуют в движении карнитина

При физиологических концентрациях аминокислот в крови его функция в транспорте карнитина незначительна, и, принимая во внимание значение K_m , на порядок превышающее концентрацию этого соединения в крови, и, вероятно,

функционирует с помощью механизма облегченной диффузии. АТВО + может играть важную роль при нарушении функционирования OСТN₂ [136].

Карнитин в основном выводится почками. Он фильтруется клубочками почек и обычно 90-98% фильтрованного карнитина реабсорбируется, большую роль здесь играет OСТN₂. Реабсорбция карнитина считается основным регулятором гомеостаза карнитина у человека [277]. Нормальная концентрация карнитина в плазме составляет 30-65 мкмоль/л, при увеличении этих значений, например, внутривенном введении или пероральном приеме карнитина, эффективность реабсорбции карнитина быстро снижается, и большая часть отфильтрованного карнитина теряется с мочой.

Биологические функции карнитина

Анализируя роль L-карнитина в клеточном метаболизме, очевидно, что он оказывает плеiotропные эффекты и большинство из них опосредуется его функциями в митохондриях. Главная из них, связана с процессом производства энергии за счет переноса длинноцепочечных жирных кислот из цитоплазмы в митохондрии, где в процессе β-окисления происходит их окисление. Эта роль является фундаментальной, поскольку ни свободные жирные кислоты с длинной цепью, ни их сложные эфиры кофермента А не могут самостоятельно пересекать внутреннюю митохондриальную мембрану, транспорт возможен исключительно в форме карнитинового эфира.

1. Транспорт активированных длинноцепочечных жирных кислот из цитозоля в митохондриальный матрикс и включение их в процесс β-окисления

Длинноцепочечная жирная кислота активируется в цитоплазме ацил-КоА-синтетазой, которая представляет собой один трансмембранный домен, расположенный во внешней мембране митохондрий, и большой цитоплазматический домен с активным ферментным центром [42, 191]. Активированные остатки жирных кислот малой и средней длины углеводородной цепи самостоятельно проникают через двойную мембрану митохондрий, но большинство жирных кислот имеют длинную цепь и их дальнейший перенос

возможен только при участии карнитиновой транспортной системы. Ацилы переносятся на карнитин с образованием ацилкарнитина при участии фермента карнитин-пальмитоилтрансферазы 1, CPT₁ (EC.2.3.1.21). CPT₁ имеет два трансмембранных домена с аминным и карбоксильным концом на цитоплазматической стороне, считается, что и активный центр и два регуляторных центра, связывающих малонил-КоА, находятся на внешней стороне митохондриальной мембраны [191]. У млекопитающих есть 3 изоформы CPT₁: CPT_{1A} (печеночная изоформа), экспрессируется в печени, головном мозге, почках, легких, селезенке, кишечнике, поджелудочной железе, яичниках и фибробластах [333]; CPT_{1B} (мышечная изоформа) экспрессируется в сердце, скелетных мышцах и семенниках [167,333], CPT_{1C} присутствует в мозге и считается ответственной за контроль аппетита [73]. Ингибирование CPT₁ под действием малонил-СоА, указывает на роль CPT₁ в качестве основного переключателя между окислением и синтезом жирных кислот [105, 150]. Образующийся ацилкарнитин транспортируется через внешнюю митохондриальную мембрану в межмембранное пространство к внутренней мембране через анион-зависимый канал напряжения (VDAC), или через олигомер CPT₁ [191, 275]. Внутренняя мембрана непроницаема для ацилкарнитина и, поэтому он транспортируется посредством белка-переносчика – карнитин - ацилкарнитинтранслоказы (CACT), который насквозь пронизывает внутреннюю мембрану митохондрий (является трансмембранным белком). CACT, кодируется геном SLC22A20 и является центральным элементом карнитинового челнока [310, 338]. В митохондриальном матриксе жирные кислоты превращаются в их производные с коэнзимом А в реакции, катализируемой карнитинпальмитоилтрансферазой 2, CPT₂ (EC.2.3.1.21), расположенной внутри внутренней митохондриальной мембраны [94]. Карнитин с помощью той же транслоказы переносится в межмембранное пространство и свободно диффундирует в цитоплазму, где снова ацилируется.

В настоящее время дефицит или чрезмерную активацию системы транспорта длинноцепочечных жирных кислот рассматривают как важную часть

патогенеза различных острых и хронических воспалительных заболеваний, а также опухолевых процессов. Соответственно, использование агонистов или антагонистов, нацеленных на систему СРТ, может стать новым подходом для лечения широкого спектра заболеваний [92].

2. Транспорт продуктов пероксисомального β -окисления

Процесс окисления жирных кислот с очень длинными углеродными цепями ($C \geq 22$) происходит в пероксисомах. В результате этого процесса жирные кислоты укорачиваются до гексаноил-КоА [257], который затем экспортируется из пероксисом при участии карнитин-октаноилтрансферазы и карнитин-ацетилтрансферазы, которая активна в отношении ацетил-КоА и пропионил-КоА [229]. Размер этих ацилов меньше, чем у соответствующих производных жирных кислот, и они, по-видимому, представляют собой челночные молекулы, способствующие освобождению ацетильных, (пропионильных) и ацильных групп со средней длиной цепи из пероксисом. После диффузии через пероксисомальную мембрану сложные эфиры карнитина снова превращаются в свободный карнитин и ацетил (ацил) - КоА с помощью цитоплазматических и митохондриальных карнитинацилтрансфераз [56].

3. Митохондриальный контроль соотношения ацил-КоА / КоА

Кофермент А является ключевым соединением в энергетическом обмене, он используется во многих метаболических путях в качестве кофактора. Кофермент А может быть свободным (и доступным) или связанным с различными соединениями и особенно часто с ацильными группами. В физиологических условиях существует устойчивое равновесие между свободным и ацилированным КоА, но при различных патологических состояниях митохондриальное соотношение между свободным и ацилированным КоА нестабильно и частично регулируется с помощью L-карнитина. В этой ситуации синтез ацилкарнитина повышается, что приводит к ускорению процесса β – окисления и увеличению количества свободного КоА и восстановлению равновесия между свободным и ацилированным коферментом [277].

Также обнаружено, что S-нитрозилирование SACS может предотвращать захват КоА ацетил КоА, что происходит в определенных условиях, в которых митохондриальное окисление жирных кислот должно быть замедлено, например, при повышении внутримитохондриального уровня NO и ингибирования комплекса I [338]. Это явление может контролировать/регулировать поток жирных ацилов в β -окисление во время измененного метаболизма митохондрий, например, при ишемии и реперфузии.

4. Цитопротекторное действие карнитина

Считается, что цитопротекторное действие карнитина при различных стрессовых состояниях связано с уменьшением повреждений клеток, ассоциированных с окислительным стрессом.

Следует отметить, что карнитин может способствовать антиоксидантной защите по-разному (Рисунок 9). Во-первых, путем прямого удаления свободных радикалов. Во-вторых, путем предотвращения образования свободных радикалов за счет ингибирования специфических ферментов, ответственных за выработку свободных радикалов, или благодаря поддержанию целостности электронно-транспортной цепи митохондрий в условиях стресса. В-третьих, участвуя в поддержании оптимального окислительно - восстановительного статуса клетки, путем активации ряда антиоксидантных ферментов и неферментативных антиоксидантов, главным образом факторов транскрипции, включая Nrf2, PPAR α и ингибирования NF- κ B. Наконец, активируя ряд веществ, отвечающих за синтез защитных молекул, в том числе шаперонов HSP, тиоредоксина (Trx), сиртуинов и т. д., и обеспечивая дополнительную защиту в условиях стресса.

В литературе имеются данные, указывающие на возможность прямого антиоксидантного действия карнитина и его производных в биологических тканях [139, 332]. Так, Gülçin в 2006 показал, что 1,1-дифенил-2-пикрил-гидразил (DPPH \bullet) с неспаренным электроном способен отрывать H \bullet от метиленовой группы (-CH $_2$) у 2-го углеродного атома карнитина, образующийся радикал будет стабилизироваться за счет сопряжения с его карбоксильной группой, DPPH \bullet при этом восстанавливается до DPPH \bullet -H [139]. Тем не менее прямая антиоксидантная

активность L-карнитина и его эфиров, скорее всего, имеет ограниченную возможность, так как для этого требуется концентрация карнитина выше физиологической. Основной же механизм, вызывающий снижение окислительного стресса, вероятно, связан с его защитными эффектами на метаболизм и функцию митохондрий, а также на активность ферментов, продуцирующих АФК, и окислительно-восстановительную передачу сигналов.

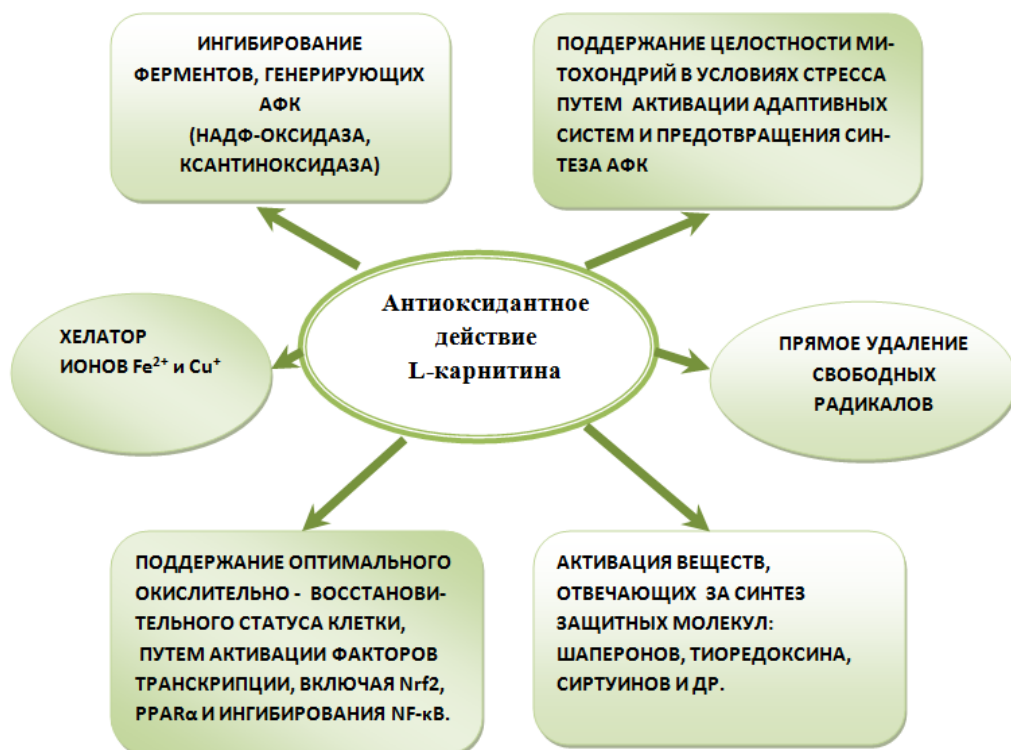


Рисунок 9 – Антиоксидантное действие L-карнитина (цит. по: Surai P.E., 2015)

[321]

Также антиоксидантный эффект L-карнитина обусловлен его способностью ингибировать ферменты, генерирующие свободные радикалы, такие как НАДФН-оксидаза и ксантинооксидаза [53, 91, 119, 264].

Цао et al. обнаружили увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты (СОД, глутатионпероксидазы и каталазы) в плазме крови после однократного введения L-карнитина здоровым субъектам [309]. Кроме того, имеются данные о его участии в активации путей защиты от окислительного стресса, таких как NF-κB, PPAR-α и Nrf2, экспрессия которых увеличивается в

результате добавления L-карнитина с последующей активацией ферментов АОС [124, 189, 339].

Карнитин также может усиливать экспрессию редокс - чувствительных факторов транскрипции, сиртуинов и белков теплового шока, которые защищают от окислительного повреждения [353].

Кроме этого, соединения с химической структурой, содержащие две или более такие функциональные группы как: $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{S}-$, $\text{C} = \text{O}$, $-\text{O}-$, способны проявлять свойство хелатирования металлов [55,139]. Поэтому L-карнитин, содержащий группы $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$, также может действовать как хелатор металлов. Данный процесс связан с предотвращением участия ионов Fe^{2+} и Cu^+ в образовании АФК посредством реакции Фентона. Очень важно отметить, что хелатирующая способность L-карнитина была сопоставима с таковой у ЭДТА [55,177,186,321]. Следовательно, хелатные свойства карнитина могут способствовать его антиоксидантному действию.

Но исследование Vanihani et al. (2012) показало, что доза 0,5 мг / мл L-карнитина значительно увеличивала подвижность сперматозоидов человека после *in vitro* инкубации. Тем не менее более высокая концентрация L-карнитина (50 мг / мл) была токсичной для спермы и значительно уменьшала подвижность сперматозоидов. На самом деле, токсичный эффект от высокой дозы L-карнитина может быть связан с его способностью связывать ионы Ca^{2+} , жизненно важного иона, необходимого для движения спермы [68].

Помимо этого, следует учитывать, что в организме человека присутствует большое количество ферментов требующих для оптимальной их активности ионы Ca^{2+} в качестве кофактора, соответственно, снижение концентрации Ca^{2+} может уменьшать их функционирование.

Существует также доказательство стабилизирующего действия карнитина на функцию митохондрий и снижения выработки АФК *in vivo*. Например, было обнаружено, что активность ферментов цикла лимонной кислоты: изоцитратдегидрогеназа, α - кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа и малатдегидрогеназа, а также активность ферментов, переносящих электроны,

таких как НАДН-дегидрогеназа и цитохром с оксидаза, снижается у старых крыс. Однако после добавления карнитина пожилым крысам активность этих ферментов оказалась ближе к активности молодых контрольных крыс [107].

L-карнитин также описан как потенциальный антиоксидант при некоторых патологических состояниях. Сообщалось, что он может защитить эндотелиальные клетки человека, уменьшая перекисное окисление липидов и ксантиноксидазную активность и стимулируя гены экспрессии некоторых окислительных маркеров, таких как гем-оксигеназы-1 и эндотелиальной синтазы оксида азота [52, 293].

Таким образом, карнитин можно рассматривать как специфичный для митохондрий антиоксидант, ответственный за поддержание целостности митохондрий и регуляцию выработки АФК и передачи сигналов АФК.

Участие в апоптозе

В целом, карнитин обеспечивает антиапоптотическую защиту, как показано в различных исследованиях *in vivo* и *in vitro*. Тем не менее многое в механизмах антиапоптотического действия карнитина остается неизученным. Карнитин и его ацильные производные регулируют несколько этапов в каскаде апоптоза и имеют несколько точек приложения. Карнитин ингибирует активность каспаз 3, 7, 8 и 9 [283]. Кроме того, он также инактивирует расщепление каспазных субстратов нижестоящими каспазами, что делает его общим ингибитором каспаз, по крайней мере, блокирующим один из аспектов апоптоза. Интересным является тот факт, что в отличие от карнитина, его длинноцепочечное производное – пальмитоилкарнитин стимулирует активность всех каспаз и нивелирует ингибирование, опосредованное карнитином [283].

Участие карнитина в клеточной защите от апоптоза может быть также обеспечено за счет ингибирующего воздействия на синтез церамида. Перенаправление пальмитоил-КоА от синтеза церамида к окислительному метаболизму, усиливаясь ингибирующим действием на кислую сфингомиелиназу, которая способствует формированию церамида в ответ на апоптотические стимулы [188].

Другой антиапоптотический механизм карнитина был обнаружен в Т-лимфоцитах, где добавление L-карнитина и, следовательно, снижение церамида стимулировало повышение уровня инсулиноподобного фактора роста (ИПФР-1) в сыворотке крови [157]. Известно, что (ИПФР-1 ингибирует димеризацию белков, регулирующих апоптоз BCL-2-BAH, в митохондриальной мембране [157]. Он также ингибирует активацию транскрипции с участием промоторов BCL-2 [122].

Одним из механизмов, посредством которых ИПФР-1 способствует выживанию клеток, является подавление активности проапоптотического белка Bad. В дополнение к этому наблюдается экспрессия антиапоптотического белка Bcl-xL. ИПФР-1 также поддерживает экспрессию Bcl-2, но механизм не совсем понятен, вероятно, он увеличивает экспрессию Bcl-2 на уровне транскрипции.

Карнитин также взаимодействует с кардиолипином, изменяя проницаемость мембран и защищая функции митохондрий [197].

Митохондриальная дисфункция, апоптоз и окислительный стресс являются взаимосвязанными событиями, лежащими в основе патологии многочисленных заболеваний. Из-за того, что L-карнитин играет решающую роль в метаболизме глюкозы и жирных кислот, он, вероятно, обладает потенциалом для коррекции патологических состояний, однако, необходимы более фундаментальные исследования для выяснения химической основы антиоксидантных и других эффектов карнитина в организме в целом [312].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект наблюдений

Исследование выполнено на 185 конвенциональных половозрелых крысах - самцах линии Wistar массой 230-350 г. [287]. Животные содержались в условиях вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России при естественном освещении, в клетках площадью 24 дм² по 3 - 4 особи. Кормление животных осуществляли сухим кормом для лабораторных животных «Чара» (производство ЗАО «Ассортимент-Агро», Московская область, Пущинский район, д. Тураково), содержащим в том числе 0,7% метионина-цистина в пересчёте на сухое вещество, все витамины группы В, в том числе В₆ – 28 мг/кг, В₉ – 64 мг/кг, В₁₂ – 0,13 мг/кг. Доступ к воде был свободным, из оборудованных в клетках поильниках. Приготовление кормов и расчет рациона выполнялось в соответствии с установленными нормами.

Содержание животных в виварии осуществлялось в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ №51 от 29 августа 2014 г. Выведение животных из эксперимента выполнялось в соответствии с протоколами, изложенными в Приложении А к европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123) «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (статья № 5 конвенции), Страсбург, 15.06.2006 года и правилами надлежащей лабораторной практики – Приложение к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н.

2.2. Экспериментальные модели

Моделирование дефицита синтеза оксида азота

(Экспериментальные группы 1,2, n=8)

Экспериментальное моделирование дефицита синтеза оксида азота осуществляли путем внутрибрюшинного введения неселективного ингибитора NO-синтазы - метилового эфира L-N^ω-нитроаргинина (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 25 мг/кг [28, 176] - *экспериментальная группа 1* и дозе 200 мг/кг [34, 357] - *экспериментальная группа 2*. Введение препарата выполнялось в течение 7 дней ежедневно 1 раз в сутки в утренние часы. Объем вводимого препарата определялся массой животного и не превышал 1 мл. Выведение из эксперимента осуществляли на 8-е сутки.

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота субстратом

NO - синтазы – L-аргинином

(Экспериментальная группа 3, n=8)

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота (II) субстратом NO-синтазы, осуществлялось внутрижелудочным введением раствора L - аргинина («Sigma», США) в 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг [13] с помощью градуированного шприца и зонда. Объем вводимого раствора зависел от массы тела животного и не превышал 1 мл. Препарат вводили до утреннего кормления 1 раз в сутки ежедневно в течение 10 дней. Выведение из эксперимента выполнялось на 11-е сутки.

Моделирование корректирующего действия L-аргинина в условиях экспериментального подавления синтеза оксида азота

(Экспериментальные группы 4,5, n=8)

Для изучения положительного эффекта L-аргинина на фоне назначения ингибитора NO-синтаз - L-NAME проводилось внутрибрюшинное введение раствора L-NAME в физиологическом растворе в дозах 25 (*экспериментальная группа 4*) и 200 мг/кг (*экспериментальная группа 5*) в течение 7 дней с 3-х по 10-е

сутки на фоне перорального назначения L-аргинина по схеме, описанной выше [34]. Животных выводили из эксперимента на 11-е сутки.

Моделирование гипергомоцистеинемии

Моделирование тяжелой формы гипергомоцистеинемии – *группа 6* (n=9) осуществляли путем внутрижелудочного введения крысам с помощью зонда и градуированного шприца 2 раза в день суспензии метионина в дозе 1,5 г на кг массы тела в течение 3 недель [20, 24]. Суспензия включала (по массе): 25% метионина («Sigma-Aldrich», США), 65% 1%-ного водного раствора крахмала (ЗАО «Вектон», Россия) и 10% твина 80 (ЗАО «Вектон», Россия). Объем суспензии определялся массой животного, но не превышал 1,5 мл. Дополнительно данная группа животных получала 1%-ный раствор метионина вместо питьевой воды при свободном доступе к поилкам. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

Крысам *контрольной группы 6* (n=8) подобным образом вводилась суспензия, не содержащая метионин, и, состоящая из 10% твина 80, 90% 1%-ного водного раствора крахмала (по массе) в течение 21 дня.

Изучение эффектов назначения субстрата NO-синтазы - L-аргинина при тяжелой форме гипергомоцистеинемии

(Экспериментальная группа 7, n=8)

Для исследования эффектов L-аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии крысам самцам внутрижелудочно с помощью зонда и градуированного шприца вводили раствор L-аргинина («Sigma», США) *per os* 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг [13] в 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше (с 12 по 21 сутки введения метионина).

Животные *контрольной группы 7* (n=8) получали *per os* 1 раз в сутки 0,9% раствор NaCl в соответствующем расчетном объеме в течение 10 суток одновременно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контрольная группа 6. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

Изучение влияния карнитина хлорида на метаболизм митохондрий

(Экспериментальная группа 8, n=8)

Для изучения влияния карнитина на метаболизм митохондрий крысам самцам внутрижелудочно вводили раствор карнитина хлорида (ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России – ЭПМБП) per os 1 раз в сутки в дозе 300 мг/кг [3], разведенный 1:1 физиологическим раствором в течение 21 дня с помощью зонда и градуированного шприца. Объем вводимого раствора зависел от массы тела животного и не превышал 1,5 мл. Животных выводили из эксперимента на 22-е сутки.

Моделирование корректирующего действия карнитина хлорида в условиях экспериментального подавления синтеза оксида азота

(Экспериментальные группы 9,10 n=8)

Для изучения корректирующего воздействия, карнитина хлорида в условиях экспериментального подавления синтеза оксида азота проводилось внутрибрюшинное введение раствора L-NAME в физиологическом растворе в дозах 25 и 200 мг/кг в течение 7 дней с 14-х по 21-е сутки на фоне перорального назначения карнитина хлорида. Животных выводили из эксперимента на 22-е сутки.

Изучение эффектов карнитина хлорида на фоне тяжелой формы гипергомоцистеинемии

(Экспериментальная группа 11, n=8)

Для изучения эффектов карнитина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии крысам самцам между приемами метионина внутрижелудочно вводили раствор карнитина хлорида (ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России – ЭПМБП) per os 1 раз в сутки в дозе 300 мг/кг [3, 274], разведенный 1:1 физиологическим раствором в течение 21 дня.

Животные *контрольной группы 11* (n=8) получали per os 1 раз в сутки 0,9% раствор NaCl в соответствии с расчетным объемом в течение 3 недель

одновременно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контрольная группа 2. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 22-е сутки.

Формирование контрольных групп

Контрольные группы 1-5, 8-10 (n=8 для каждой группы) были сопоставимы по условиям содержания с экспериментальными особями, возрасту, массе тела и формировались для каждой серии эксперимента. Самцам крыс контрольных групп вводился физиологический раствор, при этом вариант введения, его кратность, объемы раствора и продолжительность совпадали с таковыми для соответствующей экспериментальной группы.

В качестве группы сравнения использовался также материал, полученный от интактных животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями (n=8).

2.3. Получение материала для исследования

2.3.1. Гомогенаты тканей

С целью стандартизации опыта животных лишали пищи за 12 часов до выведения из эксперимента. Эвтаназия животных проводилась под эфирным рауш-наркозом при сохранённом дыхании и сердцебиении путём обескровливания пересечением брюшной аорты, кровь собирали в мерные центрифужные пробирки и подвергали центрифугированию в течение 15 минут при 1000 g (центрифуга CM-6M ELMi, Латвия) с целью получения сыворотки. У животных извлекали органы: сердце, печень и эпидидимис и помещали в холодный раствор (+4⁰C) среды выделения, содержащий 0,25 М сахарозы (Чехия), 0,001 М этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА, ООО «Компания Хеликон», Россия) и 0,02 М трис-HCl буфер с pH=7,4 (ЗАО «Вектон», Россия) [22].

В экспериментальной части работы использовали левый желудочек, в придатке яичка выделяли головку и хвост. Навески тканей взвешивали на электронных весах (AJH-220 SE, Япония), затем измельчали с помощью ножниц

и помещали гомогенизатор «Potter S» (Sartorius, Германия) с зазором между тефлоновым пестиком и стенкой сосуда - 0,16-0,24 мм. Ткани гомогенизировали в среде выделения в соотношении 1:9 левый желудочек сердца при 1500 об/мин 90 секунд; печень и головку эпидидимиса – при 900 об/мин 35 секунд; хвост придатка яичка – при 1000 об/мин 50 секунд. Все манипуляции осуществляли при температуре не выше +4°C.

Контроль гомогенатов проводили морфологически с окраской по Романовскому - Гимза и определением процента неразрушенных клеток, который не должен был превышать 1-2% [27].

2.3.2. Субклеточное фракционирование и получение митохондриальной фракции

Полученные гомогенаты центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин для осаждения ядер и неразрушенных клеток. Надосадочную жидкость использовали для дальнейшего центрифугирования при 14000g в течение 15 минут на рефрижераторной центрифуге К 24 D(ГДР) [22].

Надосадочная жидкость представляла собой цитоплазматическую фракцию и использовалась для определения исследуемых анализов. Осадок, содержащий митохондриальную фракцию, ресуспендировали в среде, не содержащей ЭДТА, и использовали для определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и H⁺-АТФазы. Для анализа содержания метаболитов и активности остальных исследуемых ферментов к части суспензии митохондрий добавляли детергент Тритон X-100 (ООО «Компания Хеликон», Россия) до конечной концентрации 0,02% для разрушения митохондриальных мембран.

2.4. Методы определения концентрации метаболитов и активности ферментов

2.4.1. Определение концентрации белка

Содержание белка в цитоплазме клеток и митохондриях гомогенатов тканей определяли методом Лоури с использованием коммерческого набора НПЦ «Эко-

сервис» (Санкт-Петербург, Россия). Метод основан на способности реактива Фолина-Чокальтеу образовывать окрашенные продукты с ароматическими аминокислотами в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в исследуемой пробе, измеряемой при длине волны 750 нм. Оптическую плотность определяли на КФК 3-01-«ЗОМЗ» (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия). Содержание белка в опытной пробе рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием приготовленного раствора калибровочного бычьего альбумина 0,25 мг/мл, входящего в состав набора.

2.4.2. Определение концентрации метаболитов оксида азота

Суммарную концентрацию нитратов и нитритов (содержание метаболитов оксида азота) определяли спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса [21].

Предварительно исследуемые пробы подвергали депротеинизации путём добавления 96% этилового спирта в соотношении 1:2, после чего пробы центрифугировали при 800 g 20 минут. Для колориметрического определения нитрит-иона использовали реактив Грисса (ООО «Нева Реактив», Санкт-Петербург), растворенный в 12 % уксусной кислоте. Для определения нитрат-иона готовили 8% раствор ванадия хлорида, для этого использовали VCl_3 , растворенный (Acros Organics, США) в 1 М HCl. Реактивы готовили *ex tempore*. В планшет для иммуноферментного анализа вносили равные объёмы исследуемой пробы, раствора реактива Грисса и раствора VCl_3 с последующим 30 минутным инкубированием при 37°C. Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра с регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology, США) при длине волны 540 нм с дифференциальным светофильтром 630 нм против контроля реактивов и выражали в мкмоль/г белка. Расчёт концентрации метаболитов NO осуществляли с помощью калибровочной кривой, построенной из серии разведений водного раствора $NaNO_2$:

для сыворотки крови

$$X = Ext * k * P \quad (1)$$

для гомогенатов тканей

$$X = Ext * k * P/a \quad (2)$$

X – концентрация нитритов, мкмоль/г белка,

Ext – оптическая плотность,

k – фактор пересчёта концентрации в мкмоль/л, полученный исходя из калибровочного графика,

P – разведение,

a – концентрация белка в пробе в г/л

2.4.3. Определение концентрации общего и свободного L-карнитина в плазме крови, тканях

Концентрацию карнитина в сыворотке крови, цитоплазматической и митохондриальной фракциях гомогенатов тканей крыс определяли по методу L. Wan и R.W. Hubbard [356]. Метод основан на реакции L-карнитина с ацетил-КоА, катализируемой карнитинацетилтрансферазой, протекающей с образованием ацетилкарнитина и свободного КоASH, реагирующего неэнзиматически с 5,5-дителиобис-2-нитробензоатом (DNТВ) и образующего окрашенный продукт - 5-тио-2-нитробензоат, интенсивность которого, пропорциональна содержанию L-карнитина.

Реактивы

1. 50 мМ НЕРЕС/КН₂РО₄/ К₂НРО₄ буфер с рН=7,5.

5 мл 1 М НЕРЕС («Sigma», США) буфера разбавляли до 100 мл фосфатным буфером, который получали путем растворения 1,19 г одноосновного фосфата калия (ЗАО «Вектон», Россия) и 2,83 г двухосновного фосфата калия (ЗАО «Вектон», Россия) в 100 мл воды;

2. 0,02% раствор DTNB («Sigma», США) в 100 мл 50 мМ НЕРЕС/КН₂РО₄/ К₂НРО₄ буфера;

3. 0,25% водный раствор ацетил КоА («Sigma», США);

4. Карнитинацетилтрансфераза (ЕС 2.3.1.7, «Sigma», США), 50 мкл фермента разводили дистиллированной водой 1:100;

5. 70 % HClO_4 («Sigma», США), 18 мл кислоты разводили в 100 мл дистиллированной воды;

6. 2М водный раствор КОН (ЗАО «Вектон», Россия);

7. 5 мМ водный раствор L-карнитина («Sigma», США).

Ход определения

Подготовка образцов для определения концентрации общего карнитина.

200 мкл образца сыворотки крови или гомогената тканей смешивали с 10 мкл 2 М КОН и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре для полного гидролиза эфирных связей. Затем в смесь вносили 40 мкл раствора HClO_4 , перемешивали в течение 10 секунд и добавляли 30 мкл 2 М КОН для нейтрализации. Полученный раствор центрифугировали при 3000 g 5 мин, супернатант использовали для определения.

Подготовка образцов для определения концентрации свободного карнитина.

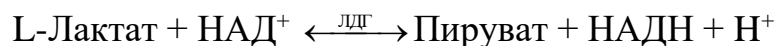
К 200 мкл образца сыворотки крови или гомогената тканей добавляли 40 мкл раствора HClO_4 , смешивали и вносили 40 мкл 2 М КОН для нейтрализации и центрифугировали при 3000 g 5 мин.

В микропробирку иммуноферментного анализатора добавляли среду инкубации, содержащую 180 мкл 50 мМ $\text{HEPES}/\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ буфера с 0,02% DNTB, pH=7,5; 25 мкл опытной пробы; 20 мкл раствора ацетил-КоА. Реакцию инициировали внесением 35 мкл раствора карнитин-ацетилтрансферазы. После этого определяется оптическую плотность при длине волны 410 нм против контроля (буферный раствор) на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200, (Awareness Technology Inc., США). Расчёт концентрации карнитина проводили по калибровочной кривой, построенной из серии разведений водного 5мМ раствора L-карнитина. Результаты выражали в мкмоль/л сыворотки крови и мкмоль/г белка.

2.4.4. Определение концентрации лактата

Проводили с использованием коммерческого набора для определения концентрации лактата в биологических жидкостях (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, ФРГ).

Лактат под действием лактатдегидрогеназы, коферментом, которой является НАД⁺ восстанавливается в пируват с образованием НАДН, который регистрируется при длине волны 340 нм. Интенсивность поглощения образуемого НАДН пропорционально концентрации лактата в образце:



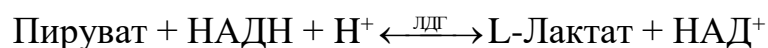
Измерение оптической плотности выполняли на биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ (Awareness Technology Inc., США).

Оценку уровня лактата осуществляли исходя из оптической плотности раствора калибратора, входящего в состав набора и выражали в мкмоль/г белка.

2.4.5. Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

Осуществляли с помощью коммерческого набора LDH FS (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, ФРГ).

Метод основан на определении убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нм в процессе реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой по снижению концентрации НАДН в единицу времени [153]:

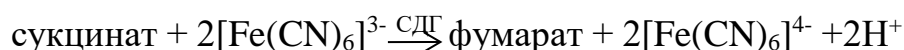


Измерение оптической плотности проводили на биохимическом анализаторе StatFax 1904+ (Awareness Technology Inc., США). Активность фермента в цитоплазматической и митохондриальной фракциях гомогенатов тканей выражали в Ед/г белка.

2.4.6. Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ)

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) катализирует реакцию дегидрирования сукцината в фумарат. Под действием СДГ сукцинат восстанавливает феррицианид калия ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), раствор которого имеет желтую окраску, до бесцветного ферроцианида калия ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) [22]. Активность фермента пропорциональна количеству восстановленного феррицианида.

Схема реакции:



Реактивы

1. 0,1 М фосфатный буфер с pH=7,8.
2. 0,1 М раствор янтарной кислоты (ООО «Компонент-Реактив», Россия).
3. 25 мМ раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ (ЗАО «Вектон», Россия).
4. 25 мМ раствор ЭДТА (ООО «Компания Хеликон», Россия).
5. 0,15 М раствор азиды натрия (Диаэм, Россия).
 6. 20%-ный раствор ТХУ (ЗАО «Вектон», Россия).

Ход определения

В пробирки вносят инкубационную смесь следующего состава:

1. 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,8 – 0,5 мл
2. 0,1 М янтарная кислота, pH 7,8 – 0,05 мл
3. 25 мМ ЭДТА, pH 7,8 – 0,05 мл
4. 150 мМ азид Na – 0,05 мл
5. H_2O – 0,05 (0,02) мл

- в скобках указаны объемы для определения активности СДГ в митохондриях эпидидимиса

В пробы вносят по 0,2 (0,05) мл суспензии митохондрий. Образцы инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин для ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия.

Реакцию начинают прибавлением к пробам 0,05 мл раствора феррицианида калия, пробы инкубируют в течение 15 мин. при температуре 30°C.

После инкубации реакцию останавливают добавлением к пробам 1,0 мл 20 % ТХУ.

В контрольные пробы, содержащие все компоненты инкубационной смеси, ТХУ добавляется перед внесением суспензии митохондрий. В контрольных пробах сукцинатдегидрогеназа с начала инкубации полностью денатурирована и специфического восстановления феррицианида сукцинатом не происходит.

После остановки реакции пробы центрифугируют при 2000 об/мин в течение 15 мин для осаждения денатурированного митохондриального белка. Прозрачную надосадочную жидкость фотометрируют на спектрофотометре при

420 нм. Оптическим контролем служит смесь 20 % ТХУ и 0,1 М фосфатного буфера в соотношении 1:1. Экстинкцию определяли на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Для определения содержания феррицианида в пробах по результатам фотометрирования проб, содержащих от 100 до 1000 мкг феррицианида в 4 мл раствора строили калибровочную кривую. По разности экстинкций ($E_k - E_0$) рассчитывают количество феррицианида, восстановленного за время инкубации.

Поскольку реакция протекает стехиометрически и 1 моль сукцината восстанавливает 2 моля феррицианида, можно выражать активность СДГ количеством окисленного сукцината.

Активность фермента (в нмоль сукцината / мг белка за 1 мин) вычисляется по формуле:

$$A = m * \frac{1000}{2M} * a * t * V \quad (3)$$

A – активность СДГ, нмоль сукцината/(мг белка*мин);

1000 – коэффициент пересчета мкмоль в нмоль;

m – масса восстановленного феррицианида калия в пробе, мкг (по калибровочному графику);

2 – стехиометрический коэффициент в уравнении реакции восстановления феррицианида калия сукцинатом;

M – молекулярная масса феррицианида калия (329,25), г/моль;

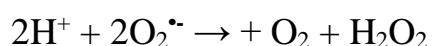
a – содержание белка в пробе, мг/мл;

t – время инкубации (15), минут;

V – объем пробы, взятый на анализ (0,02 или 0,05), мл.

2.4.7. Определение активности СОД

Окисление кверцетина в присутствии тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) при рН 10 представляет собой свободнорадикальную цепную реакцию с участием супероксида и, следовательно, ингибируется супероксиддисмутазой (СОД) (ЕС 1.15.1.1). Степень ингибирования окисления кверцетина зависела от активности СОД [1].



Реактивы

- 1) 0,2 М бикарбонатный буфер с рН=10,0.
- 2) 0,05 М раствор ТЕМЕД (ООО «Компания Хеликон», Россия).
- 3) 0,5 мМ раствор ЭДТА (ООО «Компания Хеликон», Россия).
- 4) Раствор №1: 40 мл 0,5 мМ ЭДТА + 0,28 мл 0,05 М ТЕМЕД. Готовится ex tempore.
- 5) 0,5 мМ раствор кверцетина (Alfa Aesar, Великобритания) в диметилсульфоксиде (ДМСО, ООО «Компания Хеликон», Россия).

Ход определения

Измерение активности супероксиддисмутазы проводили в кювете фотоколориметра, куда вносили следующие компоненты:

0,2 М Бикарбонатный буфер (рН=10,0) - 0,5 мл

Раствор №1 - 0,5 мл

Дистиллированная вода - 1,85/1,87/1,88 *

Суспензия митохондрий - 0,05 / 0,02 мл

* - для измерения активности СОД в митохондриях сердца и эпидидимиса добавляли 1,85 мл дистиллированной воды и 0,05 мл суспензии митохондрий, в митохондриях печени – 1,88 мл и 0,02 мл.

Холостая и контрольная пробы содержали по 0,5 мл 0,2 М Бикарбонатного буфера (рН=10,0), 0,5 мл раствора №1 и 2, 0 мл дистиллированной воды для холостой пробы (используется для выведения на 0 и готовится 1 на серию) и 1,9 мл - для контрольной пробы (применяется для измерения свободного аутоокисления кверцетина в отсутствие СОД и готовится 1 на серию).

Определение оптической плотности осуществляли на фотоколориметре КФК 3-01-«ЗОМЗ» (ОАО «ЗОМЗ», Россия).

Реакция инициируется добавлением контрольную и опытную пробы 0,1 мл 0,5 мМ раствора кверцетина в ДМСО, содержимое перемешивается и сразу же регистрируется оптическая плотность (E_{k0}) против холостой пробы при длине волны 406 нм. Следующее измерение проводим через 10 мин и далее рассчитывали уменьшение оптической плотности за 10 минут: $\Delta E_k = E_{k0} - E_{k10}$ и

$\Delta E_o = E_{o_0} - E_{o_{10}}$. ΔE_o должна быть в 2-2,5 раза ниже, чем ΔE_k , что корректируется изменением объёма биоматериала (при этом объём всех проб доводится до 3 мл дистиллированной водой).

Удельную активность СОД рассчитывают по формуле:

$$A = (\Delta E_k / \Delta E_o - 1) / (a * V) \quad (4)$$

A – активность СОД, условных единиц на мг белка (у.е./ мг белка);

ΔE_k – уменьшение оптической плотности контрольной пробы за 10 минут;

ΔE_o - уменьшение оптической плотности опытной пробы за 10 минут;

a - концентрация белка в пробе в мг/мл;

V – объём суспензии митохондрий в мл.

2.4.8. Определение активности Н⁺-АТФазы

Фермент Н⁺-АТФаза в присутствии кофактора ионов Mg²⁺ гидролизует АТФ до АДФ и неорганического фосфата:

$ATP + H_2O + H^+(\text{в матриксе}) \leftrightarrow ADP + H_3PO_4 + H^+(\text{в межмембранном пространстве})$

Об активности фермента судят по скорости образования неорганического фосфата, определяемого по накоплению фосфомолибдата аммония, восстанавливаемого аскорбиновой кислотой в молибденовую синь, оптическая плотность которой прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфата [2].

Реактивы

- 1) 0,05 М трис-НСl буфер с рН=7,4 (ЗАО «Вектон», Россия).
- 2) 0,18 М водный раствор MgCl₂ (ЗАО «Вектон», Россия).
- 3) 0,01 М водный раствор динатриевой соли АТФ (Диаэм, Россия).
- 4) Молибденовый реактив.
- 5) 1% раствор аскорбиновой кислоты в 0,1 М НСl (ЗАО «Вектон», Россия).
- 6) 10%-ный водный раствор ТХУ (ЗАО «Вектон», Россия).

Ход определения

Определение активности фермента проводят в двух параллельных пробах, для этого в опытную и контрольную пробирки добавляют по 2,1 мл трис-НСl

буфера, 0,1 мл раствора $MgCl_2$ и 0,4 мл раствора АТФ. Пробы инкубируют при $37^\circ C$ 10 минут в термобане. Затем в экспериментальную пробу вносят 0,05 мл суспензии митохондрий, а в контрольную – сначала вносят 0,9 мл 10%-ного раствора ТХУ, после чего добавляют 0,05 мл суспензии митохондрий и перемешивают. Обе пробы инкубируют при $37^\circ C$ 15 минут. После чего в опытную пробу добавляют 0,9 мл 10%-ного раствора ТХУ и центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин. В получившемся центрифугате определяют неорганический фосфат: к 1,5 мл супернатанта добавляют 1 мл молибдата аммония и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты. Через 10 минут определяют оптическую плотность опытной и контрольной проб при длине волны 660 нм против раствора реактивов (1,5 мл раствора ТХУ + 1,5 мл дистиллированной воды).

Об активности H^+ -АТФ-азы судят по разнице между накопившимся неорганическим фосфатом за период инкубации (проба 1) и его исходным уровнем в суспензии митохондрий (проба 2). Определение оптической плотности проводили на КФК 3-01-«ЗОМЗ» («ЗОМЗ», Россия). Концентрацию неорганического фосфата рассчитывали по калибровочному графику. Активность H^+ -АТФазы определяли по формуле:

$$A = (E_{оп} - E_{к}) * f * 3,55 * 60 / (a * 0,05 * 31 * 1,5 * 15) \quad (5)$$

A – активность H^+ -АТФазы в мкмоль фосфата/(мг белка*час);

$E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$E_{к}$ – оптическая плотность контрольной пробы;

f – коэффициент пересчёта в мкг неорганического фосфора, найденный по калибровочному графику;

$3,55/1,5$ – пересчет на полный объём пробы (так как для определения неорганического фосфора брали 1,5 мл из 3,55 мл);

$60/15$ – пересчёт активности на 1 час;

a – концентрация белка в суспензии митохондрий, мг/мл;

31 – молярная масса фосфора, г/моль;

$0,05$ – объём суспензии митохондрий, взятый для определения, мл.

2.4.9. Определение концентрации общего гомоцистеина

Гомоцистеин – это тиолсодержащая аминокислота, образующаяся путем внутриклеточного деметилирования метионина. Общий гомоцистеин представляет собой сумму всех форм гомоцистеина, включая окисленные формы, формы, связанные с белком и свободные. Поэтому метод определения основан на восстановлении всех форм гомоцистеина в свободный гомоцистеин, который энзиматически превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин.

Последующий иммуноферментный анализ S-аденозил-L-гомоцистеина проводили с помощью Axis® Homocysteine EIA (Axis-Shield Diagnostics Ltd., Великобритания). Абсорбция находится в обратной зависимости от концентрации гомоцистеина [25]. Расчет концентрации гомоцистеина проводили по калибровочному графику, используя калибровочные растворы, входящие в состав набора.

Измерение проводили на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США).

2.4.10. Определение синтазы оксида азота I методом ИФА (организм: человек/крыса)

Иммуноферментный анализ проводили с помощью набора ИК 100 Human/Rat NO- Synthase I EIA Kit (Япония). Микропланшет в наборе сорбирован специфическими антителами к NOS1. В лунки добавляются контрольные и опытные образцы, затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, с последующей их инкубацией. После которой добавляется стоп-реагент, оптическая плотность измерялась фотометрическим методом при длине волны 450 нм на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Расчет содержания NO-синтазы проводили по калибровочному графику, используя калибровочные растворы, входящие в состав набора и выражали в пмоль/мл.

2.4.11. Оценка окислительной модификации белков

Для оценки окислительной модификации белков определяли уровень карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ):

Образующиеся при этом 2,4-динитрофенилгидразоны обладают специфическим спектром поглощения в видимой и ультрафиолетовой части спектра [14].

Реактивы

- 1) 20%-ный водный раствор ТХУ (ЗАО «Вектон», Россия).
- 2) 10% раствор стрептомицина сульфата (ОАО «Биохимик», Россия) на физиологическом растворе.
- 3) 0,01 М раствор 2,4-ДНФГ в 2 М растворе HCl (ЗАО «Вектон», Россия).
- 4) 2 М раствор HCl (ЗАО «Вектон», Россия).
- 5) 4 mM раствор сульфата железа (II) (ЗАО «Вектон», Россия). Готовится *ex tempore*.
- 6) 0,3 mM раствор H₂O₂ (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»). Готовится *ex tempore*.
- 7) 1 mM раствор ЭДТА (ООО «Компания Хеликон», Россия).
- 8) Этанол 96%.
- 9) Этилацетат (ЗАО «База №1 Химреактивов», Россия).
- 10) 8 М раствор мочевины (ЗАО «Вектон», Россия).

Ход определения

Для осаждения присутствующих нуклеиновых кислот суспензию митохондрий смешивали с раствором стрептомицина сульфата в соотношении 9:1, оставляли на 15 минут и затем центрифугировали в течение 10 минут при 800 g. 0,1 мл супернатанта вносили в 4 пробирки. Первые две использовали для определения количества карбонильных производных спонтанной окислительной модификации белков (спонтанной ОМБ), а третья и четвертая – для оценки карбонильных производных, сформировавшихся по металл-катализируемому механизму (индуцируемая ОМБ). Для выявления спонтанной ОМБ - в пробы вносят по 1 мл раствора ТХУ для осаждения белков, а затем в опытную пробу

добавляли 1 мл раствора ДНФГ в 2М HCl, а в контрольную – 1 мл 2 М HCl. После инкубации проб при комнатной температуре в течении 1 часа их центрифугировали при 1000 g 15 минут. Образующийся при этом осадок промывали трижды смесью этанола и этилацетата (1:1) для удаления излишков 2,4-ДНФГ и экстракции липидов. После высушивания на воздухе осадок растворяли в 3 мл 8 М раствора мочевины, для улучшения растворения вносили каплю 2 М HCl. Для оценки металлкализируемой ОМБ в обе пробы предварительно добавляли в обе пробы 0,1 мл раствора 4 мМ сульфата железа (II), 1 мМ ЭДТА (среда Фентона) и 0,3 мМ H₂O₂ и затем проводили аналогичные процедуры.

Регистрацию оптической плотности для оценки количества карбонильных производных проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия). Для измерения количества динитрофенилгидразонов нейтрального характера измеряли оптическую плотность в ультрафиолетовой части спектра при длинах волн 230, 254, 270, 280, 356 нм (максимумы поглощения альдегиддинитрофенилгидразонов), 363 и 370 нм (максимумы поглощения кетондинитрофенилгидразонов), а для основных динитрофенилгидразонов – в видимой части спектра при длинах волн 428 и 430 нм (максимумы поглощения альдегиддинитрофенилгидразонов) и 434, 524, 530, 535 нм (максимумы поглощения кетондинитрофенилгидразонов).

Строили график зависимости оптической плотности от длины волны. Количество карбонильных производных аминокислотных остатков в белках оценивали по площади под кривой, разбивая её на прямоугольные трапеции [33]. Таким образом, площадь под кривой ($S_{омб}$) складывалась из 4 составляющих:

$$S_{омб} = S_{АДНФГнейтр} + S_{АДНФГосн} + S_{КДНФГнейтр} + S_{КДНФГосн} \quad (6)$$

Каждая из них количественно характеризовала фракцию динитрофенилгидразонов: альдегид - и кетондинитрофенилгидразоны нейтрального и основного характера.

Полученные значения выражали в условных единицах на грамм белка.

Указанный метод позволяет оценить как суммарное содержание карбонильных производных белков по общей площади под кривой $S_{омб}$, так и

определить долю первичных и вторичных маркеров окислительной деструкции белков. Как известно, первичными маркерами (маркерами фрагментации) являются альдегиды [32]. Их количество характеризует сумма $S_{\text{АДНФГ}} = S_{\text{АДНФГ нейтр}} + S_{\text{АДНФГ осн}}$. Вторичными маркерами (маркерами агрегации) являются кетоны [15]. Их количество характеризует сумма $S_{\text{КДНФГ}} = S_{\text{КДНФГ нейтр}} + S_{\text{КДНФГ осн}}$. Долю первичных и вторичных маркеров вычисляли как процент $S_{\text{АДНФГ}}$ и $S_{\text{КДНФГ}}$ от $S_{\text{омб}}$. Кроме того, этот метод позволяет определить, какие аминокислотные остатки в большей степени подверглись окислению – нейтральные или основные. Для этого вычисляли $S_{\text{нейтр}} = S_{\text{АДНФГ нейтр}} + S_{\text{КДНФГ нейтр}}$ и $S_{\text{осн}} = S_{\text{АДНФГ осн}} + S_{\text{КДНФГ осн}}$.

Помимо определения спонтанной ОМБ, оценивали резервно-адаптационный потенциал (РАП). Для этого рассчитывали процент продуктов спонтанного окисления к индуцированному, которое принимали за 100%. Чем выше доля спонтанного окисления, тем ниже РАП и наоборот.

2.5. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программ Microsoft Office Excel 2013, StatSoft Statistica 10.0, «GraphPad Prism 9.0». Для проверки наличия отклонений распределения от нормального использовали многосторонний критерий Шапиро-Уилка (W-критерий) согласно ГОСТ Р ИСО 5479-2002 [11]. Так как распределение полученных данных отличались от нормального, для описания показателей использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q_1 и Q_3), результаты представляли в форме Me [Q_1 , Q_3]. Для анализа статистической значимости различий независимых выборок по количественному признаку использовали критерий Краскела-Уоллиса и U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений или U-критерий Манна-Уитни при сравнении 2 групп [9, 30]. Анализ корреляционных взаимосвязей осуществлялся с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали отличия, вероятность которых при условии справедливости нулевой гипотезы (гипотезы об отсутствии различий) составляет менее 5% ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изменения функционирования митохондрий при воздействии модуляторов синтеза оксида азота

3.1.1. Характеристика экспериментальных моделей

Для исследования влияния на организм животных состояния дефицита оксида азота (NO) были выбраны следующие экспериментальные модели:

- 1) введение экспериментальным животным неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира N^o-нитро-L-аргинина (L-NAME) 25 мг/кг в течение 7 дней [28, 176];
- 2) L-NAME 200 мг/кг в течение 7 дней [357].

Для исследования влияния модуляторов синтеза оксида азота, кроме L-NAME, использовался субстрат для синтеза оксида азота L-аргинин.

Механизм ингибирования NO-синтазы и, соответственно, снижение содержания NO аналогами субстрата L-аргинина, такими как: NG, NG-диметил-L-аргинин (ADMA), NG, NG'-диметил-L-аргинин (SDMA) и NG-монометил-L-аргинин (L-NMMA) заключается в конкурентной связи с ферментом и с белками-транспортерами. В большинстве случаев после добавления L-аргинина такое ингибирование синтеза NO *in vivo* обратимо. Одним из наиболее часто используемых заместителей L-аргинина является N^o-нитро-L-аргинин (L-NA) или его этерифицированная форма метилового эфира N^o-нитро-L-аргинина (L-NAME), применяемый в настоящем исследовании, он считается неселективным ингибитором [12, 176]. Этерификация карбоксильной группы L-NA повышает растворимость в воде, что упрощает экспериментальное использование этого аналога. С другой стороны, необходима специфическая эстераза, чтобы в полной мере проявлялось ингибирующее действие в ткани [12].

Введение L-NAME приводит к изменениям артериального давления и сосудистой реактивности из-за снижения биодоступности оксида азота, но также в литературе имеются данные, что более низкие дозы L-NAME могут активировать выработку NO через регуляторные механизмы обратной связи [176].

Такая активация, индуцированная L-NAME, наблюдалась как в экспрессии, так и в активности NOS и выявила значительные различия в регуляторных механизмах продукции NO между отдельными тканями в зависимости от количества L-NAME [176]. Поэтому были выбраны две различные дозы ингибитора: L-NAME 25 мг/кг в течение 7 дней (умеренная концентрация) и L-NAME 200 мг/кг (высокая концентрация).

В качестве объектов исследования взяты ткани с высоким содержанием L-карнитина и важной выполняемой функцией в них: сердце, печень [81], эпидидимис [126]. Также показано наличие в них достаточной активности ферментов генерации NO.

3.1.2. Изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс в условиях экспериментального дефицита NO, вызванного введением L-NAME в дозах 25 мг/кг и 200 мг/кг

Адекватность моделирования ингибирования NO-синтаз в условиях модели L-NAME 25 мг/кг подтверждалась снижением уровня метаболитов NO (NO_x) в сыворотке крови (Рисунок 10), цитоплазме клеток головки эпидидимиса и митохондриях сердца, головки и хвоста придатка яичка (Таблица 1). При назначении L-NAME в дозе 200 мг/кг этот эффект был статистически значимо более выражен: концентрация NO_x уменьшалась в сыворотке крови, митохондриях и цитоплазме клеток всех исследуемых органов.

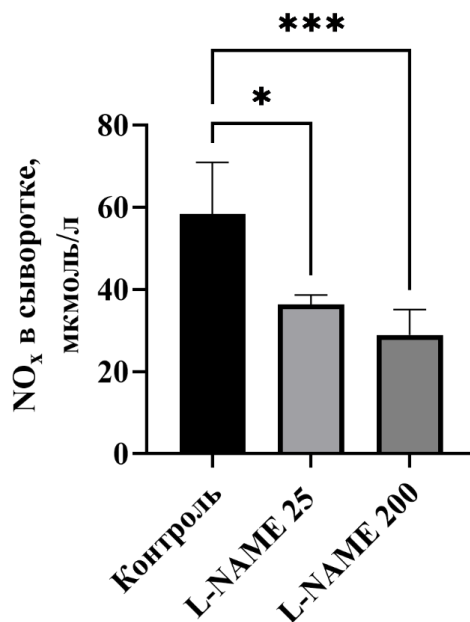


Рисунок 10 – Концентрация NO_x в сыворотке крови исследуемых групп животных при введении L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом *** - различия групп при $p < 0,001$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Таблица 1 – Концентрация NO_x в тканях крыс, при введении L-NAME, мкмоль/г белка: Me [Q₁; Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Цитоплазма				
Физиологический раствор (контроль2)	31,81 [29,23;41,87]	24,13 [20,34;32,0]	45,98 [41,1; 49,13]	58,20 [52,13; 69,2]
L-NAME 25 мг/кг 7 суток	24,27 [21,74; 30,13] p=0,05203	20,51 [18,12;23,83] p=0,1278	34,65 [29,68; 40,17]* p=0,0010	54,58 [46,33;62,22] p=0,3708
L-NAME 200 мг/кг 7 суток	22,87 [17,87;25,32]** p=0,0053	18,21 [15,36;19,11]** p=0,00277	28,13 [24,49; 33,6]** p=0,00094	50,09 [44,42;56,54]** p=0,04902

<i>Митохондрии</i>				
Физиологический раствор (контроль 2)	53,68 [47,66;68,98]	35,31 [32,07;39,47]	59,95 [49,26; 64,57]	70,73 [55,38;111,96]
L-NAME 25 мг/кг 7 суток	43,25 [32,36; 47,27]* p=0,0313	29,42 [22,85; 33,96] p=0,1035	32,36 [21,11; 50,00]* p=0,01813	32,50 [17,83; 52,60]* p=0,00094
L-NAME внутривенно 200 мг/кг 1 р.д. 7 суток	19,60 [8,64; 28,01]** p=0,00094	23,60 [19,19; 27,31]** p=0,00387	22,68 [18,23; 25,84]** p=0,00094	28,04 [25,68; 36,95]** p=0,00094

Примечание: * - изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы ($p < 0,05$) относительно контрольной группы; ** - изменения в серии L-NAME 200 мг/кг статистически значимы ($p < 0,05$) относительно контрольной группы

Экспериментальный дефицит NO в митохондриях сердца сопровождался увеличением общего количества карбонильных производных аминокислотных остатков белков ($S_{\text{общ}}$) в обеих применяемых дозах ингибитора L-NAME (Рисунок 11).

При этом усиливалось окисление нейтральных аминокислот, и возрастало образование преимущественно альдегидов (АДНФГ) – первичных маркеров окислительной деструкции белков, содержание кетонов (вторичных маркеров окислительного повреждения - КДНФГ) статистически значимо не менялось. Доля основных и нейтральных динитрофенилгидразонов, как и соотношение первичных и вторичных маркеров окислительного повреждения белков не изменялась.

Анализ соотношения показателей спонтанной и металл - катализируемой ОМБ показал, что резервно-адаптационный потенциал (РАП) митохондриальных белков сердца в серии с применением L-NAME в дозе 25 мг/кг был на 32,8% меньше ($p = 0,0136$), чем в контрольной группе с введением только физраствора

(Таблица 2). При увеличении дозы L-NAME наблюдалось менее выраженное истощение РАП ОМБ.

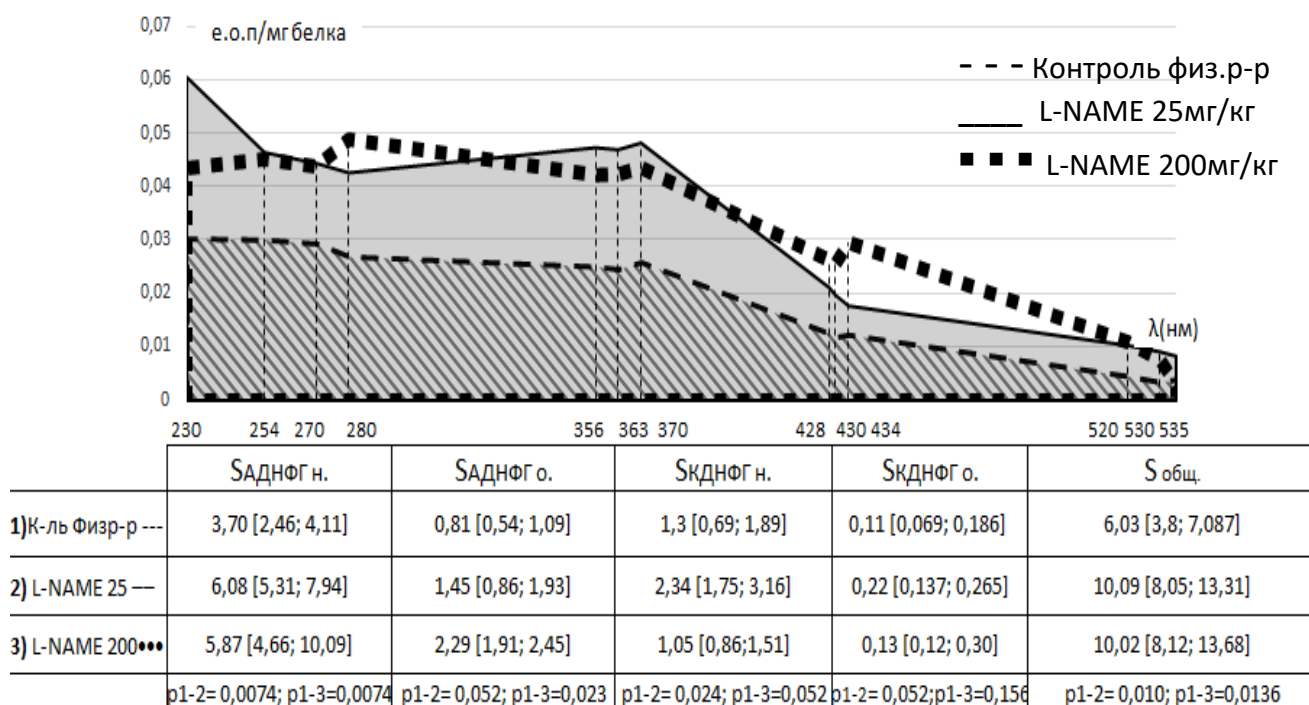


Рисунок 11 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в кардиомиоцитах при введении L-NAME,

Me [Q₁; Q₃]

Примечание: в данном рисунке и далее по тексту:

- S_{АДНФ_{н.}} - содержание альдегиддинитрофенилгидразонов нейтральных аминокислот;
- S_{АДНФ_{о.}} - содержание альдегиддинитрофенилгидразонов основных аминокислот;
- S_{КДНФ_{н.}} - содержание кетондинитрофенилгидразонов нейтральных аминокислот;
- S_{КДНФ_{о.}} - содержание кетондинитрофенилгидразонов основных аминокислот;
- S_{общ.} - общее количество карбонильных производных аминокислотных остатков белков

Изучение активности митохондриальной СОД показало активацию антиоксидантной защиты кардиомиоцитов, о чем свидетельствовало увеличение активности данного фермента, что особенно, проявлялось при введении крысам высокой дозы L-NAME (увеличение активности в 12,3 раза относительно контрольной группы (p=0,00021)).

Таблица 2 – Изменение маркерных показателей окислительного стресса в митохондриях исследуемых органов при введении L-NAME, Me [Q₁; Q₃]

Показатели/ Группы	Физ. Раствор (1)	L-NAME 25 мг/кг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)
<i>Сердце</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	0,93 [0,77;1,37]	2,65 [2,39; 3,63] p ₁₋₂ = 0,08513	11,51 [7,54;13,66]** ▲ p ₁₋₃ =0,00021; p ₂₋₃ = 0,0125
S ОМБ, СП/МК (РАП %)	56,25 [39,112; 60,45]	77,45 [63,98; 86,64]* p ₁₋₂ = 0,0136	68,21 [55,58; 90,41] p ₁₋₃ = 0,04412; p ₂₋₃ = 0,7928
<i>Печень</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	6,76 [5,80; 9,21]	11,92 [9,90; 15,66] p ₁₋₂ = 0,03272	6,03 [4,74; 7,30]▲ p ₁₋₃ = 1,0000; p ₂₋₃ = 0,00206
S ОМБ, СП/МК (РАП %)	40,58 [33,22; 46,87]	53,46 [28,12; 64,78] p ₁₋₂ = 0,4308	58,24 [54,19; 83,20] p ₁₋₃ = 0,1562; p ₂₋₃ = 0,8314
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	34,37 [32,68; 38,84]	3,80 [1,61; 9,88]* p ₁₋₂ =0,00094	6,17 [4,45; 8,54]** p ₁₋₃ = 0,00094; p ₂₋₃ =0,6365
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	33,12 [27,34; 46,12]	80,83 [62,22; 95,52]* p ₁₋₂ =0,00191	76,67 [68,41; 86,67]** p ₁₋₃ = 0,0013; p ₂₋₃ =0,7928
<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	30,89 [28,10; 43,66]	5,54 [3,99; 10,51]* p ₁₋₂ =0,00094	5,44 [3,81; 9,08]** p ₁₋₃ = 0,00094; p ₂₋₃ =0,7131
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	41,06 [35,57; 47,21]	64,36 [52,72; 72,12]* p ₁₋₂ =0,0074	78,93 [75,56; 83,12]** ▲ p ₁₋₃ = 0,0013; p ₂₋₃ =0,0136

Примечание: * - с учетом поправки Бонферрони изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы относительно контрольной группы при p<0,017; ** - изменения в серии L-NAME 200 мг/кг статистически значимы относительно контроля (p<0,017); ▲ - изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы относительно серии L-NAME 200 мг/кг (p<0,017)

Общее количество карбонильных производных протеинов в митохондриях печени также увеличивалось как при дозе L-NAME 25 мг/кг, так и при дозе 200 мг/кг (Рисунок12). При этом повышалось содержание и АДНФГ и КДНФГ.

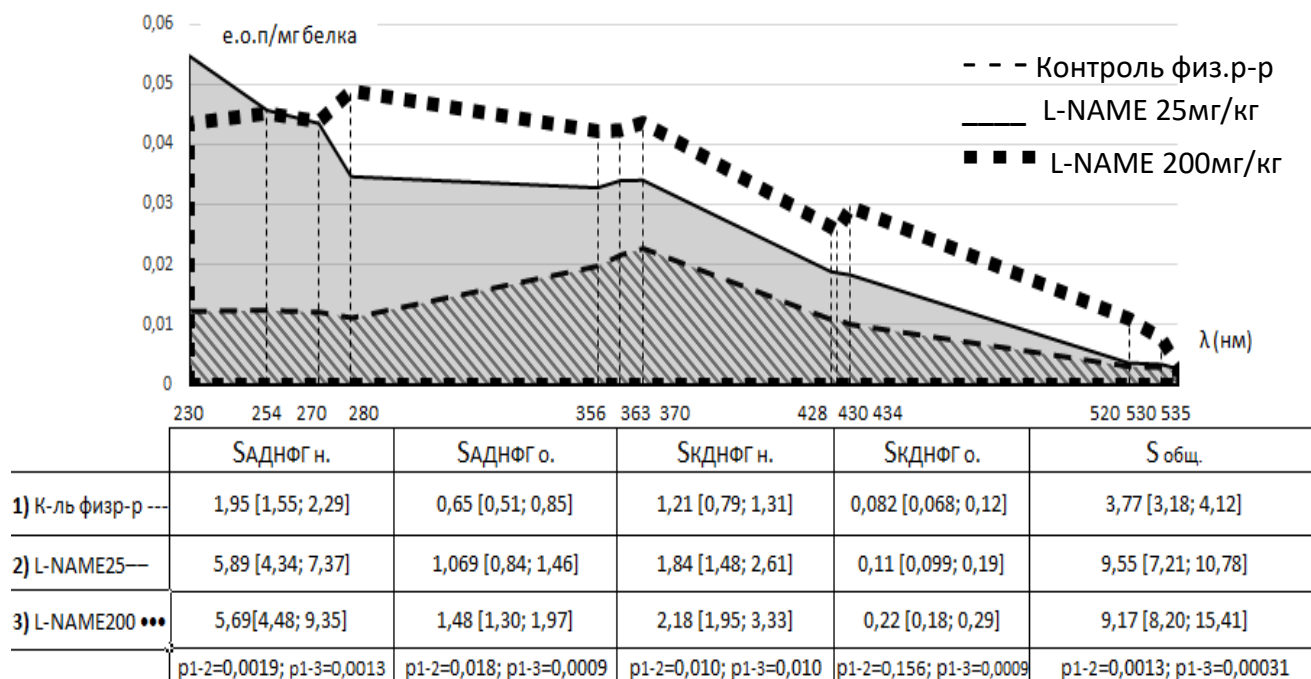


Рисунок 12 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в гепатоцитах при введении L-NAME, Me [Q₁; Q₃]

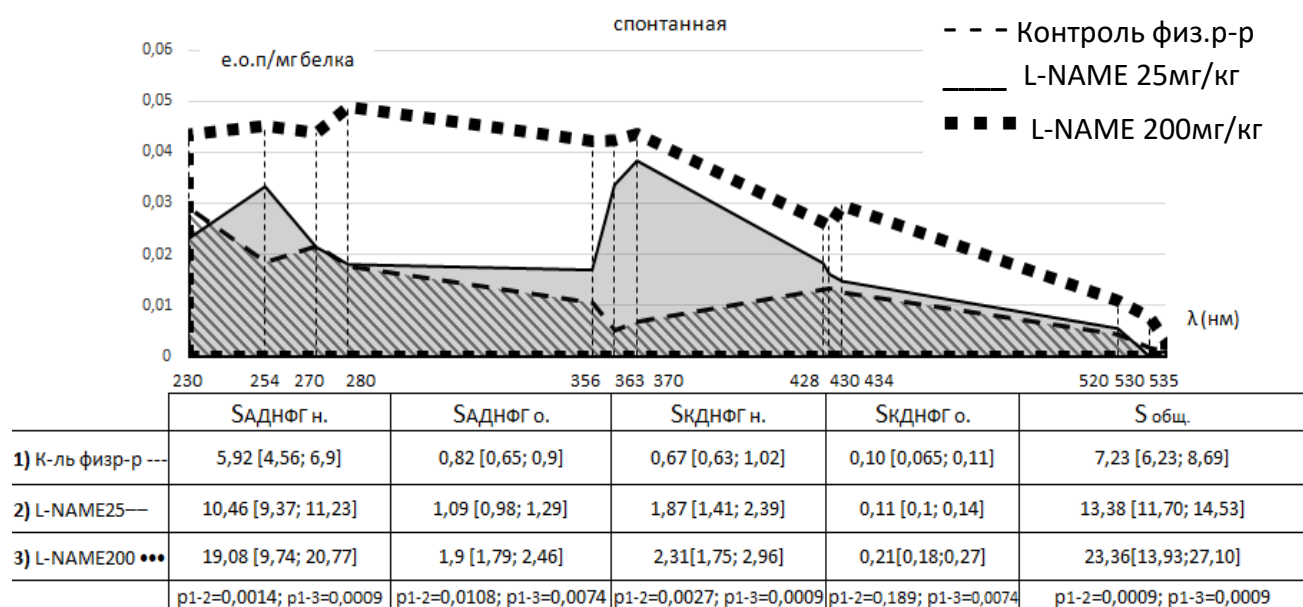
Возрастание дозы L-NAME приводило к повреждению не только нейтральных, но и основных аминокислотных остатков.

Оценка РАП ОМБ митохондрий печени не выявила статистически значимого его изменения относительно контрольной группы в обеих назначаемых дозах L-NAME (Таблица 2).

Таким образом, в митохондриях печени создаются условия для более глубокого повреждения белковых структур, о чем свидетельствует появление КДНФГ, однако, можно предполагать наличие у гепатоцитов более высокой устойчивости к окислительному стрессу, на что указывает сохранение объема РАП ОМБ. Все это позволяет им поддерживать высокую метаболическую активность, даже в условиях усиления карбонилирования белков.

В митохондриях тканей головки эпидидимиса при L-NAME-индуцированном дефиците NO также определялся статистически значимый прирост количества карбонильных производных нейтрального и основного характера как за счёт АДНФГ, так и за счёт КДНФГ относительно контрольной группы (Рисунок 13А).

А



В

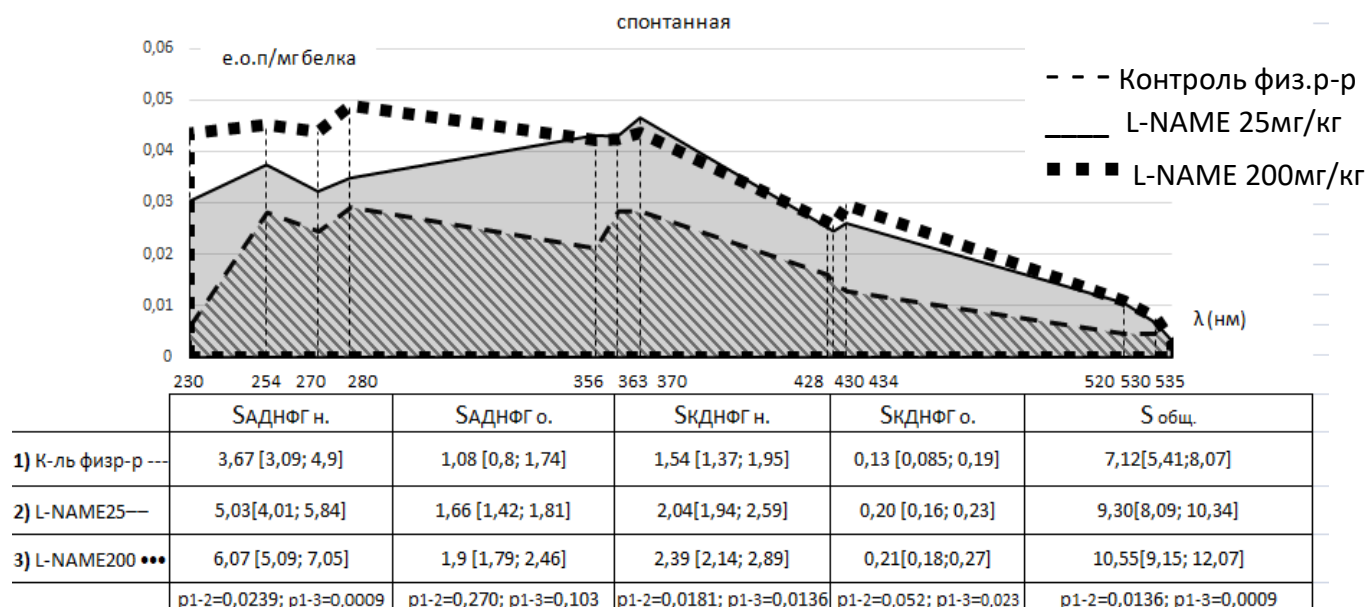


Рисунок 13 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов А) в головке

В) хвосте эпидидимиса при введении L-NAME, Me [Q₁; Q₃]

В каудальной части эпидидимиса также наблюдается усиление ОМБ (Рисунок 13В). Так, в серии L-NAME 25 мг/ кг, суммарная площадь под кривой абсорбции света в головке придатка яичка составляла 185% ($p=0,00094$), в хвостовой части - 130% ($p=0,0136$) от уровня контрольной группы. С увеличением дозы L-NAME до 200 мг/кг возрастала и степень повреждения белков – 323% ($p=0,00094$) и 148% ($p=0,00094$) соответственно.

Соотношение первичных и вторичных маркеров окислительной деструкции белков хвостовой части эпидидимиса при дозе L-NAME 25 мг/кг статистически значимо не отличалось от контрольной группы. При назначении большей дозы ингибитора происходило повреждение аминокислот в основном нейтрального характера.

Все выявленные изменения в эпидидимисе сопровождались истощением РАП ОМБ и уменьшением активности митохондриальной СОД в обеих экспериментальных NO-дефицитных сериях, а в головке придатка яичка при дозе L-NAME 25 мг/кг, даже в 9 раз ($p=0,00094$) (Таблица 2). В тканях эпидидимиса окислительный стресс, вызванный L-NAME являлся не только следствием повышенной продукции АФК, но и нарушением механизмов антиоксидантной защиты. Также в митохондриях эпидидимиса обнаружена статистически значимая умеренная обратная корреляционная связь между содержанием NO_x и общим содержанием продуктов окислительной модификации белков (Рисунок 14), что предполагает проявление антиоксидантных свойств оксидом азота (II) в отношении белков придатка яичка.

Таким образом, применение ингибитора синтеза оксида азота приводило к существенным изменениям, проявляющимися в повышении интенсивности окислительной модификации белков во всех исследуемых тканях. Данный факт говорит о важной роли оксида азота в процессах редокс регуляции клеток.

У животных, получавших L-NAME в дозе 25 мг/кг, наблюдалось снижение активности митохондриальной ЛДГ в сердце на 42,1% ($p=0,0140$) и печени на 30,1%

($p=0,0140$) (Таблица 3). При дозе L-NAME 200 мг/кг активность ЛДГ более выражено снижалась в головке и хвосте придатка яичка.

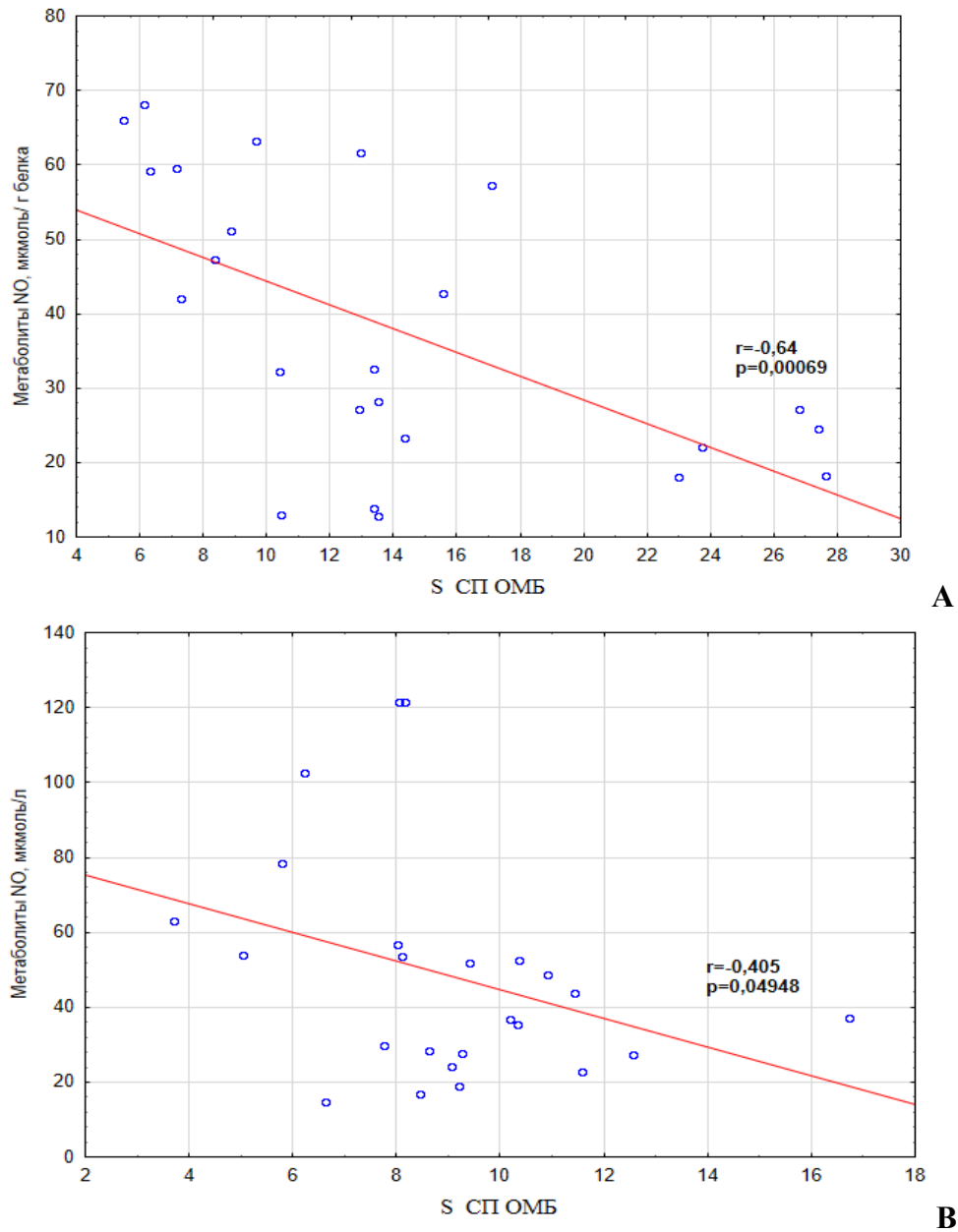


Рисунок 14 – Зависимость общего содержания продуктов спонтанной окислительной модификации белков и уровня NO_x в митохондриях А – головки эпидидимиса, В – хвоста придатка яичка

Концентрация лактата в митохондриальной фракции статистически значимо повышалась только в хвосте эпидидимиса при обеих назначаемых дозах L-NAME и головке придатка яичка - при дозе 200 мг/кг. При этом большей

концентрации митохондриального лактата соответствовало более выраженное снижение активности ЛДГ.

Таблица 3 – Влияние L-NAME на биохимические показатели активности ЛДГ и содержания лактата в митохондриях исследуемых органов, Me[Q1;Q3]

Показатели	Серии		
	Контроль Физраствор (1)	L-NAME 25 мг/кг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)
Митохондрии сердца			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	277,65 [269,56; 347,73]	160,83 [102,6; 201,49]* p ₁₋₂ = 0,01403	201,09 [167,67;238,31] p ₁₋₃ = 0,1979; p ₂₋₃ = 0,9665
Лактат, мкмоль/г белка	4,50 [3,17; 6,11]	2,70 [1,78; 3,31] p ₁₋₂ = 0,0413	3,06 [2,54; 4,54] p ₁₋₃ = 0,1979; p ₂₋₃ = 0,6090
Митохондрии печени			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	553,98 [483,16; 1007,14]	387,22 [360,16; 404,57]* p ₁₋₂ = 0,01403	609,24 [532,32; 711,72]▲ p ₁₋₃ = 0,9548; p ₂₋₃ = 0,0079
Лактат, мкмоль/г белка	8,79 [6,59; 9,34]	5,74 [3,05; 7,66] p ₁₋₂ = 0,1979	6,72 [4,75; 10,07] p ₁₋₃ = 0,9156; p ₂₋₃ = 1,0000
Митохондрии головки эпидидимиса			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	114,04 [78,86;130,55]	62,10 [34,61; 103,73] p ₁₋₂ =0,1278	15,58 [12,39; 23,91]** ▲ p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,0038
Уровень лактата, мкмоль/г белка	17,16 [14,23; 18,28]	22,69 [17,01; 33,88] p ₁₋₂ =0,1278	31,29 [19,30; 36,48]** p ₁₋₃ = 0,0101; p ₂₋₃ =0,4308
Митохондрии хвоста эпидидимиса			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	27,63 [25,89; 44,28]	6,47 [1,70;24,03] p ₁₋₂ =0,0239	4,61 [3,55; 6,24]** p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,8748
Уровень лактата, мкмоль/г белка	16,39 [12,15; 17,68]	28,53 [26,26; 29,73]* p ₁₋₂ =0,00094	35,06 [30,14; 37,25]** p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,0405

Примечание: * - с учетом поправки Бонферрони изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы относительно контрольной группы при $p < 0,017$; ** - изменения в серии L-NAME 200 мг/кг статистически значимы относительно контроля ($p < 0,017$); ▲ - изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы относительно серии L-NAME 200 мг/кг ($p < 0,017$)

В цитоплазме клеток сердца и печени активность ЛДГ статистически значимо не снижалась (Рисунок 15), а уровень молочной кислоты повышался: в сердце при дозе L-NAME 200мг/кг, в печени в обеих изучаемых дозах.

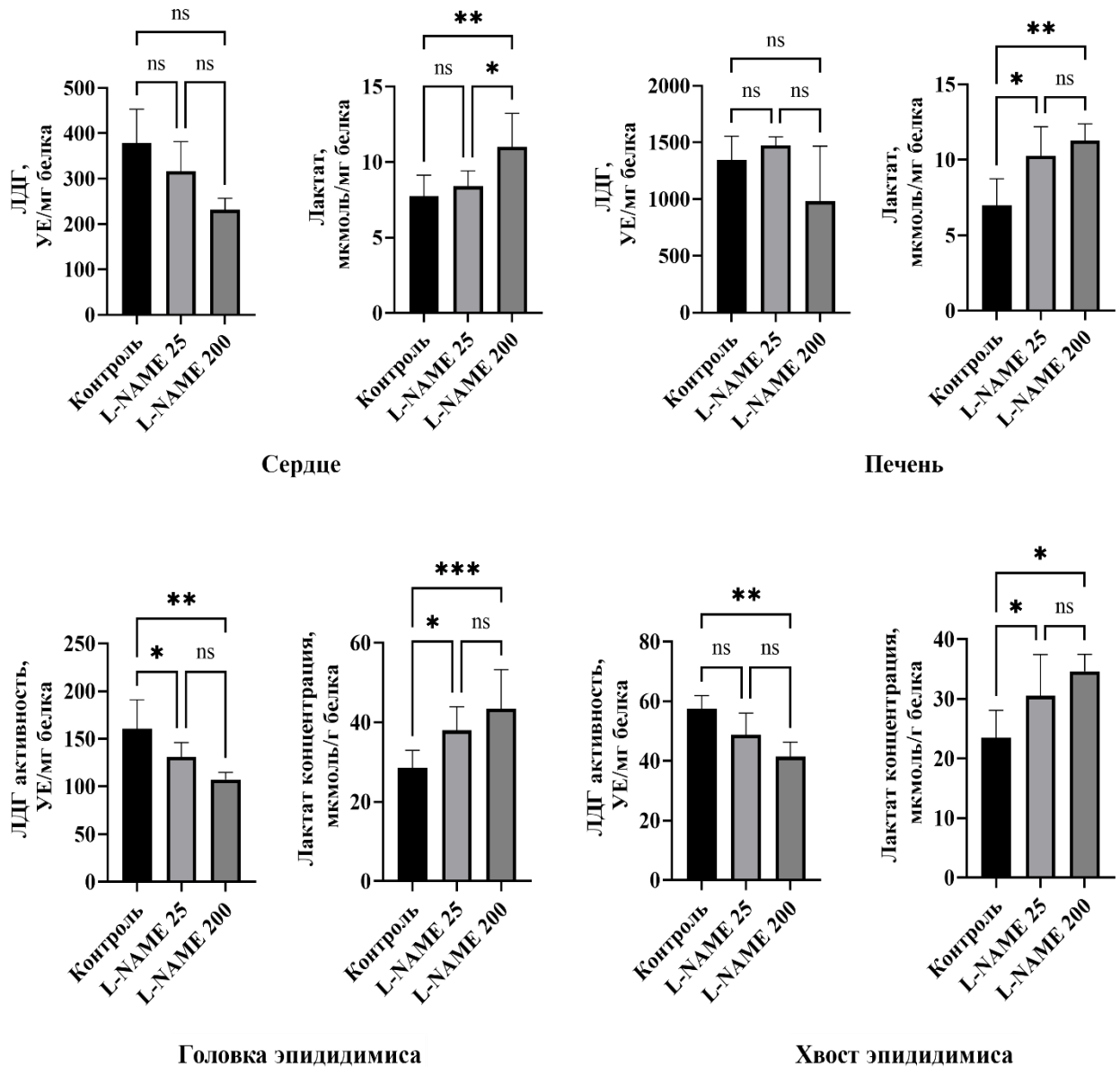


Рисунок 15 – Изменения биохимических показателей активности ЛДГ и содержания лактата в цитоплазме клеток исследуемых органов при введении L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** отмечены различия групп при $p < 0,01$, *** отмечены различия групп при $p < 0,001$ символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

В головке эпидидимиса активность ЛДГ уменьшалась в обеих дозах, в хвосте - только при дозе L-NAME 200 мг/кг и такой же схожей тенденции отмечалось повышение содержания молочной кислоты.

Назначение L-NAME в дозе 25 мг/кг приводило к уменьшению активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки СДГ и Н⁺-АТФазы в митохондриях эпидидимиса (Таблица 4). В сердце и печени подобных сдвигов не выявлено.

При увеличении дозы L-NAME до 200 мг/кг наблюдалось угнетение активности СДГ, Н⁺-АТФазы в тканях сердца, головки и хвоста эпидидимиса.

Таблица 4 – Влияние L-NAME на биохимические показатели активности СДГ и Н-АТФазы в митохондриях исследуемых органов, Me[Q1;Q3]

Показатели	Серии		
	Контроль Физраствор (1)	L-NAME 25 мг/кг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)
<i>Митохондрии сердца</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	285,11 [203,71;391,74]	182,22 [133,54; 222,26] p ₁₋₂ =0,2313	91,46 [83,47; 109,36]** p ₁₋₃ =0,0003; p ₂₋₃ =0,1195
Активность Н-АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	14,42 [11,97; 18,61]	8,39 [7,65; 9,16] p ₁₋₂ =0,1016	7,59 [7,16; 7,99]** p ₁₋₃ = 0,0125; p ₂₋₃ =1,000
<i>Митохондрии печени</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	48,39 [39,51; 65,06]	53,62 [38,57; 77,74] p ₁₋₂ =1,0000	49,95 [26,54; 53,68] p ₁₋₃ = 1,000; p ₂₋₃ =1,000
Активность Н-АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	1,85 [1,09; 3,14]	1,90 [1,45; 2,81] p ₁₋₂ =1,0000	1,85 [1,09; 3,14] p ₁₋₃ = 1,000; p ₂₋₃ =1,000
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	35,03 [22,07; 42,70]	18,89 [15,59; 21,25]* p ₁₋₂ =0,0074	17,74 [16,31; 25,38]** p ₁₋₃ = 0,013; p ₂₋₃ =0,8748
Активность Н ⁺ -АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	22,82 [21,51; 30,39]	8,20 [6,63; 8,96]* p ₁₋₂ =0,00094	9,13 [6,16;10,78]** p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,8748

<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	27,10 [25,20;34,05]	11,17 [7,53; 13,36]* $p_{1-2}=0,00094$	9,16 [7,96; 11,90]** $p_{1-3}=0,00094$ $p_{2-3}=0,6365$
Активность H^+ -АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	17,57 [12,02;20,10]	1,13 [0,40; 1,49]* $p_{1-2}=0,00094$	3,66 [3,38; 4,28]** ▲ $p_{1-3}=0,00094$ $p_{2-3}=0,00094$

Примечание: * - с учетом поправки Бонферрони изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы относительно контрольной группы при $p < 0,017$; ** - изменения в серии L-NAME 200 мг/кг статистически значимы относительно контроля ($p < 0,017$); ▲ - изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы относительно серии L-NAME 200 мг/кг ($p < 0,017$)

Таким образом, дефицит NO, опосредованный введением L-NAME, сопровождается снижением активности ферментов, участвующих в тканевом дыхании и окислительном фосфорилировании – СДГ и H^+ -АТФазы, что наиболее выражено при использовании высокой дозы ингибитора - 200 мг/кг. При назначении L-NAME уменьшается активность митохондриальной ЛДГ, при дозе 25 мг/кг - в сердце и печени, при дозе 200 мг/кг - в головке и хвосте эпидидимиса. Концентрация лактата нарастает в цитоплазме клеток всех исследуемых органов и митохондриях эпидидимиса при назначении L-NAME в дозе 200 мг/кг.

3.1.3. Воздействие L-аргинина как субстрата NO-синтазы на биохимические показатели в сыворотке крови, митохондриях и цитоплазме клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс на фоне экспериментального дефицита оксида азота

Изменение параметров функционирования митохондрий на фоне увеличения уровня субстрата для синтеза оксида азота у здоровых животных

Введение L-аргинина здоровым самцам крыс подтвердило предполагаемое нарастание концентрации метаболитов оксида азота в сыворотке крови (Рисунок 16), митохондриях и цитоплазме клеток миокарда, эпидидимиса и не

сопровождалось изменениями изучаемого показателя в митохондриях печени (Таблица 5).

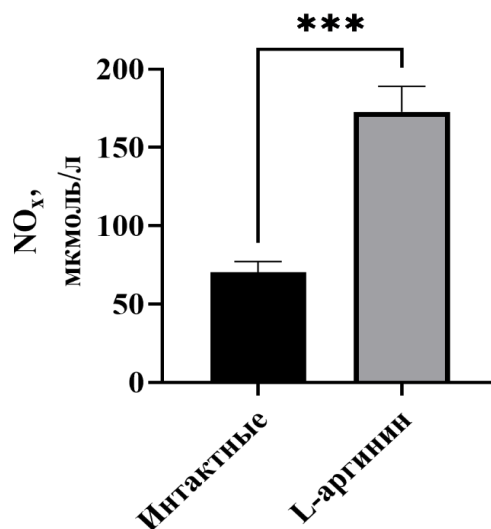


Рисунок 16 – Содержание NO_x в сыворотке крови крыс при введении L-аргинина

Примечание: символом *** отмечены различия групп при $p < 0,001$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Таблица 5 – Влияние L-аргинина на содержание NO_x в митохондриях и цитоплазме клеток исследуемых органов, Me [Q1;Q3]

Контроль				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
NO _x мкмоль/мг белка (цитоплазма)	34,79 [31,09; 40,46]	28,14 [23,64; 29,42]	47,20 [41,03; 50,23]	60,12 [56,58; 65,07]
NO _x мкмоль/мг белка (митохондрии)	77,48 [75,06; 79,32]	43,31 [36,6; 44,42]	55,49 [50,42; 58,16]	61,21 [58,48; 74,29]
Аргинин 500 мг/кг в течение 10 дней				
NO _x мкмоль/мг белка (цитоплазма)	62,26 [58,37; 65,26]* p=0,0013	46,25 [42,98; 49,86]* p=0,0009	55,20 [51,91; 61,33]* p=0,0101	75,32 [63,75; 77,72]* p=0,0181
NO _x мкмоль/мг белка (митохондрии)	130,34 [112,55; 178,66]* p=0,0009	41,56 [38,25; 57,3] p=0,4948	69,78 [65,0; 75,81]* p=0,0053	78,73 [69,33; 85,08]* p=0,03132

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы при $p < 0,05$

Несмотря на значительное увеличение концентрации метаболитов NO в сыворотке крови под воздействием L-аргинина в 2,5 раза ($p=0,0009$), столь же выраженного подъема содержания метаболитов NO в цитоплазматической и митохондриальной фракциях исследуемых органов не наблюдалось, а в митохондриях печени оно и вовсе статистически значимо не отличалось от контрольных значений, хотя известно, что уровень экспрессии NO-синтаз в этом органе достаточно высокий [291]. Одной из причин этого эффекта может быть тот факт, что активные центры NO - синтаз, по-видимому, насыщены эндогенным аргинином. Так как, константа Михаэлиса–Ментена (Km) NO-синтазы находится в микромолярном диапазоне, а именно 2,9 мкмоль/л, как показали Бредт и его коллеги [78]. Уровни аргинина в плазме крови, измеренные у здоровых людей, в 15-30 раз превышают этот показатель, что делает концентрацию субстрата неограничивающим фактором в ферментативной реакции, приводящей к образованию NO.

Помимо этого, транспорт аргинина в организме осуществляется в основном с помощью катионных переносчиков аминокислот (CAT) 1-3. CAT1 демонстрирует повсеместную экспрессию, за исключением печени. В этом органе присутствует другая изоформа этого переносчика CAT2A, имеющая низкое сродство к аргинину [96, 117]. Это, возможно, и объясняет статистически незначимое изменение метаболитов NO_x в митохондриях печени в ответ на экзогенное введение L-аргинина.

На фоне введения L-аргинина уровень окислительно модифицированных белков остается сопоставимым с таковым у интактных животных, при этом сопровождается статистически значимым снижением доли спонтанно окисленных белков митохондрий в сердце и печени (Таблица 6).

В процессе исследования было выявлено снижение активности СОД в митохондриях печени и обоих отделов эпидидимиса относительно контрольной группы (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние L-аргинина на биохимические показатели - маркеры окислительного стресса митохондрий исследуемых органов крыс, Me [Q1;Q3]

<i>Контроль</i>				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Активность СОД, УЕ/мг белка	1,22 [0,87; 1,45]	6,4 [5,14; 7,11]	32,94 [31,82; 35,64]	31,25 [30,14; 37,88]
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	4,13 [2,97; 5,86]	3,52 [3,2; 4,42]	6,68 [6,23; 7,78]	7,21 [5,51;8,35]
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	39,18 [32,18;58,09]	48,56 [45,39; 54,58]	51,89 [42,12; 58,91]	40,49 [34,76; 44,83]
<i>Аргинин 500 мг/кг в течение 10 дней</i>				
Активность СОД, УЕ/мг белка	1,34 [1,11; 2,18] p = 0,4308	4,05 [2,89; 4,48]* p = 0,0009	26,36 [21,7; 32,08]* p = 0,0313	26,01 [22,41;29,63]* p = 0,0239
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	1,86 [1,53; 3,82] p = 0,0660	1,91 [1,42; 4,01] p = 0,1035	5,83 [5,26; 6,73] p = 0,1278	4,42 [3,83;6,83] p = 0,1035
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	23,79 [14,96;26,87]* p = 0,01358	28,17 [24,38; 41,47]* p = 0,0074	37,7 [34,45; 55,62] p = 0,1035	26,19 [24,39; 37,42] p = 0,0831

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$)

В процессе исследования было выявлено снижение активности СОД в митохондриях печени и обоих отделов эпидидимиса относительно контрольной группы (Таблица 6).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о проявлении L-аргинином антиоксидантных свойств, что согласуется с результатами других авторов [58, 331]. Исследователями подчеркивается, что доступность L-аргинина является критическим фактором для подавления окислительного стресса и индуцирования эндогенного антиоксидантного ответа [183].

Под воздействием L-аргинина активность митохондриальных ферментов и концентрация субстратов, участвующих в биоэнергетических процессах

практически не изменялась, наблюдалось только статистически значимое снижение активности СДГ на 27,8% ($p=0,01008$) и ЛДГ на 21,1% ($p=0,0009$) в митохондриях миокарда и уменьшение содержания лактата на 31% ($p=0,01008$) в митохондриях печени.

Влияние L-аргинина на функциональную активность митохондрий в условиях экспериментального дефицита NO, вызванного применением ингибитора NOS – L-NAME в дозах 25 и 200 мг/кг

Введение L-аргинина самцам крыс на фоне экспериментального дефицита генерации NO, вызванного L-NAME приводило к статистически значимому увеличению уровня метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови только при дозе L-NAME 200 мг/кг (Рисунок 17).

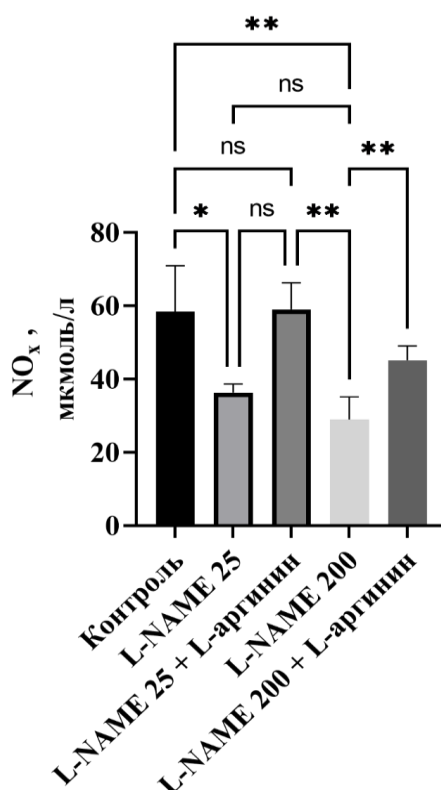


Рисунок 17 – Влияние L-аргинина на содержание NO_x в сыворотке крови крыс при введении L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

В аналогичных условиях эксперимента отмечалось повышение содержания NO_x в митохондриях и цитоплазме клеток сердечной мышцы и головки эпидидимиса в обеих выбранных дозах (Рисунок 18, 19). Нарастание уровня NO_x в митохондриях печени было выявлено только на фоне совместного назначения L-аргинина и ингибитора синтеза NO в дозе 200 мг/кг. В хвосте придатка яичка статистически значимых изменений содержания метаболитов оксида азота не обнаружено.

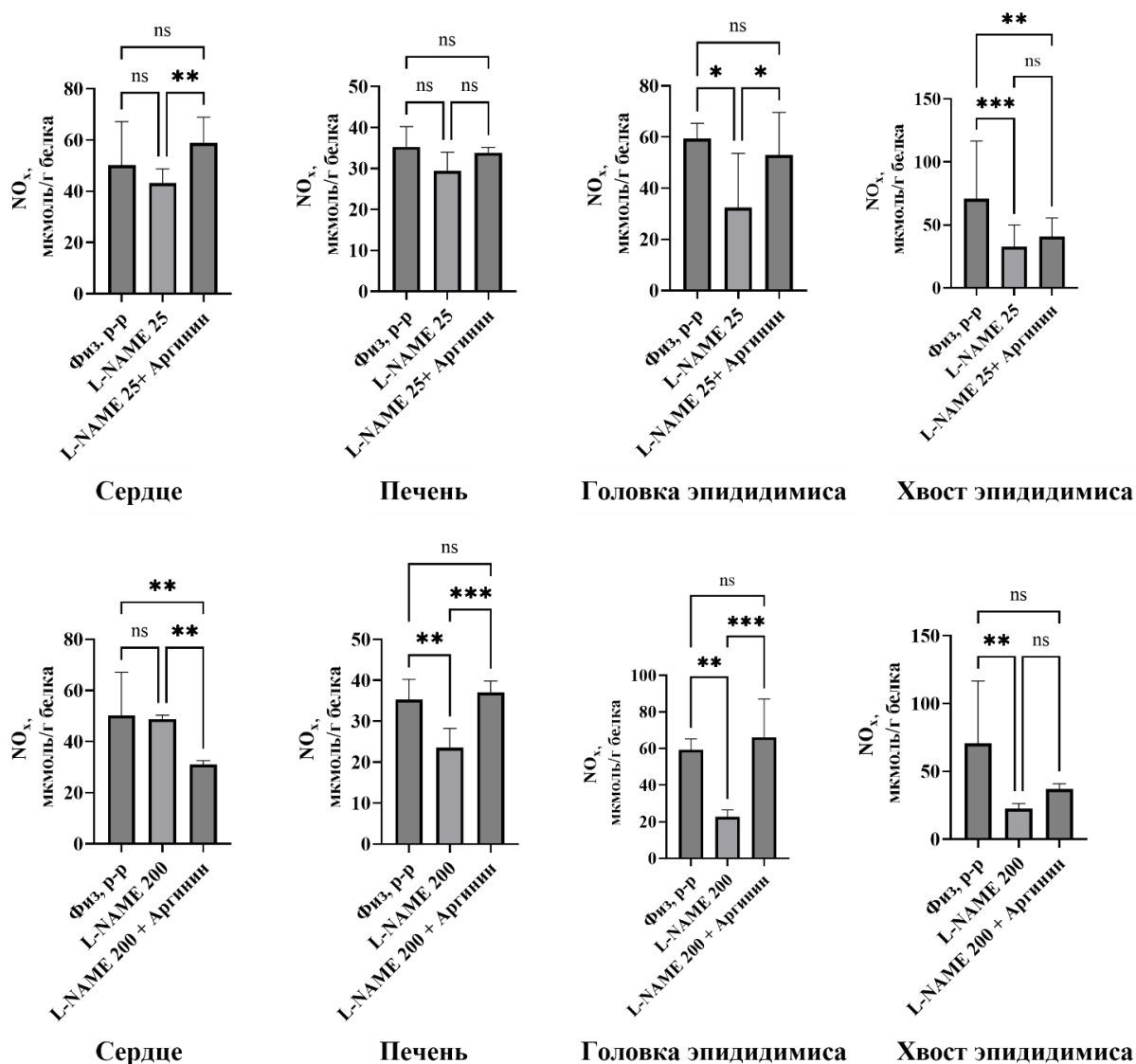


Рисунок 18 – Влияние L-аргинина на содержание NO_x в митохондриях исследуемых органов крыс на фоне введения L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

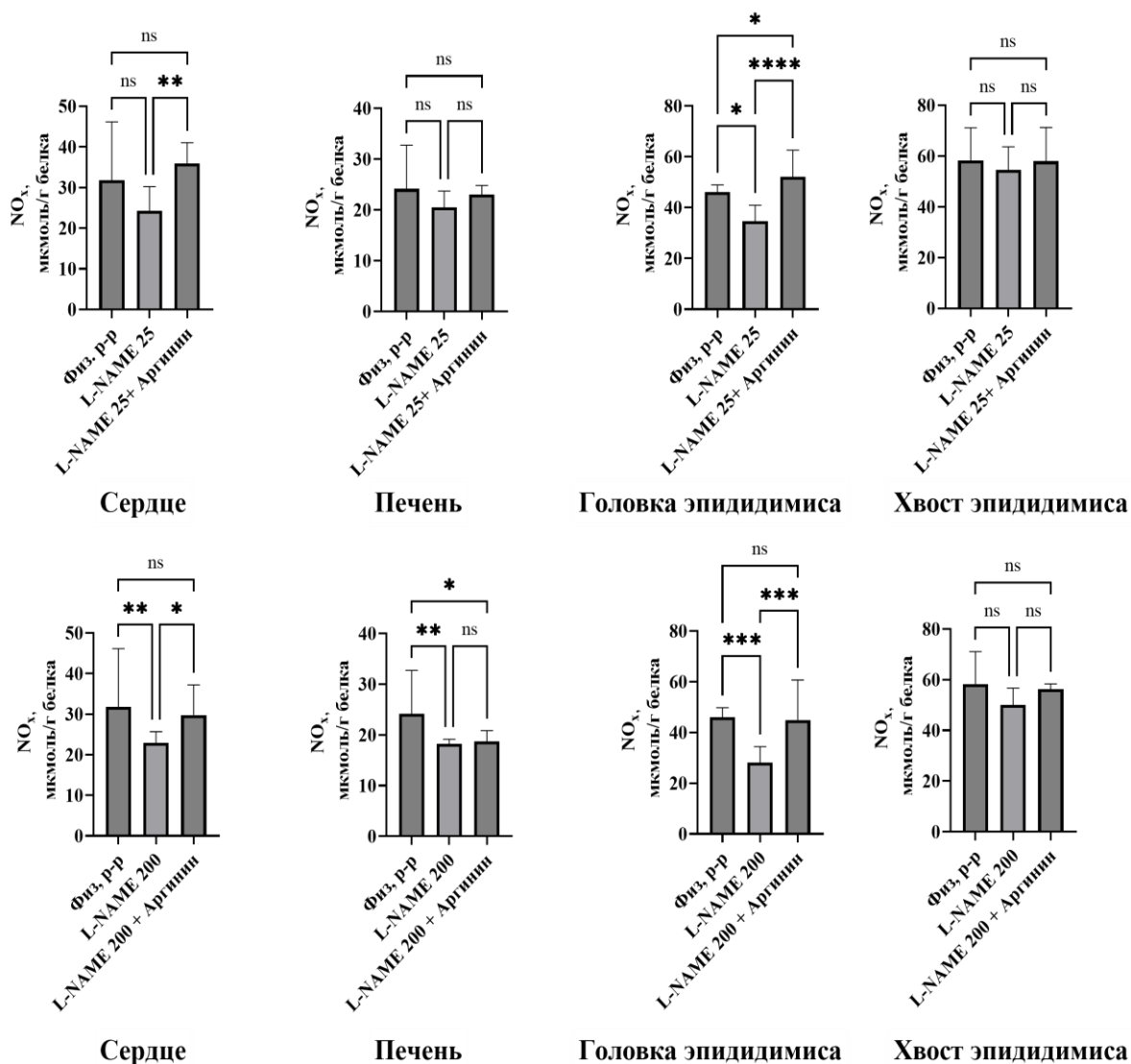


Рисунок 19 – Влияние L-аргинина на содержание NO_x в цитоплазме клеток исследуемых органов крыс на фоне введения L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Ранее в работе было показано, что применение L-NAME в обеих дозах приводило к увеличению общего количества ОМБ, при этом наблюдалось усиление окисления нейтральных аминокислот. Введение же L-аргинина совместно с L-NAME способствовало практически полной коррекции показателей содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в кардиомиоцитах, гепатоцитах в обеих выбранных дозах ингибитора, головке

придатка яичка при совместном назначении аргинина и L-NAME в дозе 200 мг/кг и хвосте эпидидимиса в условиях назначения L-NAME 25 мг/кг (Рисунок 20-25).

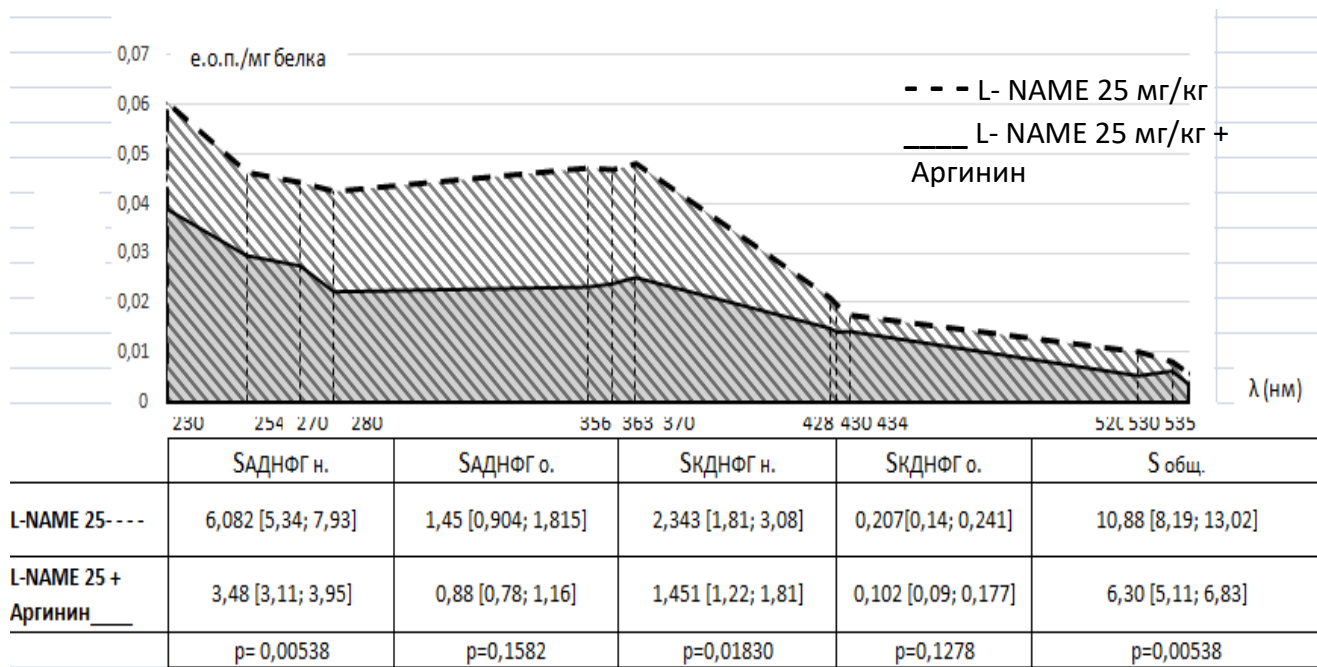


Рисунок 20 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов ОМБ и их компонентов в митохондриях сердца при введении L-NAME в дозе 25 мг/ кг изолированно и в сочетании с L-аргинином, Me [Q₁;Q₃]

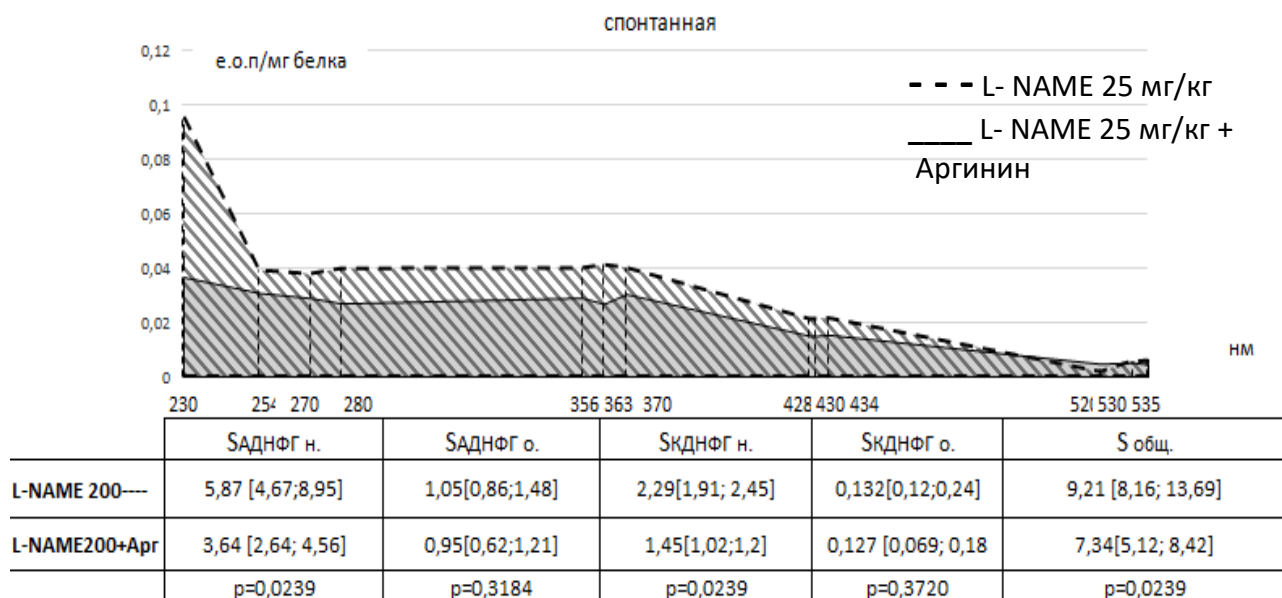


Рисунок 21 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов ОМБ и их компонентов в митохондриях сердца при введении L-NAME в дозе 200 мг/ кг изолированно и в сочетании с L-аргинином, Me[Q₁;Q₃]

Также в митохондриях кардиомиоцитов при сочетанном назначении L-аргинина с L-NAME в дозе 25 мг/кг происходило снижение количества карбонильных производных нейтрального характера как за счёт АДНФГ – на 42,8% ($p=0,0054$), так и за счёт КДНФГ – на 38% ($p=0,0183$) (Рисунок 20), происходило улучшение показателя РАП ОМБ; при дозе L-NAME 200 мг/кг обнаружена схожая закономерность и снижение показателей на 38% ($p=0,0239$) и 36,7% ($p=0,0239$) соответственно (Рисунок 21). Активность СОД при этом статистически значимо не изменялась.

Аналогичная тенденция влияния L-аргинина прослеживалась и в митохондриях печени при совместном назначении с L-NAME в дозе 25 мг/кг, при статистически значимом уменьшении общего количества ОМБ, отмечалось снижение производных АДНФГ и КДНФГ нейтральных аминокислот на 53,9% ($p=0,0039$) и 33,1% ($p=0,0181$) соответственно (Рисунок 22). Активность СОД при этом снижалась на 77% ($p=0,0009$), а значение РАП ОМБ статистически значимо не менялось.

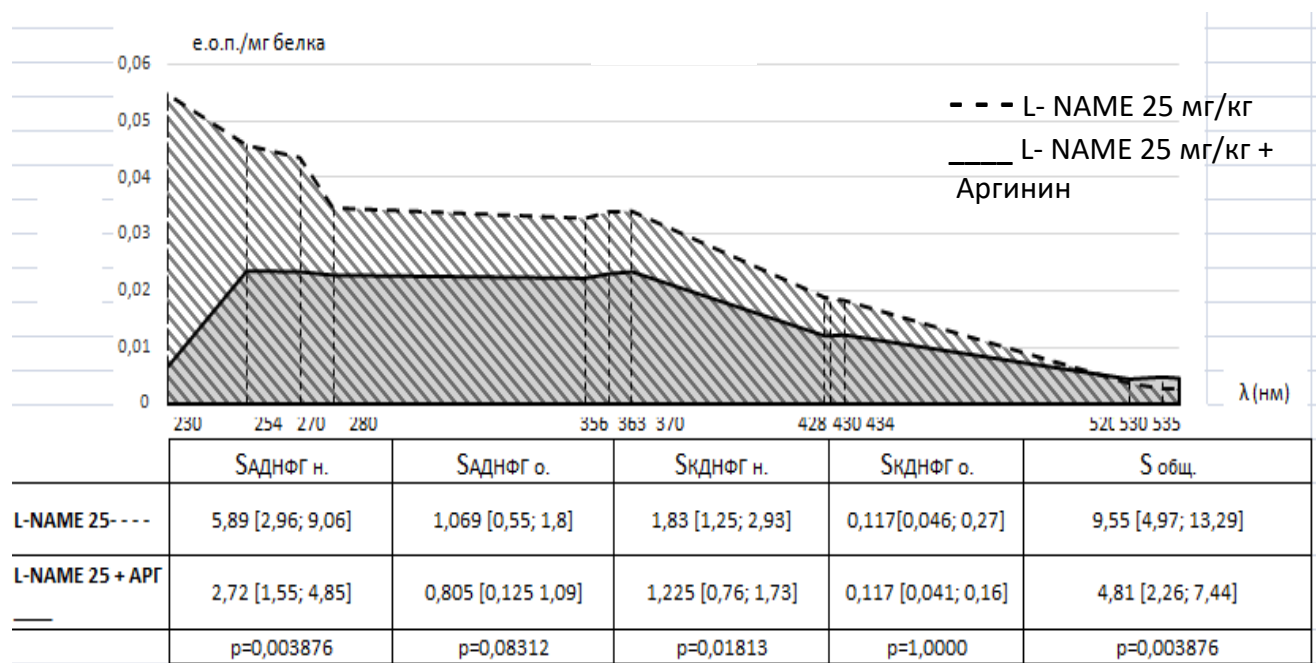


Рисунок 22 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов ОМБ и их компонентов в митохондриях печени при введении L-NAME в дозе 25 мг/ кг изолированно и в сочетании с L-аргинином, Me[Q₁;Q₃]

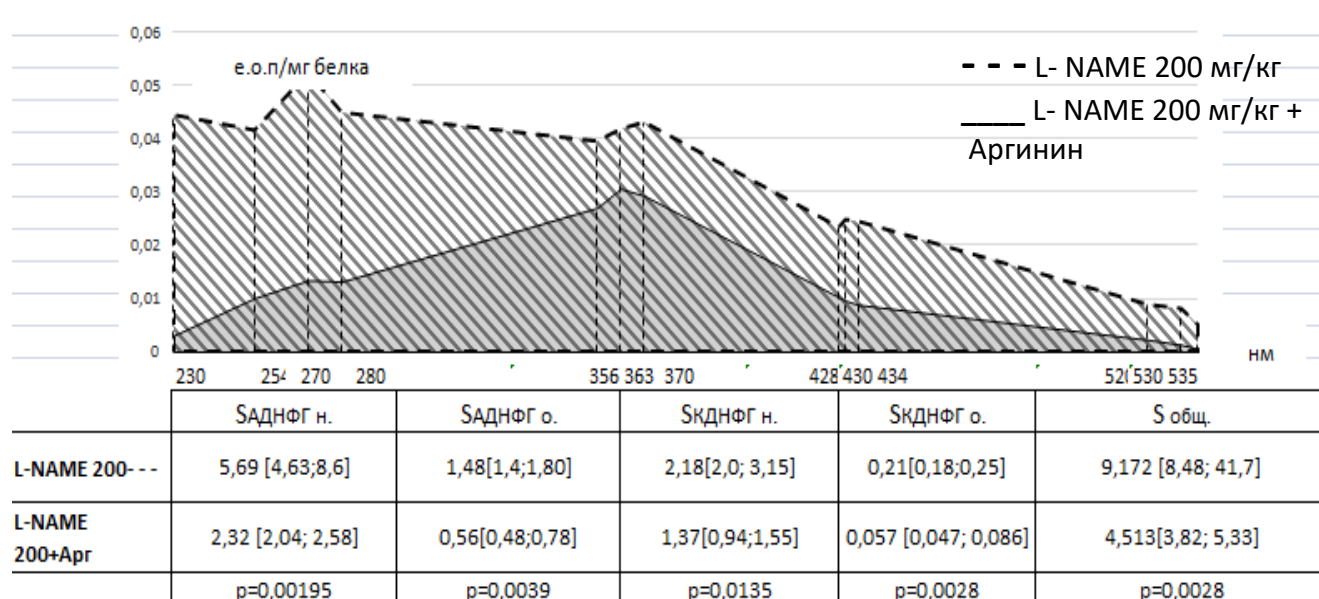


Рисунок 23 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов ОМБ и их компонентов в митохондриях печени при введении L-NAME в дозе 200 мг/ кг изолированно и в сочетании с L-аргинином, Me[Q₁;Q₃]

При увеличении дозы ингибитора до 200 мг/кг в митохондриях гепатоцитов обнаружено снижение общей площади под кривой абсорбции света, статистически значимое уменьшение количества карбонильных производных и нейтрального и основного характера как за счёт АДНФГ, так и за счёт КДНФГ (Рисунок 23), назначение аргинина также предотвращало истощение РАП и улучшало значение показателя на 28% (p=0,0054).

При анализе расчета площадей под кривой абсорбции света в митохондриях головки и хвоста эпидидимиса уменьшение общего количества карбонильных производных при совместном назначении L-аргинина и L-NAME наблюдалось в головке эпидидимиса при дозе ингибитора NOS 200 мг/кг, а в хвосте придатка яичка при дозе 25 мг/кг (Рисунок 24, 25).

При этом отмечалось снижение АДНФГ нейтрального характера в хвосте при дозе L-NAME 25 мг/кг и в головке эпидидимиса при обеих назначаемых дозах. Также в хвостовом отделе придатка яичка зафиксировано уменьшение и КДНФГ нейтрального и основного характера в условиях назначения L-NAME в дозе 25 мг/кг. При повышении дозы ингибитора синтеза NO в этой части

эпидидимиса статистически значимых отличий от серии введения только L-NAME не выявлено.

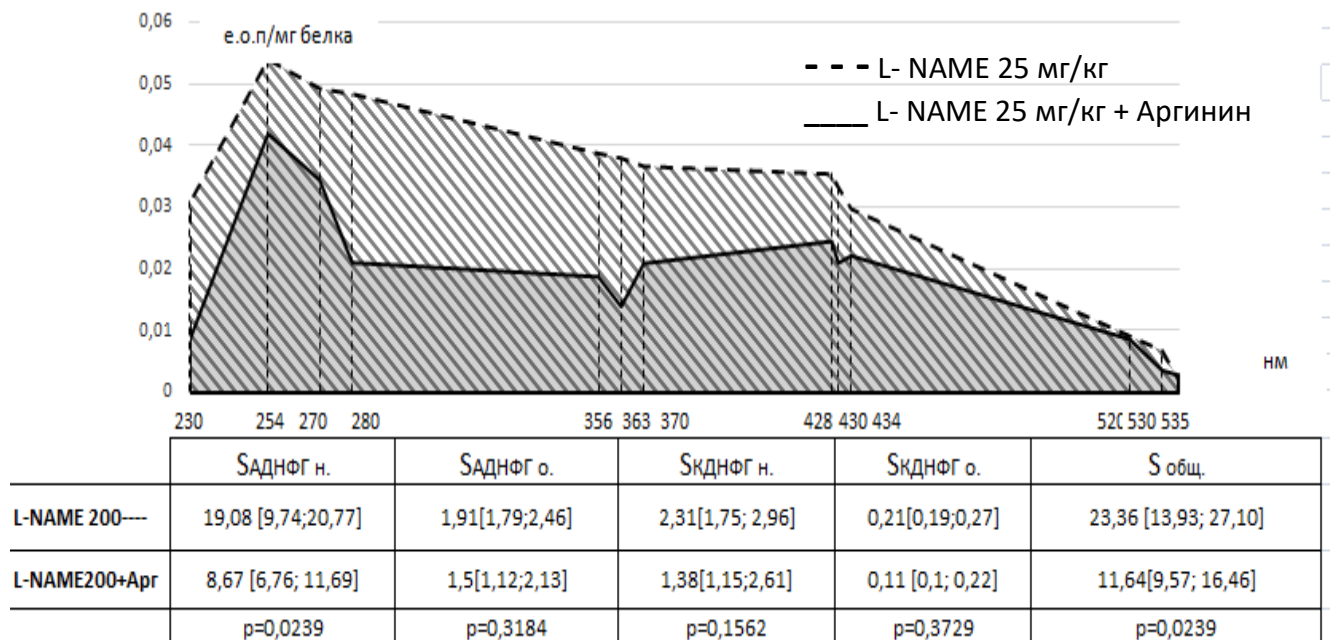
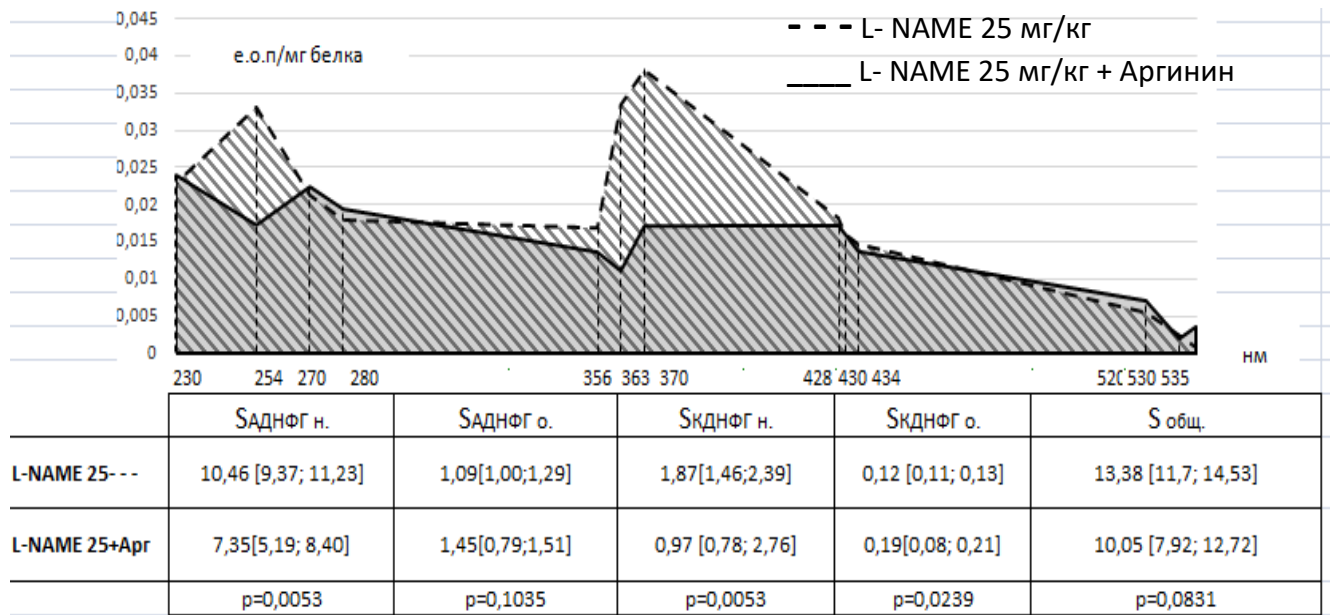


Рисунок 24 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов ОМБ и их компонентов в митохондриях головки эпидидимиса при введении L-NAME в дозе 25 мг/кг (верхний рисунок) и 200 мг/ кг (рисунок снизу) изолированно и в сочетании с L-аргинином, Me[Q₁;Q₃]

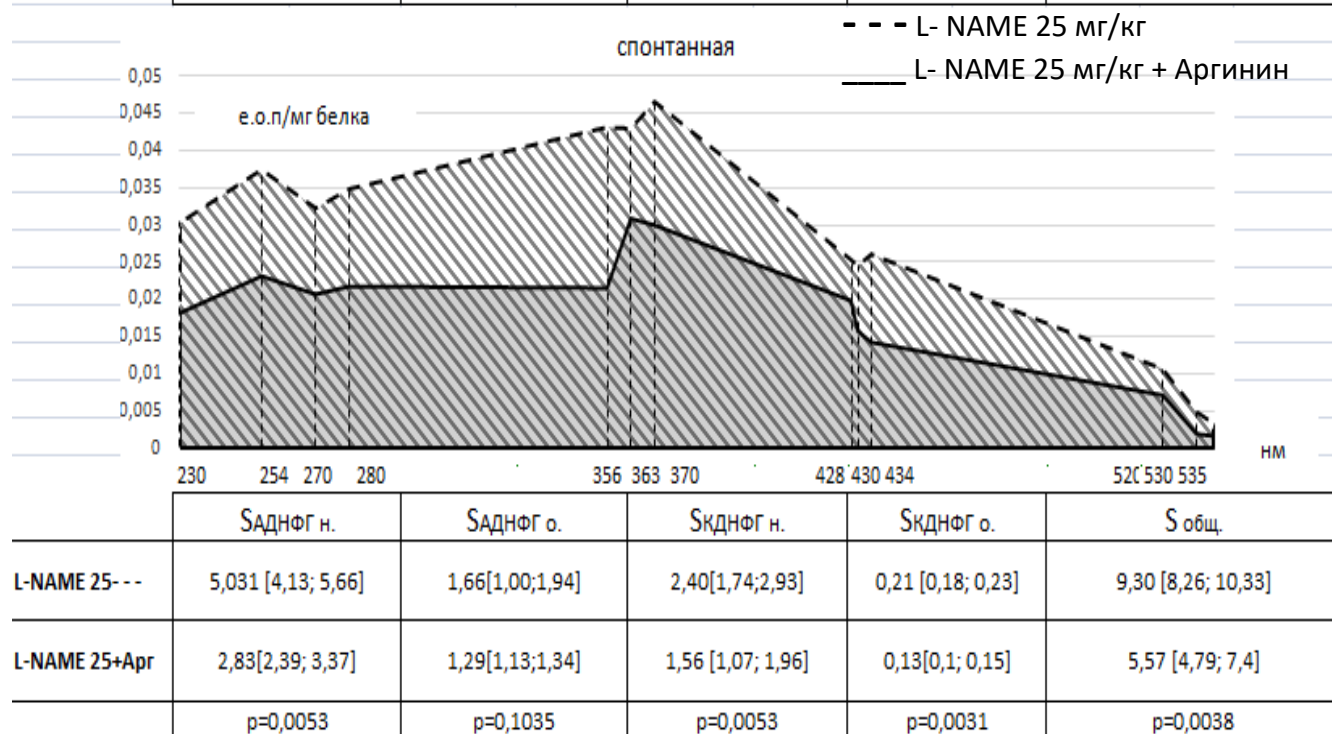
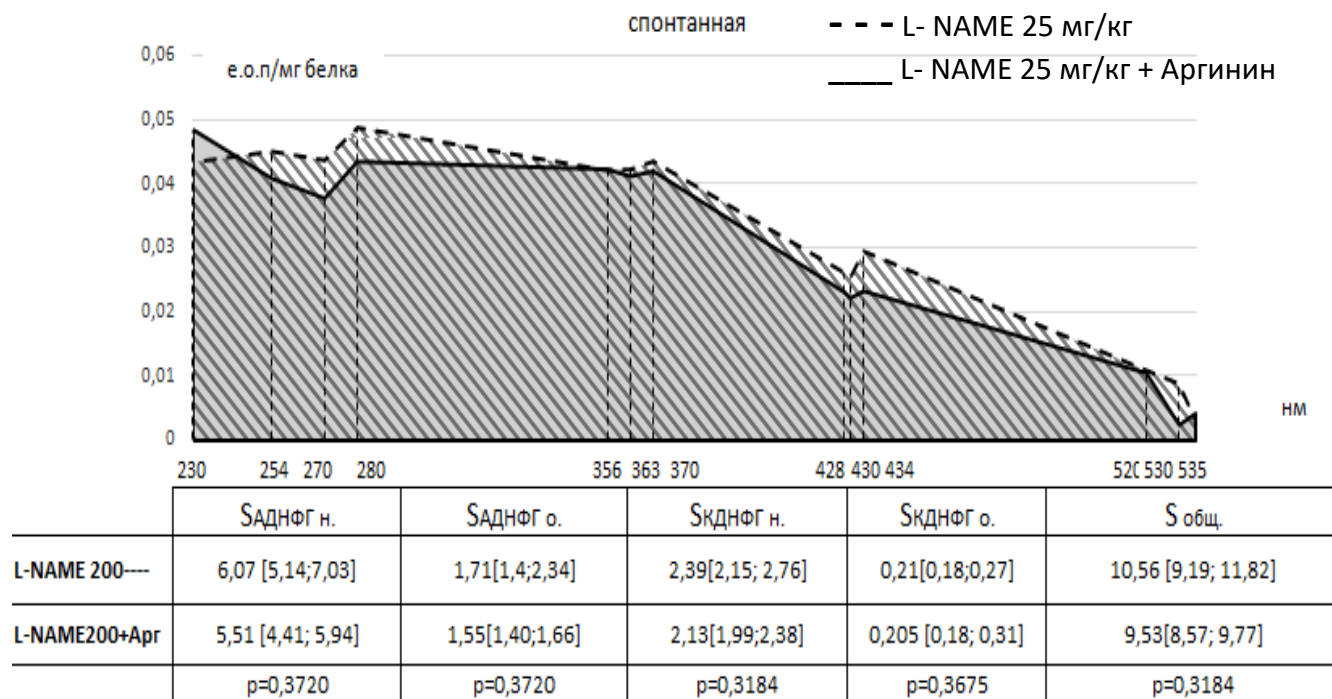


Рисунок 25 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов ОМБ и их компонентов в митохондриях хвоста эпидидимиса при введении L-NAME в дозе 25 мг/кг (нижний рисунок) и 200 мг/ кг (рисунок вверху) изолированно и в сочетании с L-аргинином, Me[Q₁;Q₃]

Активность СОД в головке придатка яичка при дозе L-NAME 25 мг/кг возрастала в 6,4 раза ($p=0,0009$), при дозе 200 мг/кг - в 4,7 раза ($p=0,0009$) с одновременным улучшением РАП ОМБ, соответственно, на 35,3% ($p=0,0054$) и 50,2% ($p=0,0009$). В хвосте эпидидимиса активность СОД также увеличивалась в 3,1 раза ($p=0,0009$) при дозе L-NAME 25 мг/кг и 3,5 раза ($p=0,0009$) при дозе 200 мг/кг. При этом РАП ОМБ статистически значимо не изменялся.

Назначение аргинина на фоне экспериментального снижения синтеза NO способствовало повышению активности H^+ -АТФазы во всех исследуемых органах, за исключением головки эпидидимиса. Активность СДГ увеличивалась в митохондриях сердца, печени и головки эпидидимиса при одновременном назначении с ингибитором NOS в дозе 200 мг/кг, в каудальной части эпидидимиса при той же дозе достоверно снижалась. Сочетание аргинина и L-NAME в дозе 25 мг/кг не приводило к статистически значимому изменению активности фермента, а в митохондриях печени сопровождалось его снижением (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние L-аргинина на биохимические показатели, ассоциированные с функцией митохондрий исследуемых органов, на фоне введения L-NAME, Me[Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг +Арг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг +Арг (4)
<i>Митохондрии сердца</i>				
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	182,22 [133,54; 122,26]	146,75 [123,22; 166,06] $p_{1-2}=0,3184$	91,46 [83,47; 109,36]	235,09 [204,88; 267,0]** $p_{3-4}=0,000939$
Активность Н-АТФазы, мкмольфосфат/ мг белка в час	8,39 [7,65; 9,16]	11,07 [9,53; 15,27]* $p_{1-2}=0,0239$	7,59 [7,16; 7,99]	12,46 [10,75; 13,71]** $p_{3-4}=0,0038$
Активность ЛДГ, Ед/г белка	160,83 [102,6; 201,49]	163,29 [150,16; 210,16] $p_{1-2}=0,6369$	201,09 [167,67; 238,31]	105,65 [96,63; 131,50]** $p_{3-4}=0,00194$
Лактат, мкмоль/г белка	2,70 [1,78; 3,31]	4,00 [2,70; 5,12] $p_{1-2}=0,0660$	3,06 [2,54; 4,54]	2,59 [2,08; 4,01] $p_{3-4}=0,3720$

<i>Митохондрии печени</i>				
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	53,62 [38,57; 77,74]	22,84 [16,15; 28,14]* p ₁₋₂ =0,00094	49,95 [26,54; 53,83]	121,71 [106,11;134,39]** p ₃₋₄ = 0,00136
Активность Н- АТФазы, мкмольфосфата/мг белка в час	1,9 [1,45; 2,81]	7,44 [5,28; 8,26]* p ₁₋₂ = 0,00094	1,85 [1,09; 3,14]	8,01 [7,83; 9,89]** p ₃₋₄ = 0,00094
Активность ЛДГ, Ед/г белка	387,22 [360,16; 404,57]	460,68 [415,31;522,18]* p ₁₋₂ = 0,03132	609,24 [532,32;711,72]	680,17 [630,32; 766,38] p ₃₋₄ = 0,2271
Лактат, мкмоль/г белка	5,74 [3,05; 7,66]	4,36 [3,30; 4,95] p ₁₋₂ = 0,3184	6,72 [4,75; 10,07]	2,97 [2,59; 3,98]** p ₃₋₄ = 0,00539
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>				
Активность СДГ, нмоль сукцината/ мг белка в мин	18,89 [15,59; 21,26]	21,22 [17,78; 22,63] p ₁₋₂ =0,3720	17,74 [16,31; 25,38]	27,89 [25,93; 35,28]** p ₃₋₄ = 0,0023
Активность Н- АТФазы, мкмольфосфата/ мг	8,2 [6,63; 8,96]	14,92 [10,15; 16,51]* p ₁₋₂ = 0,0027	9,13 [6,16; 14,18]	12,01 [9,61; 14,18] p ₃₋₄ = 0,0660
Активность ЛДГ, Ед/г белка	62,10 [34,62; 103,96]	38,93 [30,62;45,77] p ₁₋₂ = 0,1892	16,42 [14,22;28,21]	13,49 [12,18; 15,08] p ₃₋₄ = 0,1892
Лактат, мкмоль/г белка	22,69 [17,02; 33,88]	13,46 [10,22; 19,25]* p ₁₋₂ = 0,0239	31,92 [19,3; 36,48]	8,73 [6,94; 10,9]** p ₃₋₄ = 0,00094
<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>				
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	11,17 [7,54; 13,36]	16,08 [12,48; 20,82] p ₁₋₂ =0,1562	9,17 [7,96; 11,9]	4,08 [3,22; 5,02]** p ₃₋₄ = 0,00136
Активность Н- АТФазы, мкмольфосфата/мг	1,13 [0,4; 1,49]	11,34 [9,04; 15,72]* p ₁₋₂ = 0,00094	3,66 [3,38; 4,28]	13,08 [10,4; 16,11]** p ₃₋₄ = 0,00094
Активность ЛДГ, Ед/г белка	6,47 [1,7; 24,03]	9,14 [7,95;14,99] p ₁₋₂ = 0,7131	4,61 [3,55;6,29]	2,63 [2,03;4,30] p ₃₋₄ = 0,08312
Лактат, мкмоль/г белка	28,53 [26,26; 29,73]	12,05 [10,82; 16,12]* p ₁₋₂ = 0,00094	35,06 [30,14; 37,25]	9,11 [8,4; 10,54]** p ₃₋₄ = 0,00094

Примечание: * - изменения в серии L-NAME 25 мг/кг статистически значимы (p<0,05) относительно группы L-NAME 25 мг/кг + Аргинин; ** - изменения в серии L-NAME 200 мг/кг статистически значимы относительно L-NAME 200 мг/кг + Аргинин

При совместном использовании L-аргинина и L-NAME в дозе 200 мг/кг отмечено уменьшение концентрации молочной кислоты в печени и в отделах эпидидимиса при использовании ингибитора в обеих дозах. В митохондриях кардиомиоцитов содержание лактата не изменялось. Активность ЛДГ снижалась после назначения аргинина и L-NAME в дозе 200 мг/кг в митохондриях сердца и, наоборот, повышалась в печени, но только при сочетании ингибитора в дозе 25 мг/кг.

При этом статистически значимо уровень лактата снижался только в цитоплазме клеток головки эпидидимиса при совместном введении L-аргинина и L-NAME в дозе 200 мг/кг на 23,5% ($p=0,0313$), активность же ЛДГ в цитоплазме клеток изучаемых органов не изменялась.

Таким образом, назначение L-аргинина в условиях экспериментального снижения синтеза NO приводило к частичной компенсации дефицита NO в цитоплазме клеток и митохондриях сердца и головки эпидидимиса, что позволяет говорить о взаимосвязи состояния окислительной модификации белков и генерации оксида азота. Одновременно усиливался метаболизм митохондрий, о чем свидетельствовало повышение активности H^+ -АТФазы и СДГ в митохондриях сердца, печени и головки придатка яичка при назначении L-NAME в дозе 200 мг/кг. Также при сочетанном применении L-аргинина и L-NAME общая площадь под кривой спектра поглощения карбонильных производных белков уменьшалась и приближалась к группе контрольных животных, особенно четко выражено корригирующее влияние аргинина в митохондриях кардиомиоцитов и гепатоцитов и менее заметно - в митохондриях эпидидимиса.

3.1.4. Содержание фракций эндогенного карнитина в сыворотке крови, митохондриях и цитоплазме клеток сердца, печени, эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота изолированно и в сочетании с L-аргинином

Карнитин может присутствовать в организме в свободной и связанной этерифицированной форме (ацилкарнитин).

Общее содержание карнитина в организме человека находится в довольно динамичном состоянии. Карнитин и ацилкарнитин мигрируют среди желудочно-кишечного тракта, печени, почек и карнитинзависимых тканей, таких как сердце или скелетные мышцы. Перераспределение между пулами карнитина и ацилкарнитина можно наблюдать в пораженных тканях после любых метаболических нарушений, причем изменения могут возникать в гомеостазе карнитина определенных тканей без одновременного заметного его содержания в других [171]. Кинетика гомеостаза карнитина и общего содержания карнитина может значительно варьироваться от ткани к ткани, поскольку карнитин и ацилкарнитин не могут непосредственно переходить через плазматические мембраны, а карнитин переносится через мембраны тканеспецифическими транспортными системами [77].

В цитоплазме клеток сердца и головки придатка яичка отношение ацилкарнитин/свободный карнитин у интактных здоровых животных составляло около 0,33, в печени и хвосте эпидидимиса - около 0,6. В митохондриальной фракции - в сердце 0,46, в печени - 2,11, головке эпидидимиса - 1,34 и хвосте эпидидимиса - 1,44.

Экспериментальный L-NAME - опосредованный дефицит NO приводил к статистически значимому снижению всех фракций карнитина в сыворотке крови (Рисунок 26).

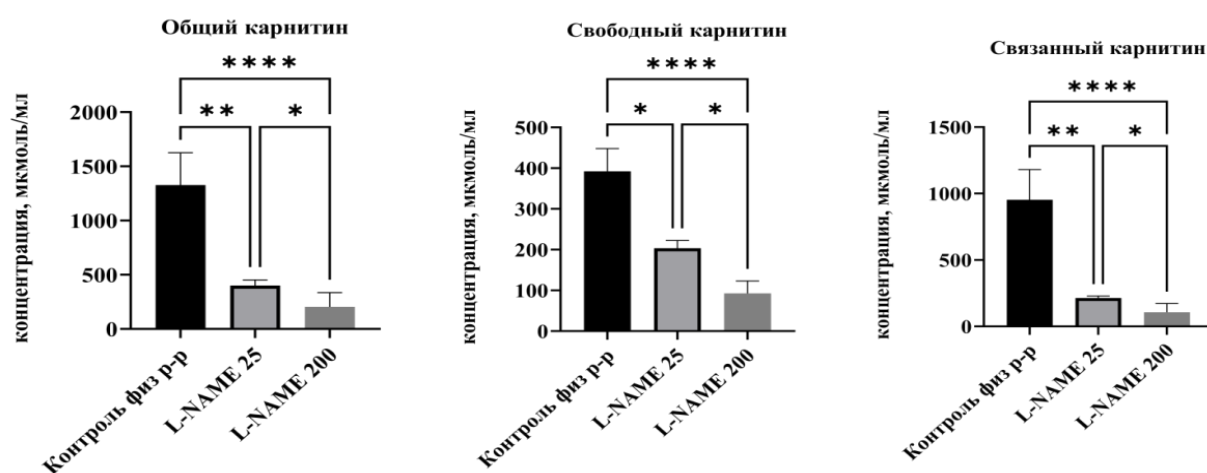


Рисунок 26 – Содержание фракций карнитина в сыворотке крови при введении L-NAME, Me [Q₁; Q₃]

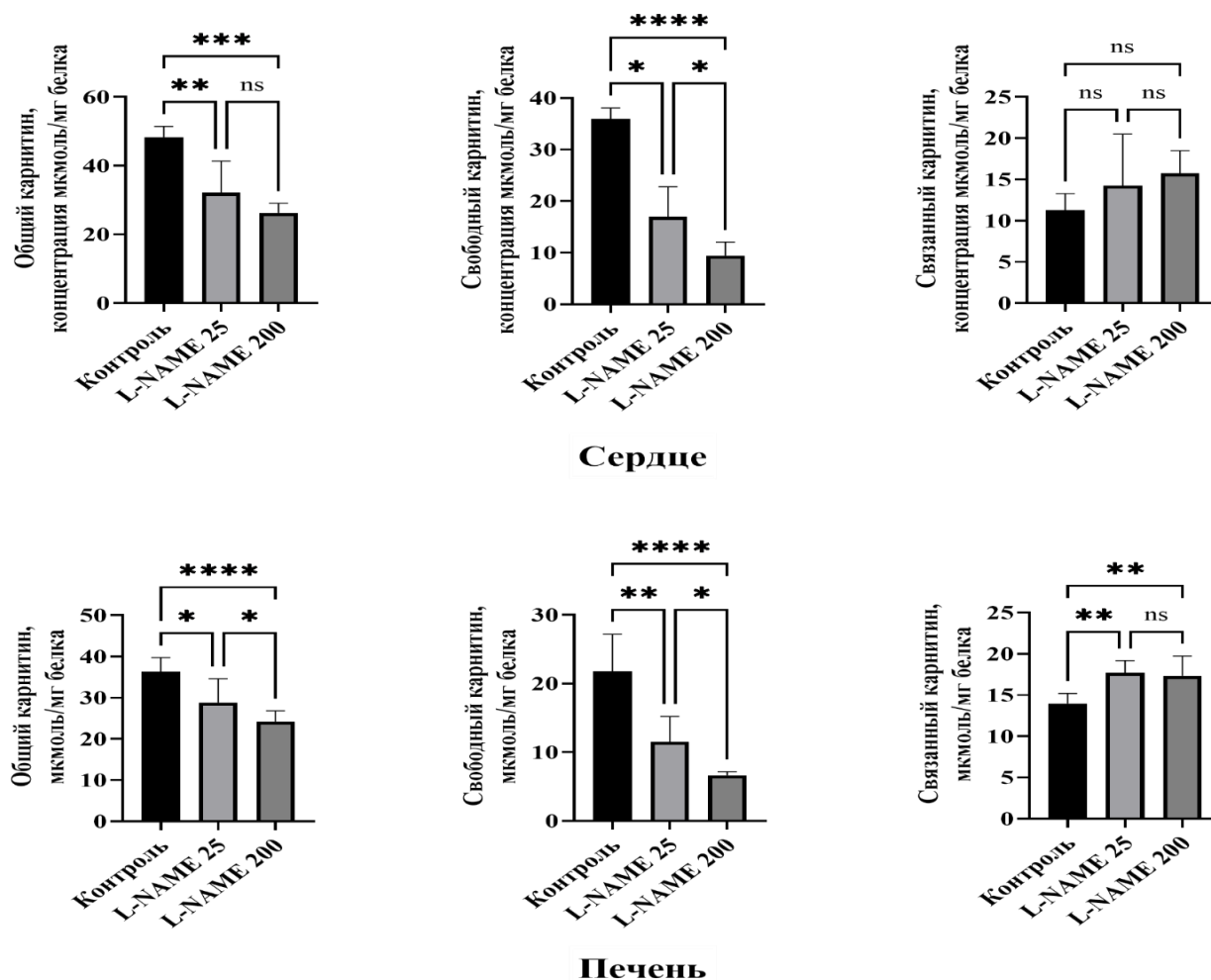


Рисунок 27 – Содержание фракций карнитина в цитоплазме клеток сердца и печени при введении L-NAME, Me [Q₁; Q₃]

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, *** при $p < 0,001$, **** при $p < 0,0001$, символом ns - non significant, результаты статистически не значимы ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q₁; Q₃]

В цитоплазме клеток исследуемых органов отмечено снижение содержания общего и свободного карнитина, причем, для большинства изучаемых органов характерен эффект увеличения снижения уровня карнитина с повышением дозы L-NAME (Рисунок 27, 28). Одновременно с этим, обнаружено увеличение концентрации ацилкарнитина в печени и головке эпидидимиса при использовании L-NAME в дозе 200 мг/кг.

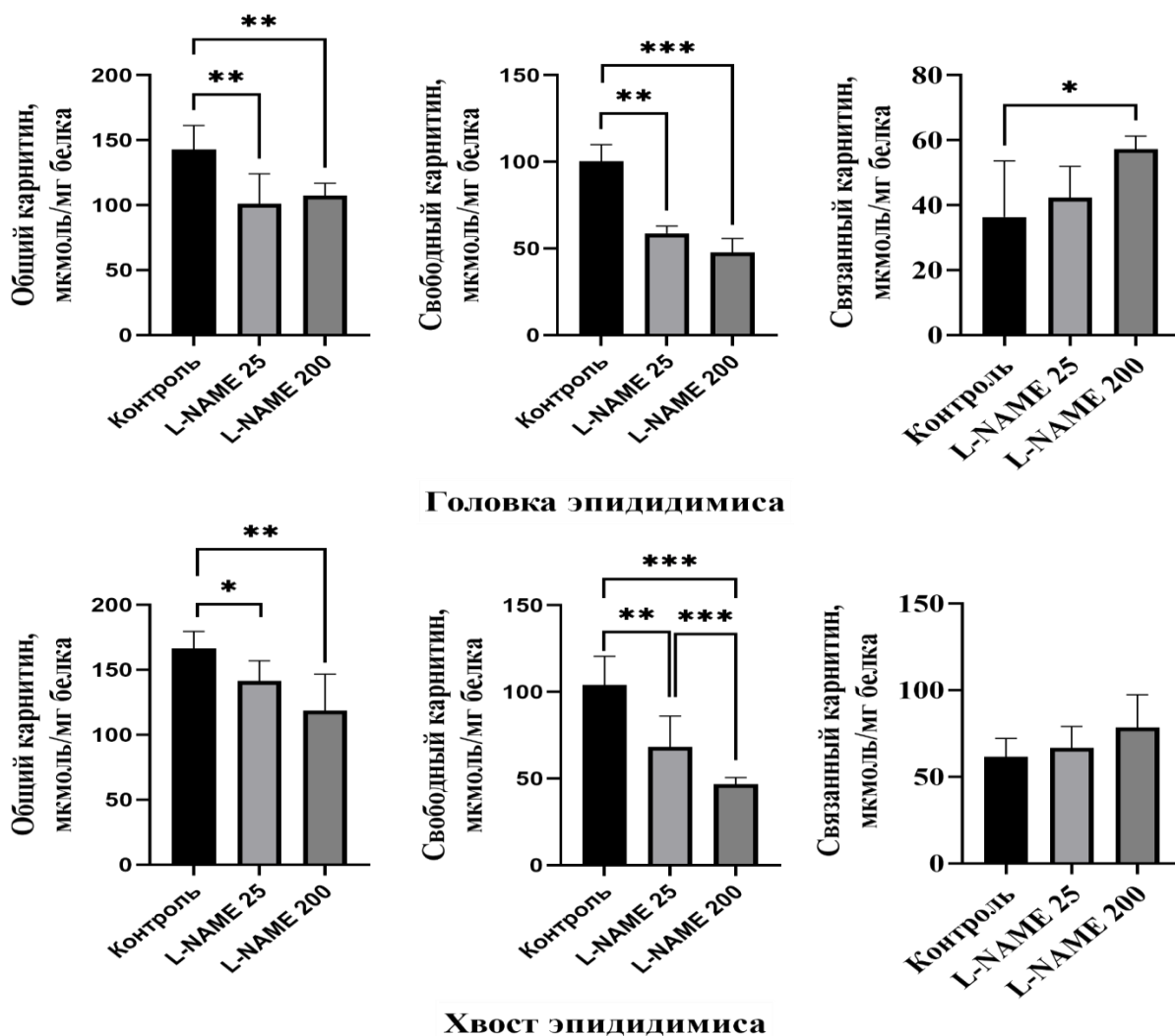


Рисунок 28 – Содержание фракций карнитина в цитоплазме клеток эпидидимиса при введении L-NAME, Ме [Q₁; Q₃]

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, *** при $p < 0,001$, **** при $p < 0,0001$. Значения представлены как Ме[Q₁;Q₃]

Интересен тот факт, что моделирование дефицита синтеза NO в двух выбранных дозах в митохондриях тканей сердца, печени и хвоста эпидидимиса не приводило к статистически значимому уменьшению содержания общего карнитина. В головке придатка яичка отмечалось снижение концентрации общего карнитина (Таблица 8).

Таблица 8 – Влияние L-NAME на содержание фракций карнитина в митохондриях исследуемых органов, Me[Q1;Q3]

Показатели	Серии		
	Контроль Физраствор (1)	L-NAME 25 мг/кг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)
<i>Митохондрии сердца</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	61,66 [46,58; 75,84]	41,21 [32,39; 51,28] p ₁₋₂ = 0,02395	32,98 [31,69;49,04] p ₁₋₃ = 0,02395 p ₂₋₃ = 0,79289
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	43,79 [30,99; 53,83]	32,26 [26,17; 44,31] p ₁₋₂ = 0,1562	27,26 [23,83; 29,83] p ₁₋₃ = 0,0239 p ₂₋₃ = 0,15625
Карнитин связанный, мкмоль/г белка	19,23 [14,58; 24,04]	8,09[3,79; 9,16]* p ₁₋₂ = 0,00559	14,0 [6,08; 21,14] p ₁₋₃ = 0,5373 p ₂₋₃ = 0,04412
<i>Митохондрии печени</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	34,16 [27,28; 37,43]	39,88 [34,38; 45,85] p ₁₋₂ = 0,8665	28,63 [15,45; 53,74] p ₁₋₃ = 1,0000 p ₂₋₃ = 0,8665
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	11,68 [6,76; 13,76]	11,60 [10,21; 12,36] p ₁₋₂ = 1,0000	11,52 [5,08; 21,12] p ₁₋₃ = 1,0000 p ₂₋₃ = 1,0000
Карнитин связанный, мкмоль/г белка	22,93 [20,33; 25,26]	28,61 [23,84; 33,50] p ₁₋₂ = 0,3116	15,40 [10,37; 27,38] p ₁₋₃ = 1,0000 p ₂₋₃ = 0,0646
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	131,73 [124,94; 141,01]	97,75 [74,69; 102,45]* p ₁₋₂ = 0,0136	76,81 [72,90; 84,56]** p ₁₋₃ = 0,0019 p ₂₋₃ = 0,06608
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	54,19 [46,71; 66,19]	77,28 [52,09; 84,09] p ₁₋₂ = 0,2271	59,43 [41,41; 73,74] p ₁₋₃ = 0,8748 p ₂₋₃ = 0,3184
Карнитин связанный, мкмоль/г белка	75,37 [68,32; 81,94]	20,98 [17,92; 26,21]* p ₁₋₂ = 0,00094	21,0 [14,11; 29,91]** p ₁₋₃ = 0,0019 p ₂₋₃ = 0,9581
<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	109,97 [97,21;120,06]	106,72 [104,92; 117,54] p ₁₋₂ = 0,8748	109,75 [92,23; 128,97] p ₁₋₃ = 0,9585 p ₂₋₃ = 0,8748
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	44,06 [37,51; 47,9]	83,88 [64,51; 101,08]* p ₁₋₂ = 0,00094	60,59 [53,04; 64,58]** p ₁₋₃ = 0,0074 p ₂₋₃ = 0,0660

Карнитин связанный, мкмоль/г белка	65,88 [58,6; 73,18]	26,25 [18,03; 32,62] $p_{1-2}=0,00136$	45,32 [23,94; 72,14] $p_{1-3}=0,1892$ $p_{2-3}=0,1892$
--	---------------------	---	--

Примечание: * - изменения в серии «L-NAME 25 мг/кг» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони ($p<0,017$) относительно группы «Контроль Физ.раствор»; ** - изменения в серии L-NAME 200 мг/кг» статистически значимы ($p<0,017$) относительно «группы «Контроль Физ.раствор»

Содержание фракций карнитина на фоне назначения L-аргинина здоровым животным изменялось разнонаправленно: в сыворотке крови не происходило их статистически значимых изменений (Рисунок 29), в митохондриях ткани сердца отмечалось снижение уровня общего карнитина на 62,5% ($p=0,0074$), при этом соотношение карнитин свободный/карнитин общий сдвигалось в сторону увеличения его свободной формы (Таблица 9). В каудальной части эпидидимиса содержание общего и свободного карнитина повышалось с одновременным уменьшением в цитозоле клеток его связанной формы (Таблица 10).

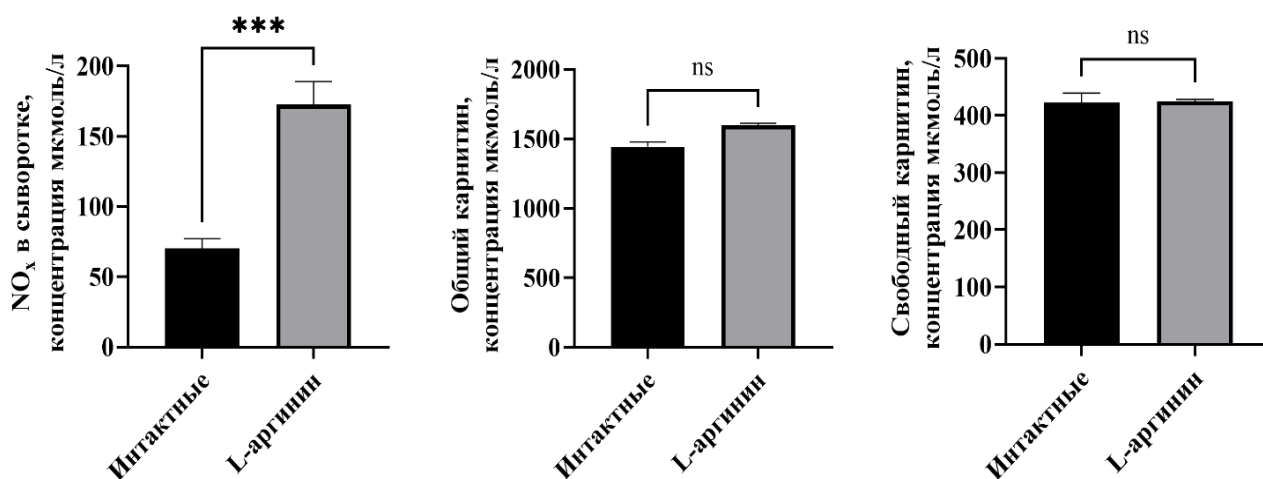


Рисунок 29 – Уровень NO_x и общего и свободного карнитина в сыворотке крови интактных животных изолированно и на фоне введения L-аргинина

Примечание: Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Таблица 9 – Содержание фракций карнитина в митохондриях исследуемых органов при назначении L-аргинина, Ме [Q1;Q3]

Контроль				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	117,90 [109,92; 124,07]	79,12 [73,71; 93,8]	114,33 [98,78; 141,59]	83,33 [70,8; 98,02]
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	54,34 [50,07; 61,38]	25,65 [21,24; 30,59]	73,58 [65,7; 104,33]	45,36 [37,6; 49,66]
Карнитин свободный/ Карнитин общий	0,48 [0,45; 0,52]	0,31 [0,28; 0,35]	0,70 [0,68; 0,72]	0,52 [0,43; 0,53]
Аргинин 500 мг/кг в течение 10 дней				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	72,55 [68,5; 82,98]* p = 0,0074	86,97 [79,01; 98,8] p = 0,6365	127,0 [118,6; 146,15] p = 0,6365	109,45 [98,06; 124,37]* p = 0,0136
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	53,03 [50,47; 61,39] p = 0,8748	21,55 [18,14; 25,8] p = 0,7348	67,34 [60,24; 71,29] p = 0,1892	62,47 [50,04; 67,89]* p = 0,0108
Карнитин свободный/ Карнитин общий	0,69 [0,64; 0,85]* p = 0,0108	0,25 [0,22; 0,28] p = 0,6365	0,52 [0,48; 0,57]* p = 0,0136	0,54 [0,49; 0,63] p = 0,8387

Примечание: * - Статистически значимый уровень относительно контроля при $p < 0,05$

Таблица 10 – Содержание фракций карнитина в цитоплазме клеток исследуемых органах при назначении L-аргинина, Ме [Q1;Q3]

Контроль				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	47,54 [39,14; 56,72]	44,89 [32,41; 52,72]	141,34 [130,90; 150,53]	151,64 [148,44; 171,96]
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	22,98 [18,61; 29,23]	28,95 [15,26; 29,98]	91,75 [77,79; 97,67]	108,22 [103,42; 119,36]
Карнитин связанный мкмоль/мг белка	25,41 [19,72; 27,74]	16,85 [15,96; 18,82]	48,28 [45,63; 58,03]	48,16 [42,82; 49,98]
Аргинин 500 мг/кг в течение 10 дней				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	50,51 [47,38; 53,277] p = 0,8748	45,46 [40,60; 53,62] p = 0,4948	143,04 [128,40; 162,12] p = 0,7928	168,29 [155,8; 171,35] p = 0,1892

Продолжение Таблицы 10

Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	26,84 [24,52; 30,79] p = 0,1892	25,67 [20,77; 29,29] p = 1,000	102,35 [92,72; 118,50] p = 0,1035	124,89 [119,77; 128,38] p = 0,0660
Карнитин связанный мкмоль/мг белка	24,19 [21,47; 24,97] p = 0,4948	18,58 [16,80; 26,13] p = 0,3720	41,00 [34,46; 46,65] p = 0,0520	40,92 [36,02; 43,81]* p = 0,0181

Примечание: * - Статистически значимый уровень относительно контроля при $p < 0,05$

Введение донора NO - L-аргинина самцам крыс на фоне сниженной генерации оксида азота под влиянием L-NAME приводило к повышению эндогенного уровня общего и свободного карнитина в сыворотке крови (Рисунок 30).

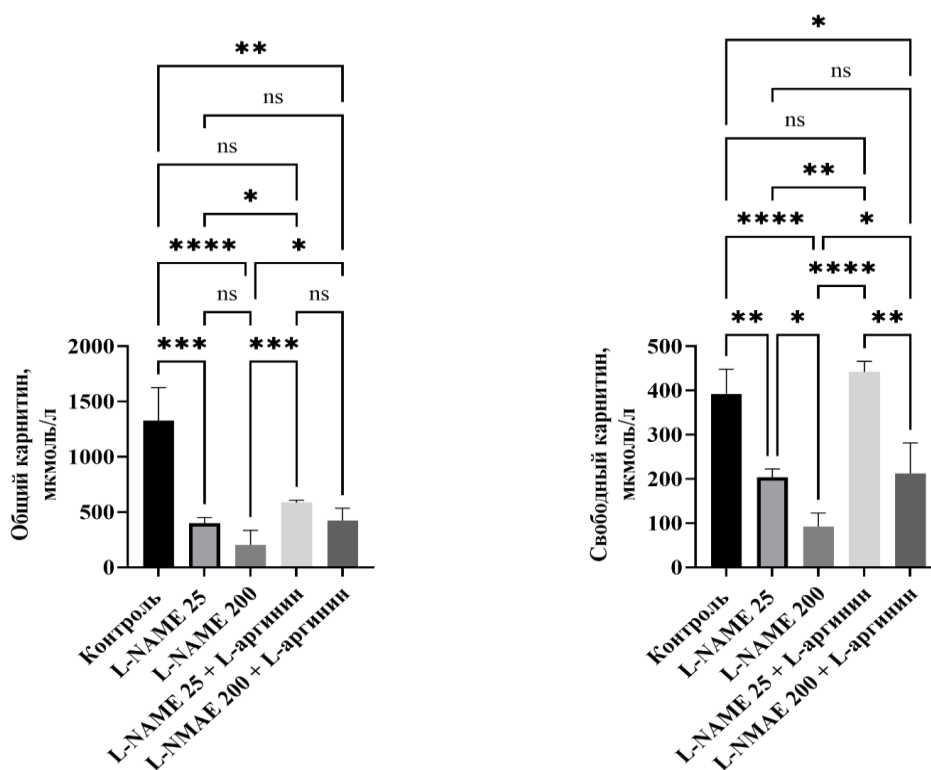


Рисунок 30 – Влияние L-аргинина на содержание общего и свободного карнитина в сыворотке крови при введении L-NAME, Me [Q1;Q3]

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, *** при $p < 0,001$, **** при $p < 0,0001$, символом ns - non significant, результаты статистически не значимы ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

В цитоплазматической фракции подъем уровня общего карнитина наблюдался только в сердце при назначении L-NAME в дозе 25 мг/кг и сердце, печени - при дозе 200 мг/кг, также важен тот факт, что при высокой дозе L-NAME уровень свободного карнитина повышался во всех исследуемых тканях (Таблица 11).

Таблица 11 – Влияние L-аргинина на содержания карнитина в цитоплазме клеток исследуемых органов при введении L-NAME, Me[Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг(1)	L-NAME 25 мг/кг+Арг(2)	L-NAME 200 мг/кг(3)	L-NAME 200 мг/кг+Арг(4)
Сердце				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	32,14 [26,69;40,61]	50,67 [49,35;53,96]* p ₁₋₂ = 0,00094	26,22 [19,55;28,74]	43,35 [38,87; 57,69]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	16,95 [13,52; 22,3]	27,45 [25,17; 31,67] p ₁₋₂ = 0,7131	9,41 [8,77; 11,59]	17,21 [14,45; 22,66]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	14,23 [12,35;19,61]	24,57 [21,24; 25,69] p ₁₋₂ = 0,0053*	15,74 [10,77;18,54]	27,57 [25,53; 33,87]** p ₃₋₄ = 0,00136
Печень				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	28,82 [26,95; 24,3]	34,43 [29,91;38,03] p ₁₋₂ = 0,1278	24,24 [21,07;26,46]	30,52 [25,87; 32,97]** p ₃₋₄ = 0,01358
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	11,49 [9,43; 15,02]	13,15 [9,7; 18,56] p ₁₋₂ = 0,4308	6,64 [5,62; 7,13]	15,08 [10,26; 17,12]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	17,69 [17,11; 19,13]	20,34 [18,07; 21,29] p ₁₋₂ = 0,08312	17,33 [16,09; 19,34]	15,77 [14,96; 16,38] p ₃₋₄ = 0,0660
Головка эпидидимиса				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	101,0 [93,14; 119,34]	117,22 [108,03;138,93] p ₁₋₂ = 0,2271	107,39 [92,92;116,79]	123,52 [111,55; 131,32] p ₃₋₄ = 0,08314
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	58,71 [53,99; 62,1]	57,85 [52,37; 65,91] p ₁₋₂ = 0,9581	47,8 [43,72; 55,63]	57,86 [53,8; 62,37]** p ₃₋₄ = 0,04908
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	42,29 [39,57; 49,95]	59,02 [55,2; 63,74]* p ₁₋₂ = 0,01813	57,23 [49,2; 61,23]	63,05 [56,05,; 72,81] p ₃₋₄ = 0,1278

<i>Хвост эпидидимуса</i>				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	141,36 [127,87;156,08]	144,93 [132,96; 152,97] $p_{1-2} = 0,5635$	118,55 [108,55;145,42]	145,17 [135,13; 149,40] $p_{3-4} = 0,1151$
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	38,26 [61,96; 82,56]	65,04 [58,21; 78,12] $p_{1-2} = 0,4948$	46,64 [41,78; 49,39]	99,11 [86,23; 106,13]** $p_{3-4} = 0,00094$
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	66,77 [61,21; 77,35]	75,3 [61,39; 91,7] $p_{1-2} = 0,4308$	78,38 [61,51; 95,46]	44,27 [36,20; 55,14]** $p_{3-4} = 0,00538$

Примечание: * - изменения в серии «L-NAME 25 мг/кг + Аргинин» статистически значимы ($p < 0,05$) относительно группы «L-NAME 25 мг/кг»; ** - изменения в серии «L-NAME 200 мг/кг+Аргинин» статистически значимы ($p < 0,05$) относительно «группы «L-NAME 200 мг/кг» ($p < 0,05$)»

В митохондриальной фракции L-аргинин способствовал увеличению общего и свободного карнитина при назначении на фоне L-NAME в дозе 200 мг/кг во всех исследуемых органах, таким образом, чем выше доза ингибитора, чем ниже уровень NO и сильнее выражен окислительный стресс, тем ярче проявляется данный эффект (Таблица 12).

Таблица 12 – Влияние L-аргинина на содержания карнитина в митохондриях исследуемых органов при введении L-NAME, Me[Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг(1)	L-NAME 25 мг/кг +Арг(2)	L-NAME 200 мг/кг(3)	L-NAME 200 мг/кг +Арг(4)
Сердце				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	41,21 [32,39; 51,28]	155,21 [129,60;169,97]* $p_{1-2} = 0,000939$	32,98 [31,69;49,04]	132,11 [120,45;136,25]** $p_{3-4} = 0,000939$
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	32,26 [26,17; 44,31]	87,84 [81,30; 99,27]* $p_{1-2} = 0,000939$	27,26 [23,83; 29,83]	103,13 [88,45; 113,08]** $p_{3-4} = 0,000939$
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	8,09 [3,79; 9,16]	60,74 [51,84; 73,06]* $p_{1-2} = 0,000939$	14,00 [6,08; 21,14]	26,47 [22,09; 35,47]** $p_{3-4} = 0,0239$

<i>Печень</i>				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	39,88 [34,38; 45,83]	56,75 [50,58; 58,9]* p ₁₋₂ = 0,01008	28,63 [15,45; 53,74]	77,97 [73,07; 83,67]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	11,6 [10,21; 12,36]	39,58 [35,37; 43,49]* p ₁₋₂ = 0,00094	11,52 [5,08; 21,12]	52,89 [46,1; 55,64]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	28,61 [23,84; 33,5]	14,84 [14,07; 15,32]* p ₁₋₂ = 0,00195	15,40 [10,37; 27,38]	23,87 [23,14; 30,79]** p ₃₋₄ = 0,08312
<i>Головка эпидидимиса</i>				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	97,75 [74,69; 102,45]	72,77 [64,49; 90,81] p ₁₋₂ = 0,2271	76,81 [72,9; 84,56]	416,71 [373,14; 495,92]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	76,81 [52,09; 84,09]	40,25 [38,28; 45,44]* p ₁₋₂ = 0,00194	59,43 [41,41; 73,74]	313,96 [273,82; 364,98]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	20,98 [17,92; 26,21]	31,52 [26,92; 47,05] p ₁₋₂ = 0,05230	21,00 [14,11; 29,91]	101,48 [61,46; 120,84]** p ₃₋₄ = 0,01358
<i>Хвост эпидидимиса</i>				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	106,72 [104,9; 117,54]	135,38 [116,34; 150,68]* p ₁₋₂ = 0,02394	109,75 [92,23; 128,97]	198,82 [164,43; 234,13]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	83,88 [64,51; 101,08]	88,03 [72,76; 98,30] p ₁₋₂ = 0,7131	60,59 [53,04; 64,58]	168,96 [138,26; 193,65]** p ₃₋₄ = 0,00094
Карнитин связанный, мкмоль/г белка	26,25 [18,03; 32,61]	48,27 [41,2; 56,48]* p ₁₋₂ = 0,00387	45,32 [23,94; 72,14]	27,65 [16,28; 53,24] p ₃₋₄ = 0,43089

Примечание: * - изменения в серии «L-NAME 25 мг/кг + Аргинин» статистически значимы (p<0,05) относительно группы «L-NAME 25 мг/кг»; ** - изменения в серии «L-NAME 200 мг/кг+Аргинин» статистически значимы (p<0,05) относительно «группы «L-NAME 200 мг/кг» (p<0,05)

По-видимому, L-аргинин в условиях экспериментального дефицита синтеза NO, проявляет антиоксидантные свойства, препятствует окислительному повреждению белков, способствуя нормальному функционированию ферментов гомеостаза карнитина. Но, кроме этого, известно, что назначение аргинина и

сопутствующее возрастание уровня NO_x стимулирует фосфорилирование АМР-активированной протеинкиназы (АМРК), что приводит к (1) снижению содержания малонил-КоА из-за ингибирования ацетил-КоА карбоксилазы и повышению активности КПП1 и рецептора γ , активируемого пролифератором пероксисом, коактиватора-1 α (PPAR α) [195, 235], а также 2) усилению транспорта жирной кислоты в митохондрии для β -окисления жирных кислот [70]. Одним из важнейших факторов транскрипции, регулирующих митохондриальное функционирование, является PPAR α , поэтому при его активации усиливается митохондриальный биогенез и окислительное фосфорилирование. В данном исследовании также отмечается усиление окислительного фосфорилирования при назначении аргинина совместно с L-NAME в дозе 200 мг/кг, о чем свидетельствует статистически значимое повышение активности СДГ и H^+ -АТФазы. Также обнаруженное в цитоплазматической фракции сердца и печени увеличение содержания общего карнитина, повышение уровня свободного карнитина при той же дозе L-NAME во всех исследуемых органах и увеличение митохондриальных фракций карнитина предполагает активизацию процесса β -окисления жирных кислот в митохондриях, что согласуется с исследованиями других авторов [195, 235, 70]. Введение L-аргинина с ингибитором NO - L-NAME в дозе 25 мг/кг не вызывает подобных изменений, видимо, ввиду его краткосрочного действия.

3.1.5. Влияние экзогенного карнитина на функционирование митохондрий в тканях сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота

Воздействие карнитина хлорида на метаболизм митохондрий здоровых животных

При назначении карнитина хлорида здоровым животным в сыворотке крови повышения содержания общего карнитина не отмечено (Рисунок 31). В

цитоплазме клеток его концентрация статистически значимо увеличивалась в печени и головке придатка яичка (Таблица 14).

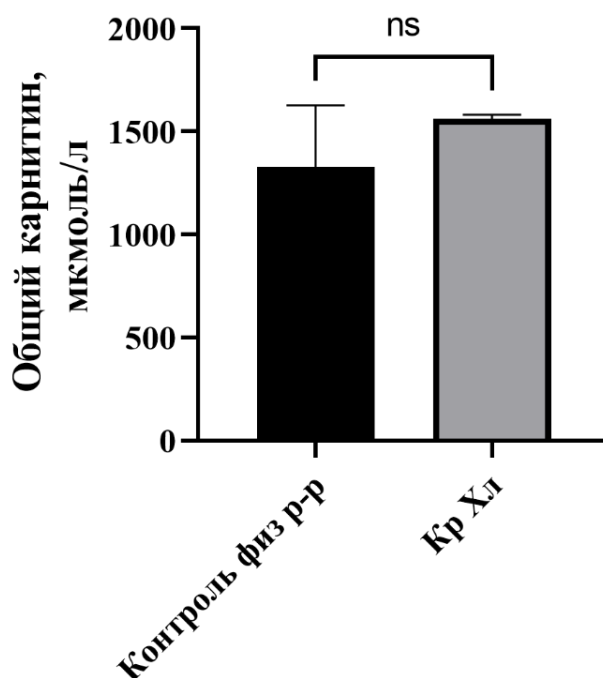


Рисунок 31 – Концентрация общего карнитина в сыворотке крови здоровых крыс при назначении карнитина хлорида, мкмоль/мл: Me [Q₁; Q₃]

Примечание: символом ns - non significant отмечены статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q₁;Q₃]

При этом отмечено снижение содержания общего карнитина в митохондриях сердца и обоих отделах эпидидимиса; в митохондриях гепатоцитов его содержание оставалось на уровне контрольной группы (Таблица 13). Данные изменения не противоречат современным представлениям о митохондриальных механизмах регуляции содержания карнитина, в настоящее время считается, что транспортер карнитина OSTN₁ участвует в поддержании внутриклеточного гомеостаза карнитина [248].

Таблица 13 – Содержание фракций L-карнитина в митохондриях исследуемых органов при введении карнитина хлорида, Me [Q₁; Q₃]

<i>Здоровые животные (митохондриальная фракция) Контроль</i>				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	117,90 [109,92; 124,07]	79,12 [73,71; 93,8]	114,33 [98,78; 141,59]	83,33 [70,8;98,02]
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	54,34 [50,07; 61,38]	25,65 [21,24; 30,59]	73,58 [65,7; 104,33]	45,36 [37,6; 49,66]
Карнитин свободный/ Карнитин общий	0,48 [0,45; 0,52]	0,31 [0,28; 0,35]	0,70 [0,68; 0,72]	0,52 [0,43; 0,53]
Карнитин связанный/ карнитин свободный	0,46 [0,39; 0,56]	2,11 [1,57; 2,96]	1,34 [1,04; 1,49]	1,44 [1,32; 1,68]
<i>Здоровые животные + Карнитина хлорид 300 мг/кг в течение 21 дня</i>				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	73,12 [57,94; 107,08]* p=0,02394	73,85 [53,70; 79,92] p=0,2271	73,35 [65,89; 77,1]* p=0,00136	47,76 [44,9; 54,3]* p=0,00136
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	51,88 [43,71; 76,49] p=0,87482	27,35 [7,98; 36,91] p=1,0000	41,52 [33,69; 53,27]* p=0,00094	31,79 [29,67; 40,45]* p=0,02394
Карнитин свободный/ Карнитин общий	0,26 [0,21; 0,31]* p=0,00194	0,34 [0,11; 0,51] p=0,7132	0,62 [0,51; 0,66]* p=0,04057	0,63 [0,58; 0,8]* p=0,03132
Карнитин связанный/ карнитин свободный	2,86 [2,21; 3,64]* p=0,00094	1,92 [1,08; 7,51] p=0,0520	0,61 [0,51; 0,97]* p=0,0053	0,58 [0,26; 0,71]* p=0,00094

Примечание: * - Статистически значимый уровень относительно контроля при p<0,05

Концентрация свободного карнитина в цитоплазме клеток кардиомиоцитов повышалось при сохраненном уровне общего карнитина, в цитоплазме клеток остальных исследуемых органов данная фракция карнитина не изменялась (Таблица 14).

Таблица 14 – Содержание фракций L-карнитина в цитоплазме клеток исследуемых органов при введении карнитина хлорида, Me [Q₁; Q₃]

<i>Здоровые животные (цитоплазматическая фракция) Контроль</i>				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	47,54 [39,14; 56,72]	44,89 [32,41; 52,72]	141,34 [130,9; 150,53]	151,64 [148,44; 171,96]
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	22,98 [18,62; 29,24]	28,69 [14,36; 32,06]	91,75 [77,79; 97,66]	108,22 [103,42; 119,36]
Карнитин свободный/ Карнитин общий	0,49 [0,45; 0,52]	0,58 [0,44; 0,66]	0,64 [0,62; 0,66]	0,65 [0,63; 0,67]
Карнитин связанный/ карнитин свободный	0,33 [0,29; 0,37]	0,64 [0,55; 0,76]	0,31 [0,29; 0,53]	0,65 [0,41; 0,70]
<i>Здоровые животные + Карнитина хлорид 300 мг/кг в течение 21 дня</i>				
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	54,77 [48,56; 73,03] p=0,1562	56,46 [52,81; 62,00]* p=0,01813	153,38 [136,39; 174,62]* p=0,01562	170,9 [166,17; 185,9] p=0,06608
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	38,71 [33,47; 55,06]* p=0,00194	37,92 [23,87; 45,09] p=1,0000	97,42 [83,58; 105,43] p=0,3184	110,39 [104,2; 122,86] p=0,8748
Карнитин свободный/ Карнитин общий	0,70 [0,66; 0,75]* p=0,00094	0,67 [0,50; 0,75] p=0,2701	0,62 [0,56; 0,68] p=0,7131	0,70 [0,68; 0,72]* p=0,00136
Карнитин связанный/ карнитин свободный	0,41 [0,33; 0,51] p=0,1278	0,47 [0,33; 1,17] p=0,2271	0,61 [0,48; 0,78]* p=0,0181	0,54 [0,49; 0,5] p=0,6365

Примечание: * - Статистически значимый уровень относительно соответствующего контроля при $p < 0,05$

Введение карнитина хлорида сопровождалось статистически значимым нарастанием концентрации метаболитов оксида азота в сыворотке крови (Рисунок 32), цитоплазме клеток сердца, печени и головки придатка яичка (Таблица 15), митохондриях печени и головки эпидидимиса. В каудальной части эпидидимиса подобных изменений концентрации NO_x не выявлено.

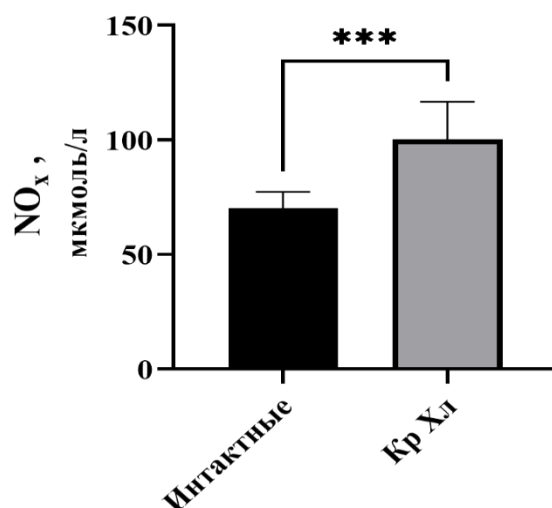


Рисунок 32 – Концентрация NO_x в сыворотке крови крыс при введении карнитина хлорида (КрХл), Ме [Q₁; Q₃]

Примечание: символом *** - отмечены различия групп при $p < 0,001$

Таблица 15 – Влияние экзогенного карнитина хлорида на уровень NO_x в цитоплазме и митохондриях клеток исследуемых органов крыс, Ме [Q₁; Q₃]

<i>Здоровые животные. Контроль (цитоплазма клеток)</i>				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
NO мкмоль/м г белка	34,79 [31,09; 40,46]	28,15 [23,64; 29,42]	47,2 [41,03; 50,23]	60,12 [56,57; 65,07]
<i>Здоровые животные + Карнитина хлорид 300 мг/кг в течение 21 дня (цитоплазма клеток)</i>				
NO мкмоль/м г белка	51,52 [42,96; 55,93]* p= 0,01813	37,01 [32,1; 40,19]* p= 0,01008	64,72 [55,78; 73,97]* p=0,00276	68,36 [61,31; 71,98] p=0,1278
<i>Здоровые животные. Контроль (митохондрии)</i>				
	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
NO мкмоль/м г белка	77,48 [75,06; 79,32]	43,31 [36,6; 44,42]	55,49 [50,42; 58,16]	61,21 [58,48; 74,29]
<i>Здоровые животные + Карнитина хлорид 300 мг/кг в течение 21 дня (митохондрии)</i>				
NO мкмоль/м г белка	62,31 [42,54; 81,26] p= 0,1035	50,78 [48,52; 52,86]* p= 0,00094	69,59 [57,56; 92,7]* p=0,0239	71,55 [55,31; 81,56] p=0,7131

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы при $p < 0,05$

Ферменты NO-синтазы и аргиназы могут конкурировать за их общий субстрат L-аргинин, это взаимодействие представляет собой потенциальный важный фактор в регуляции NO генерации. Из литературных источников известно, что карнитин способен подавлять активность аргиназы, а это, в свою очередь, может приводить к увеличению продукции NO [266], но, предположительно, возможны и другие механизмы увеличения генерации NO под воздействием карнитина, которые будут обсуждены ниже.

Изучение показателей энергетического обмена исследуемых тканей при введении карнитина хлорида здоровым животным дало следующие результаты: статистически значимых различий в концентрации молочной кислоты и активности ЛДГ в цитоплазме и митохондриях клеток выявлено не было, также не изменялась активность СДГ. Активность H^+ -АТФазы увеличилась на 72,2% ($p=0,0405$) только в митохондриях гепатоцитов.

Полученные результаты указывают на то, что карнитина хлорид при непосредственном введении здоровым крысам не вызывает существенных сдвигов в энергетическом обмене исследуемых тканей.

Анализ окислительно-восстановительного статуса животных после введения им карнитина хлорида показал, что в митохондриях сердца и головки придатка яичка общая площадь под кривой статистически значимо не изменялась, но наблюдалось увеличение количества карбонильных производных в сердце: АДНФГ основного характера, КДНФГ как нейтральных, так и основных аминокислот относительно соответствующей контрольной группы; в митохондриях головки эпидидимиса найдено увеличение КДНФГ нейтральных аминокислотных остатков (Таблица 16). В митохондриях печени выявлено снижение общего количества продуктов ОМБ на 28,1% ($p=0,0074$) относительно контрольной группы крыс в основном за счет уменьшения уровня АДНФГ и КДНФГ производных нейтрального характера. В митохондриях хвоста придатка яичка статистически значимых отличий уровня окислительной модификации не обнаружено.

Таблица 16 – Сравнительный анализ компонентов спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и активности СОД в митохондриях здоровых животных и крыс самцов в условиях назначения карнитина хлорида, Ме [Q₁;Q₃]

Показатель	Здоровые животные (контроль)	Здоровые животные + карнитина хлорид
<i>Митохондрии сердца</i>		
S АДНФГн., е.о.п. на мг белка	3,45[2,13; 4,72]	2,47[1,07; 4,62] p=0,5635
S АДНФГо., е.о.п. на мг белка	0,19 [0,17; 0,42]	0,91[0,74;1,24]* p= 0,00136
S КДНФГн., е.о.п. на мг белка	0,52[0,36; 0,69]	2,34[2,03; 2,7]* p=0,00194
S КДНФГо., е.о.п. на мг белка	0,04[0,028; 0,052]	0,077[0,071; 0,12]* p=0,00136
Собщ.СП ОМБ, е.о.п. на мг белка	4,13[2,98; 5,85]	5,9 [4,41;7,93] p=0,1562
Активность СОД, УЕ/мг белка	1,22[0,87; 1,45]	1,60[1,023; 2,26] p=0,1892
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	39,18 [32,74; 58,09]	27,61[11,49; 46,45] p=0,1892
<i>Митохондрии печени</i>		
S АДНФГн., е.о.п. на мг белка	2,11[1,71; 2,72]	1,44[1,28; 1,76]* p=0,04057
S АДНФГо., е.о.п. на мг белка	0,67 [0,52; 0,75]	0,38[0,29; 0,60] p= 0,05203
S КДНФГн., е.о.п. на мг белка	0,81[0,70; 1,13]	0,51[0,38; 0,65]* p=0,00740
S КДНФГо., е.о.п. на мг белка	0,084[0,061; 0,097]	0,050[0,036; 0,081] p=0,1562
Собщ.,СП ОМБ, е.о.п. на мг белка	3,52[3,20; 4,42]	2,53 [2,21;2,73]* p=0,00740
Активность СОД, УЕ/мг белка	6,40[5,14; 7,11]	7,62[6,68; 8,15] p=0,1892
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	48,56 [45,39; 57,57]	44,61[40,62; 46,36] p=0,08312
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>		
S АДНФГн., е.о.п. на мг белка	5,16[4,69; 6,55]	6,23[5,67; 8,13] p=0,2701
S АДНФГо., е.о.п. на мг белка	0,81 [0,65; 0,84]	0,72[0,43; 1,02] p= 0,9385

Продолжение Таблицы 16

S КДНФГ _{н.} , е.о.п. на мг белка	0,58[0,54; 0,64]	0,78[0,65; 1,19]* p=0,01813
S КДНФГ _{о.} , е.о.п. на мг белка	0,098[0,069; 0,117]	0,086[0,068; 0,11] p=0,7928
Активность СОД, УЕ/мг белка	32,92[31,81; 35,64]	39,59[34,35; 49,36]* p=0,0312
S общ.СП ОМБ, е.о.п. на мг белка	6,68[6,24; 7,78]	7,66 [7,47;10,63] p=0,1036
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	51,89 [42,13; 58,91]	48,70[36,43; 56,35] p=0,3720
Митохондрии хвоста эпидидимиса		
S АДНФГ _{н.} , е.о.п. на мг белка	3,6[2,91; 4,40]	2,83[1,87; 3,89] p=0,1892
S АДНФГ _{о.} , е.о.п. на мг белка	1,14 [0,98; 1,62]	0,82[0,52; 1,31] p= 0,1562
S КДНФГ _{н.} , е.о.п. на мг белка	2,18[1,32; 2,44]	0,92[0,67; 1,98] p=0,1278
S КДНФГ _{о.} , е.о.п. на мг белка	0,12[0,083; 0,19]	0,081[0,055; 0,13] p=0,2271
Собщ.СП ОМБ, е.о.п. на мг белка	7,21[5,51; 8,35]	5,66 [4,32;6,37] p=0,0831
Активность СОД, УЕ/мг белка	31,24[30,13; 37,87]	38,02[35,47; 40,55] p=0,2271
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	40,48 [34,76; 44,83]	38,02[22,38; 45,88] p=0,6365

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно группы здоровых животных при $p < 0,05$

Активность фермента антиоксидантной защиты – СОД статистически значимо не изменялась в исследуемых органах, кроме головки эпидидимиса, где зафиксировано увеличение активности данного фермента на 20,2% ($p=0,0312$).

Также не было выявлено статистически значимого изменения РАП ОМБ митохондрий исследуемых органов.

Таким образом, введение карнитина хлорида приводит к снижению общего количества продуктов ОМБ в митохондриях печени за счет уменьшения уровня АДНФГ и КДНФГ производных нейтрального характера. И, наоборот, к повышению содержания как первичных, так и вторичных маркеров в

митохондриях сердца и увеличению КДФФГ нейтральных аминокислот в головке придатка яичка.

Влияние экзогенного карнитина на функционирование митохондрий в тканях сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота, вызванного применением ингибитора – L-NAME в дозах 25 и 200 мг/кг

При введении экзогенного карнитина в условиях экспериментального дефицита NO в сыворотке крови уровень общего карнитина повышался на 17,4 % ($p=0,0031$) при дозе L-NAME 25 мг/кг, при увеличении дозы до 200 мг/кг - статистически значимо не изменялся.

В митохондриях исследуемых органов содержание эндогенного карнитина изменялось разнонаправленно: в печени наблюдалось повышение уровня общего карнитина, в сердце, головке и хвосте эпидидимиса - снижение свободного карнитина при совместном введении с L-NAME в дозе 25 мг/кг, при этом в митохондриях сердца и головки эпидидимиса уровень общего карнитина статистически значимо не отличался от серии с введением ингибитора L-NAME, в хвосте придатка наблюдалось также и уменьшение общего карнитина (Рисунок 33-35).

В цитоплазме клеток печени карнитина хлорид также способствовал повышению уровня общего карнитина при совместном введении с L-NAME в дозе 25 мг/кг на 38% ($p=0,0135$), с L-NAME 200 мг/кг - в 2,3 раза ($p=0,0009$), в головке придатка яичка при одновременном введении с L-NAME в дозе 25 мг/кг наблюдалось, наоборот, снижение содержания как общего, так и свободного карнитина на 41% ($p=0,0038$) и 200% ($p=0,0009$) соответственно.

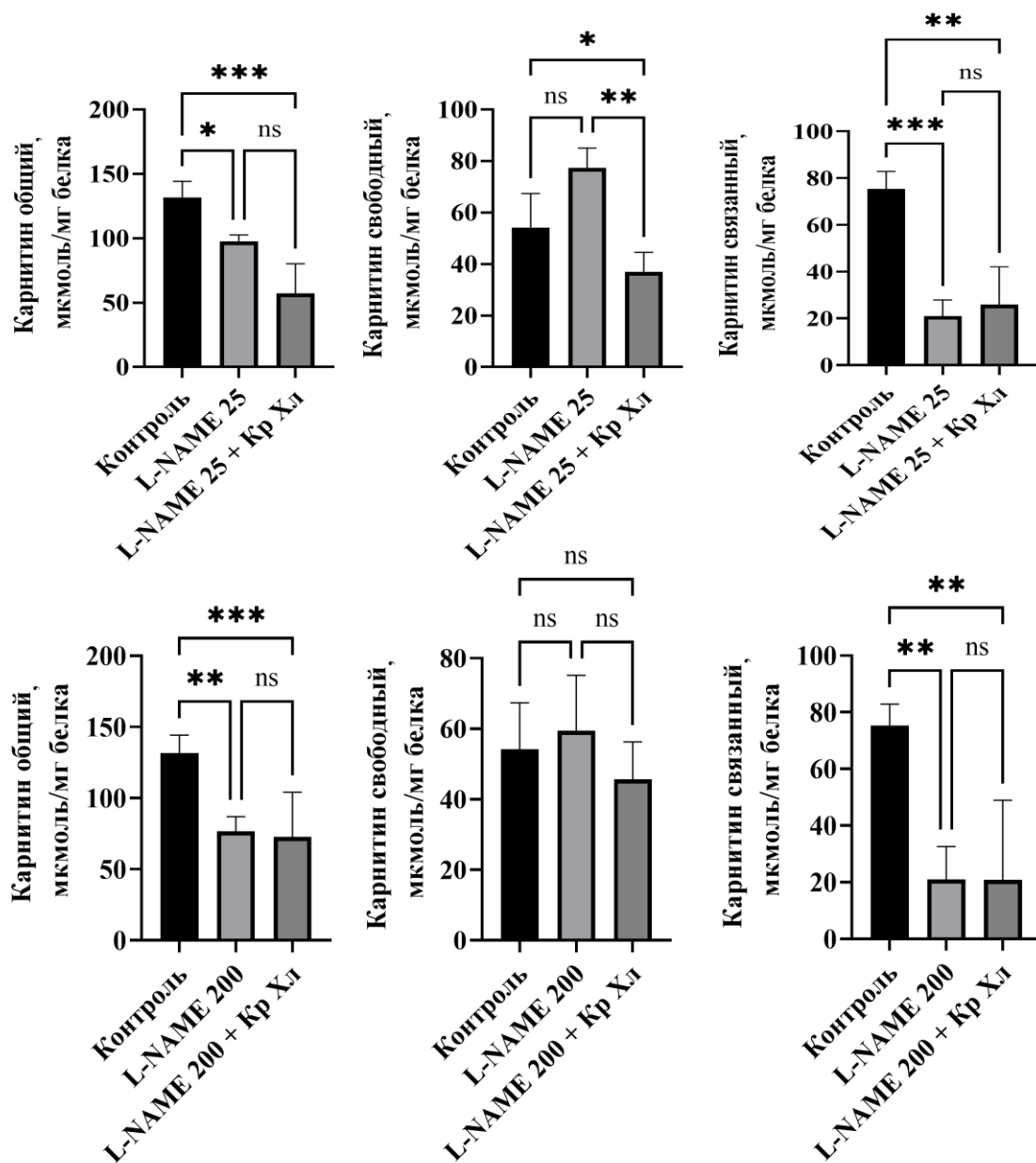


Рисунок 33 – Влияние карнитина хлорида (CrCl) на содержание общего, свободного и связанного карнитина в митохондриях сердца при введении L-NAME, Ме [Q1;Q3]

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Ме[Q1;Q3]

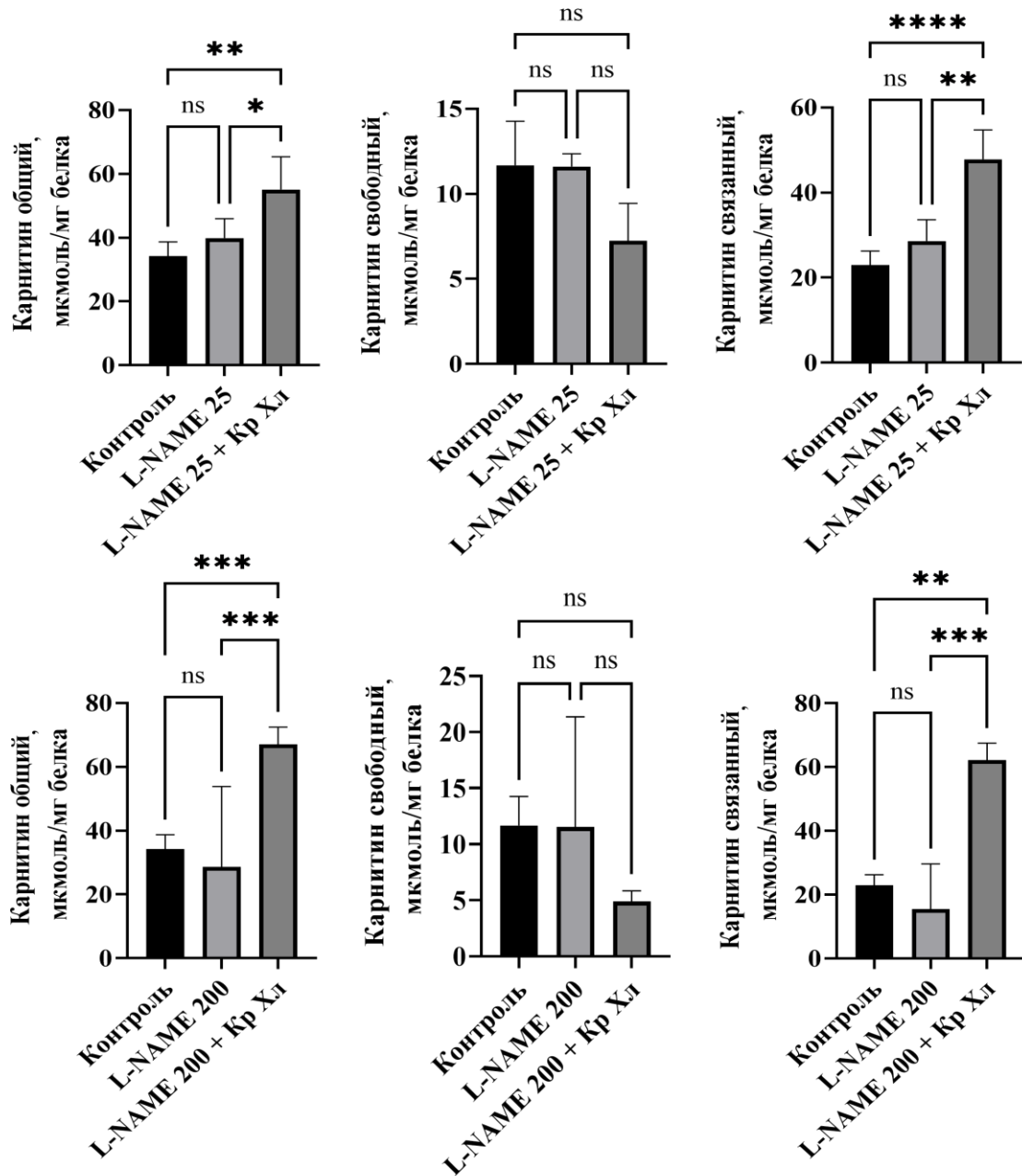
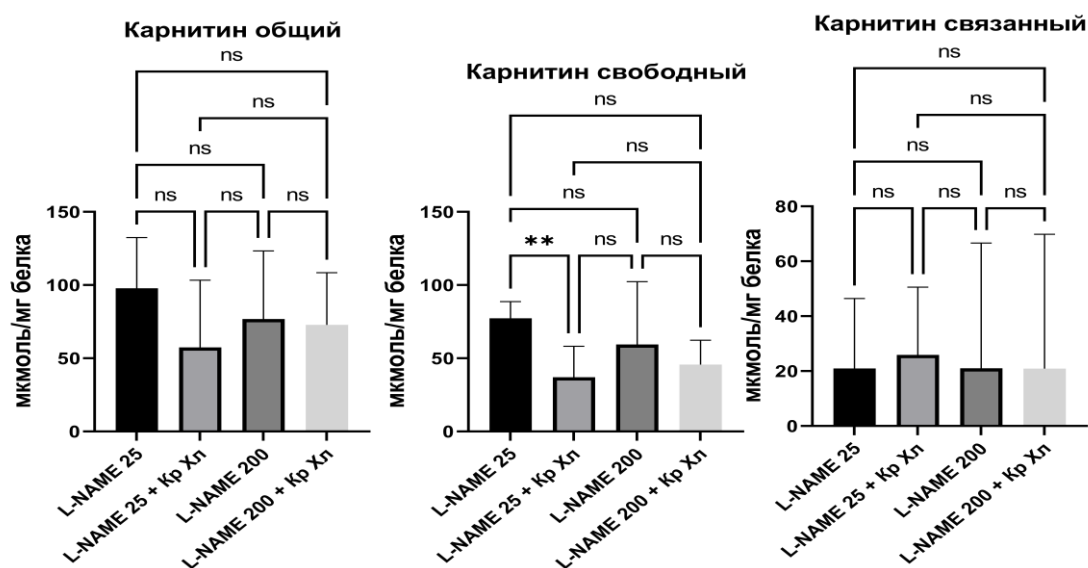


Рисунок 34 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на содержание общего, свободного и связанного карнитина в митохондриях печени при введении L-NAME, Ме [Q1;Q3]

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, **** - различия групп при $p < 0,0001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Ме[Q1;Q3]

А



В

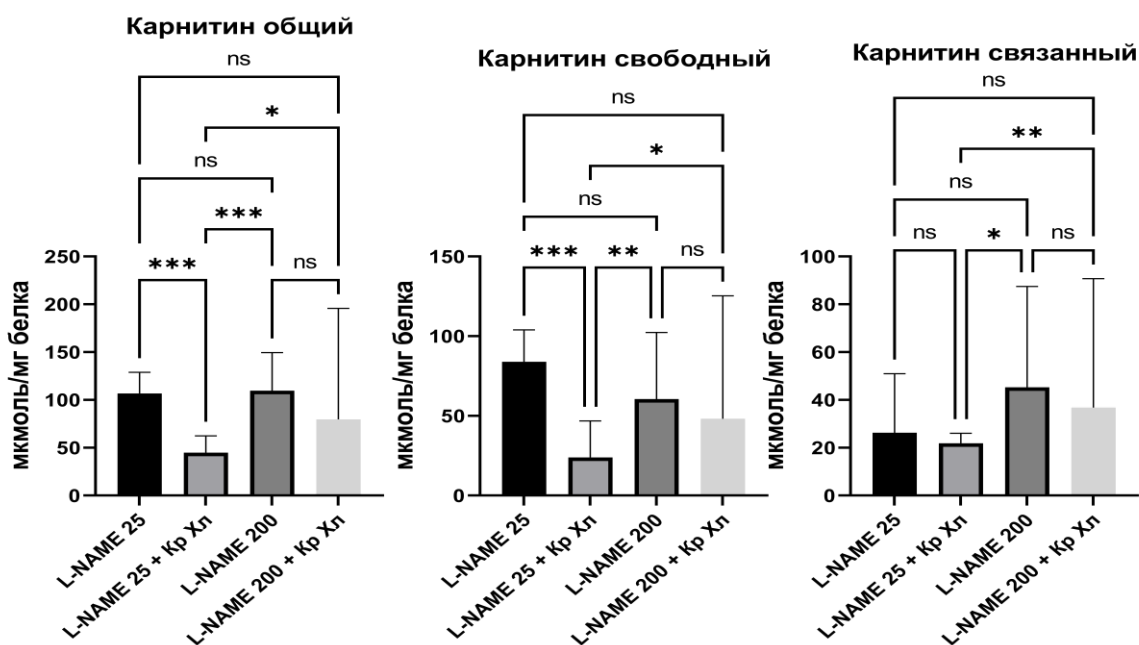


Рисунок 35 – Влияние карнитина хлорида (CrCl) на содержание общего, свободного и связанного карнитина в митохондриях А) головки эпидидимиса В) хвоста эпидидимиса при введении L-NAME, Me [Q1;Q3]

хвоста эпидидимиса при введении L-NAME, Me [Q1;Q3]

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Назначаемый животным карнитина хлорид на фоне ингибирования NO-синтаз предотвращал снижение уровня метаболитов NO и приводил к статистически значимому их повышению в сыворотке крови относительно серии с введением только ингибитора (Рисунок 36), что согласуется с исследованиями других авторов [123, 294].

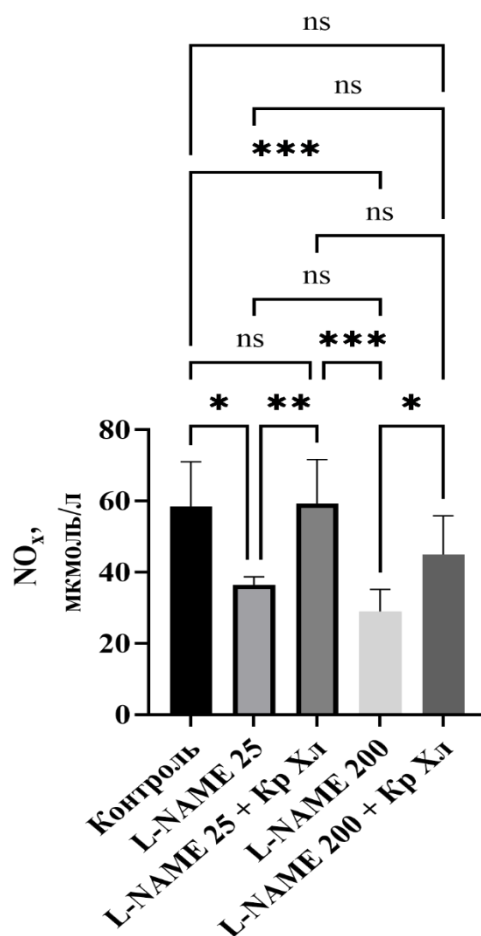


Рисунок 36 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на содержание NO_x в сыворотке крови на фоне введения L-NAME, Me [Q₁;Q₃]

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q₁;Q₃]

При использовании дозы ингибитора - L-NAME 200 мг/кг совместно с карнитина хлоридом этот эффект был статистически значимо более выражен: концентрация метаболитов оксида азота сохранялась на уровне животных

контрольной группы в сыворотке крови, митохондриальной фракции всех исследуемых органов (Рисунок 36,37), а также цитоплазме клеток сердца и головки придатка яичка (Таблица 17). В цитоплазме клеток печени и хвоста эпидидимиса уровень NO_x статистически значимо не изменялся как при назначении одного ингибитора, так и при их совместном введении с карнитина хлоридом.

Таблица 17 – Влияние карнитина хлорида на содержание NO_x в цитоплазме клеток исследуемых органов на фоне введения L-NAME, Me [$Q_1; Q_3$]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг + Карнитина хлорид (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг + Карнитина хлорид (4)
<i>Сердце</i>				
Метаболиты NO , мкмоль/г белка	24,26 [21,74; 30,13]	23,86 [18,41; 26,36] $p_{1-2} = 0,8748$	29,93 [26,75; 26,36]	38,04 [33,55; 43,54]** $p_{3-4} = 0,00094$
<i>Печень</i>				
Метаболиты NO , мкмоль/г белка	20,52 [18,11; 23,58]	19,51 [18,31; 20,38] $p_{1-2} = 0,3720$	18,21 [15,36; 19,11]	18,69 [18,35; 20,66] $p_{3-4} = 0,3720$
<i>Головка эпидидимиса</i>				
Метаболиты NO , мкмоль/г белка	101,00 [93,14; 119,33]	142,48 [130,69; 149,6]* $p_{1-2} = 0,01008$	107,39 [92,92; 116,79]	135,72 [115,89; 141,01]** $p_{3-4} = 0,01358$
<i>Хвост эпидидимиса</i>				
Метаболиты NO , мкмоль/г белка	54,58 [46,33; 62,22]	70,17 [65,01; 78,25]* $p_{1-2} = 0,0054$	50,09 [44,42; 56,54]	51,41 [49,16; 55,88] $p_{3-4} = 0,7131$

Примечание: * - изменения в серии «L-NAME 25 мг/кг» статистически значимы ($p < 0,05$) относительно группы «L-NAME 25 мг/кг+Карнитина хлорид»; ** - изменения в серии «L-NAME 200 мг/кг» статистически значимы ($p < 0,05$) относительно «L-NAME 200 мг/кг + Карнитина хлорид»

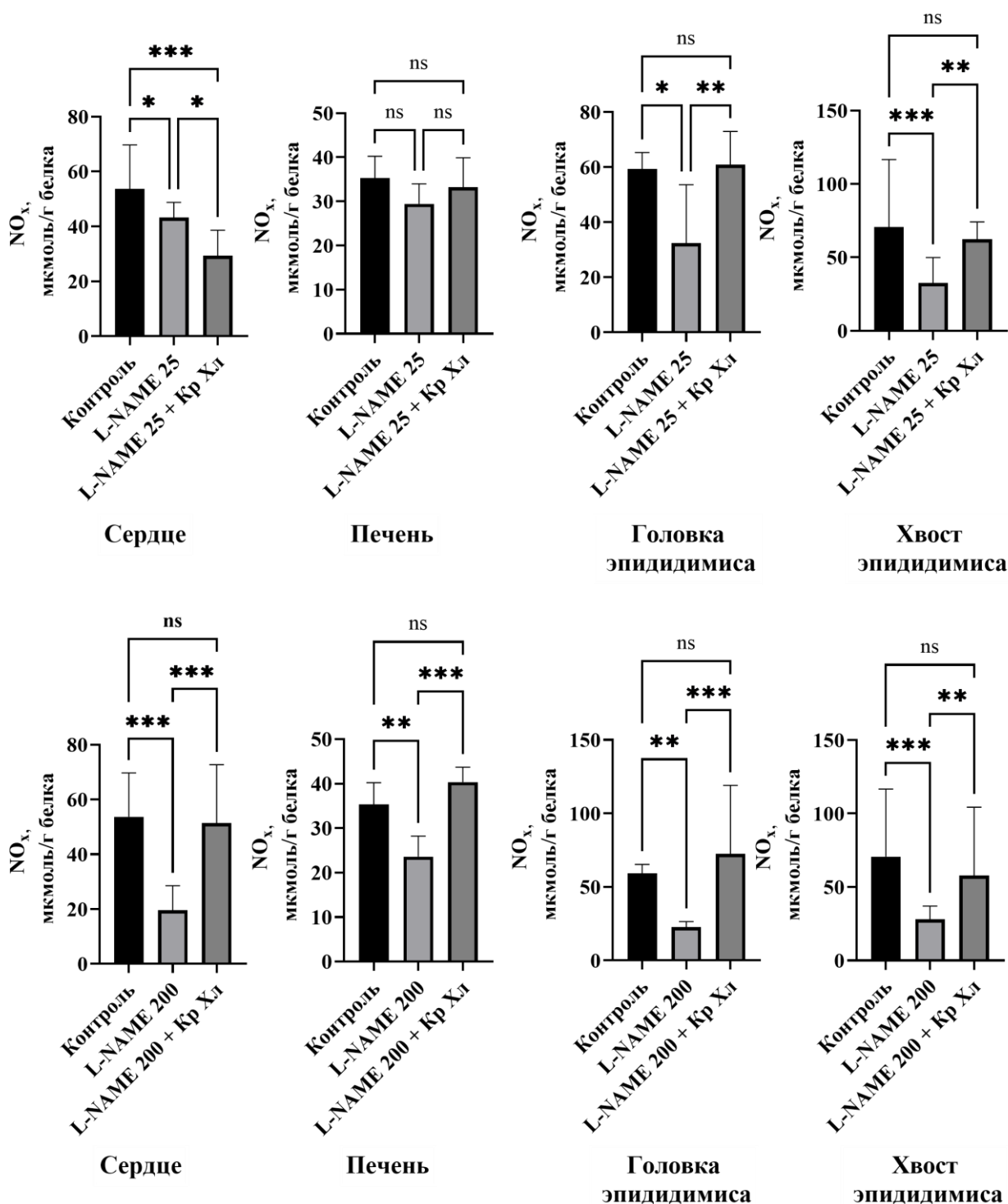


Рисунок 37 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на содержание NO_x в митохондриях исследуемых органов на фоне введения L-NAME, Me [Q₁;Q₃]
Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, **** - различия групп при $p < 0,0001$ символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q₁;Q₃]

Накопление токсичных метаболитов, образующихся в клетке в результате превращения ксенобиотиков, промежуточного обмена аминокислот, накопления аномальных органических кислот и короткоцепочечных эфиров жирных кислот может приводить к развитию ряда патологических состояний, в том числе развитию митохондриальной дисфункции [352]. L-карнитин, в свою очередь, способен связывать токсические метаболиты, образуя производные эфиры с последующим их удалением [352]. При введении L-NAME, под действием специфической эстеразы формируется N^ω-нитро-L-аргинин, который непосредственно конкурирует за активный центр NO-синтазы, снижая генерацию NO. Исходя из полученных результатов можно предположить, что карнитин способствует выведению N^ω-нитро-L-аргинина, уменьшая при этом его конкурентное действие на NO-синтазы.

В работе интересен тот факт, что при моделировании экспериментального дефицита синтеза NO, в дозе L-NAME 25 мг/кг обнаруживалось уменьшение уровня молочной кислоты под влиянием карнитина хлорида в цитоплазме клеток печени и головки эпидидимиса без изменения активности ЛДГ (Таблица 18).

Увеличение дозы L-NAME до 200 мг/кг имело в цитоплазме схожую тенденцию и также приводило к снижению концентрации лактата в клетках сердца, печени и головки эпидидимиса.

В то же время в митохондриальной фракции доза L-NAME 25 мг/кг, назначаемая совместно с карнитином хлоридом, способствовала увеличению содержания молочной кислоты в сердце с одновременным повышением активности ЛДГ (Рисунок 38), головке и хвосте эпидидимиса без одновременного изменения ее активности. Назначение L-NAME в дозе 200 мг/кг одновременно с карнитином хлоридом также вело к увеличению уровня лактата в митохондриях исследуемых органов, в сердце и печени без нарастания активности ЛДГ, в митохондриях головки с сопутствующим ее повышением и хвосте - снижением (Рисунок 39).

Таблица 18 – Влияние карнитина хлорида на активность ЛДГ и содержание лактата в цитоплазме клеток исследуемых органов на фоне введения L-NAME, Me [Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг + Карнитина хлорид (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг + Карнитина хлорид (4)
<i>Сердце</i>				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	315,84 [273,93; 368,32]	239,27 [230,33;284,56] p ₁₋₂ = 0,1035	231,72 [197,62;255,26]	231,76 [198,25;248,79] p ₃₋₄ = 0,7928
Лактат, мкмоль/г белка	8,41 [7,94; 9,34]	7,46 [5,21; 8,19] p ₁₋₂ = 0,08312	11,0 [9,37; 12,98]	6,14 [5,43; 8,39]** p ₃₋₄ = 0,00740
<i>Печень</i>				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	1475,0 [1217,75; 1541,31]	1272,11 [1096,91;1425,3] p ₁₋₂ = 0,1892	982,81 [932,07;1419,38]	1056,6 [956,21;1146,06] p ₃₋₄ = 1,000
Лактат, мкмоль/г белка	10,25 [8,22; 12,19]	6,67 [5,85; 8,46]* p ₁₋₂ = 0,0136	11,0 [9,37; 12,98]	6,51 [4,84; 9,22]** p ₃₋₄ = 0,02394
<i>Головка эпидидимиса</i>				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	131,16 [96,95; 145,85]	127,69 [111,84;143,66] p ₁₋₂ = 0,8748	107,41 [97,62;113,43]	102,82 [72,82;114,98] p ₃₋₄ = 0,7131
Лактат, мкмоль/г белка	40,39 [35,3; 44,05]	27,11 [25,72; 32,21]* p ₁₋₂ = 0,0239	43,44 [37,06; 50,65]	34,29 [26,85; 38,79]** p ₃₋₄ = 0,04902
<i>Хвост эпидидимиса</i>				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	48,74 [43,61; 54,52]	46,75 [40,38; 55,49] p ₁₋₂ = 0,7928	41,44 [37,93;46,09]	45,08 [34,94;53,61] p ₃₋₄ = 0,5635
Лактат, мкмоль/г белка	30,53 [24,9; 36,32]	22,25 [20,11; 26,59] p ₁₋₂ = 0,0831	34,66 [29,56; 37,25]	30,93 [24,11; 32,21] p ₃₋₄ = 0,0831

Примечание: * - изменения в серии «L-NAME 25 мг/кг» статистически значимы (p<0,05) относительно группы «L-NAME 25 мг/кг+Карнитина хлорид»; ** - изменения в серии «L-NAME 200 мг/кг» статистически значимы (p<0,05)относительно «L-NAME 200 мг/кг + Карнитина хлорид»

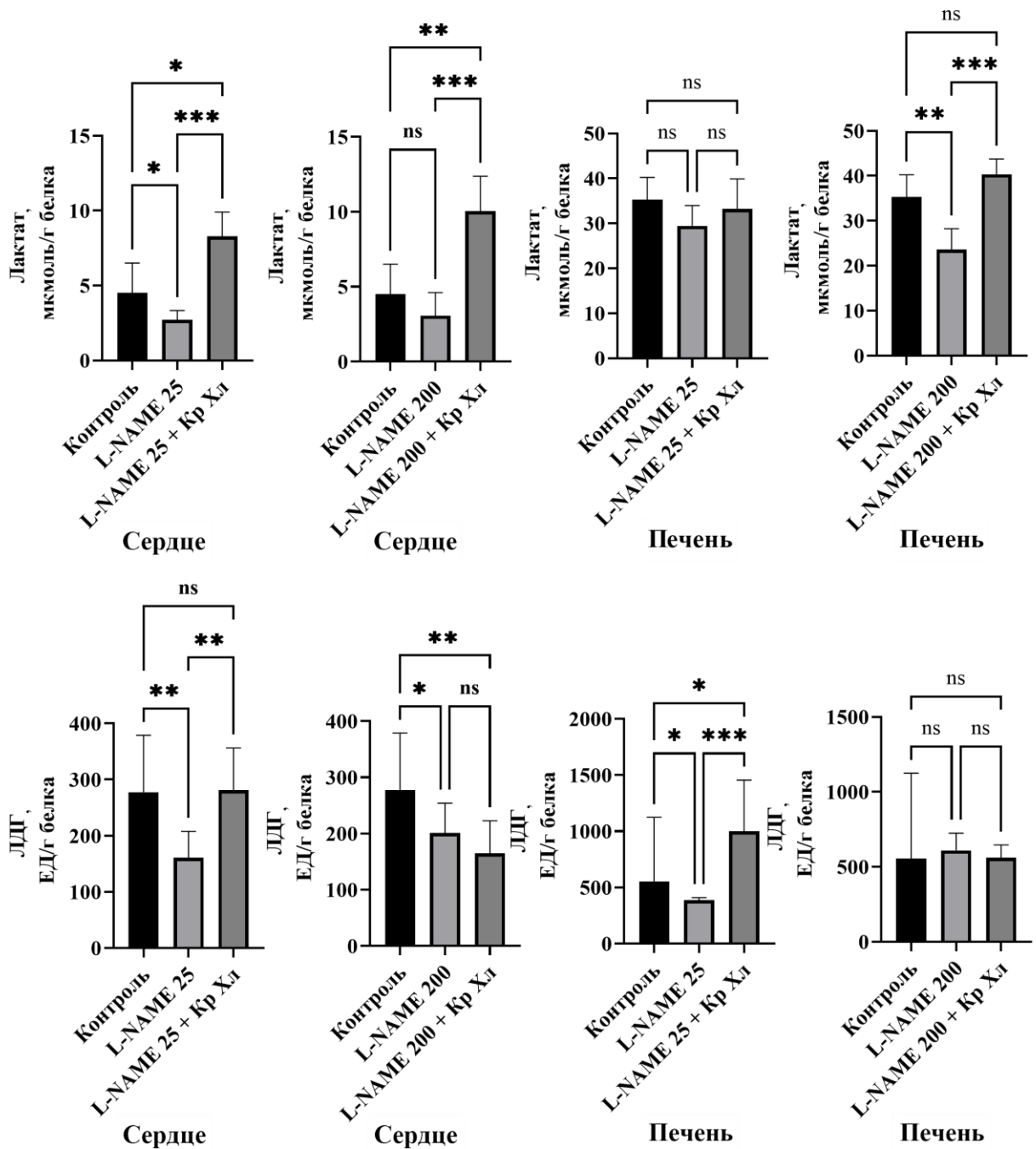


Рисунок 38 – Влияние карнитина хлорида на активность ЛДГ и содержание лактата в митохондриях сердца и печени на фоне введения L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

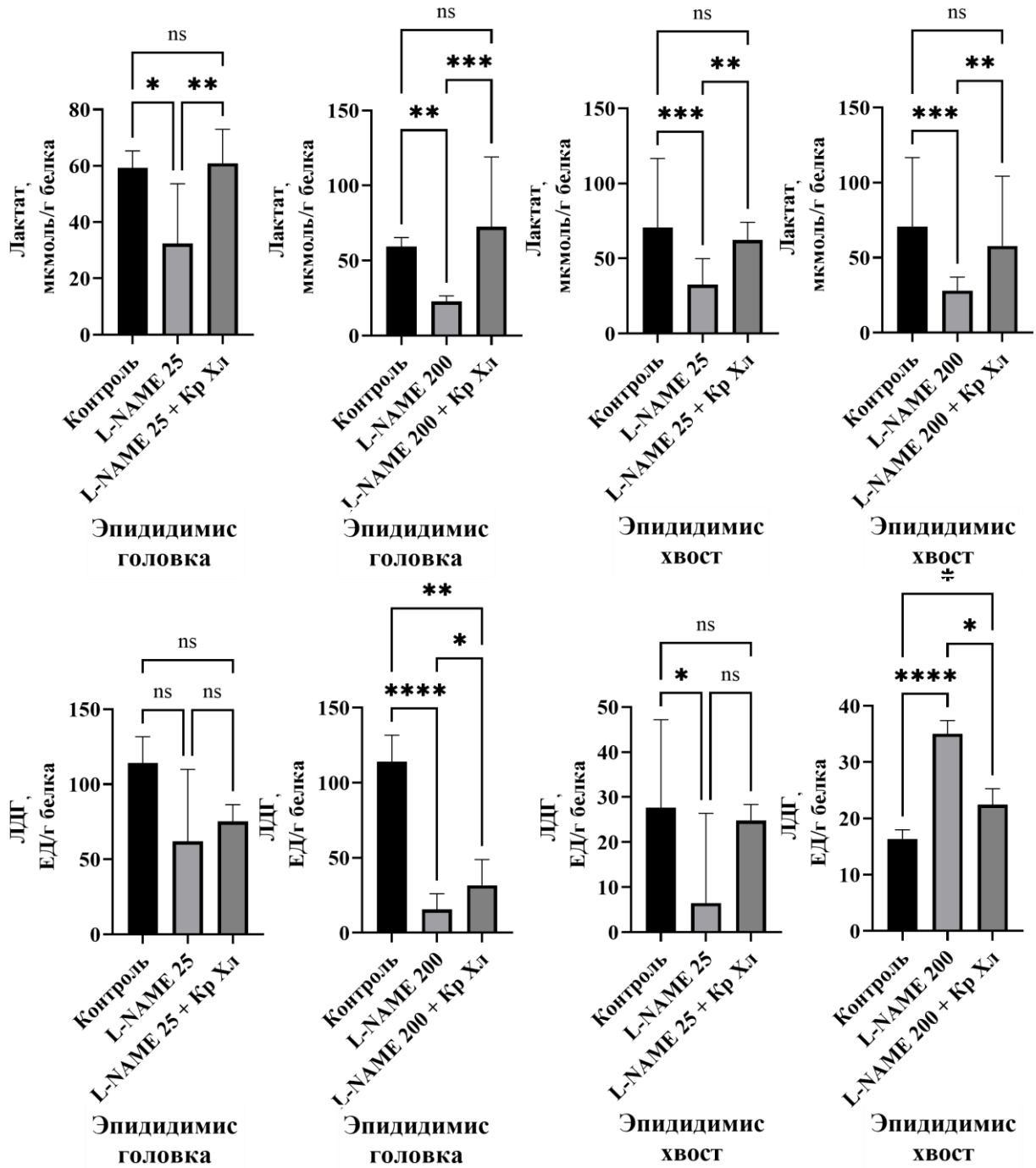


Рисунок 39 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на активность ЛДГ и содержание лактата в митохондриях эпидидимиса на фоне введения L-NAME
Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Карнитина хлорид способствовал повышению активности СДГ на фоне введения L-NAME в дозе 25 мг/кг в митохондриях печени и хвоста эпидидимиса крыс, при дозе L-NAME 200 мг/кг активность данного фермента увеличивалась во всех исследуемых органах (Рисунок 40,41). В митохондриальной фракции эпидидимиса карнитина хлорид увеличивал активность H^+ АТФазы при совместном назначении с L-NAME в обеих дозах, в печени - только при совместном использовании с дозой 200 мг/кг.

Анализ площадей под кривой абсорбции света показал, что назначение карнитина хлорида статистически значимо не повлияло на суммарное изменение количества карбонильных производных относительно группы с изолированным введением L-NAME (Таблица 19), также не отмечалось изменения доли первичных и вторичных маркеров белковой деструкции.

У животных, получавших L-NAME на фоне назначения карнитина хлорида, наблюдались статистически значимые отличия активности митохондриальной СОД от соответствующих групп сравнения. Так, в митохондриальной фракции головки придатка яичка и каудального отдела эпидидимиса при дозе L-NAME 200 мг/кг активность этого фермента была значительно выше, чем у крыс, получавших только ингибитор NO-синтаз. В митохондриях сердца активность СОД статистически значимо не отличалась от серии крыс, получавшей физиологический раствор, а в печени наблюдалось статистически значимое снижение активности митохондриальной СОД относительно крыс, которым вводился только L-NAME.

Оценка резервно-адаптационного потенциала белков митохондрий исследуемых органов показала, что и у животных, получавших L-NAME совместно с карнитином хлоридом, не происходило истощения РАП ОМБ в митохондриях сердца в обеих дозах и хвоста эпидидимиса при дозе L-NAME 200 мг/кг относительно групп, принимавших только ингибитор NO-синтаз, в митохондриях печени и головки эпидидимиса РАП ОМБ статистически значимо не отличался от контроля и группы с L-NAME.

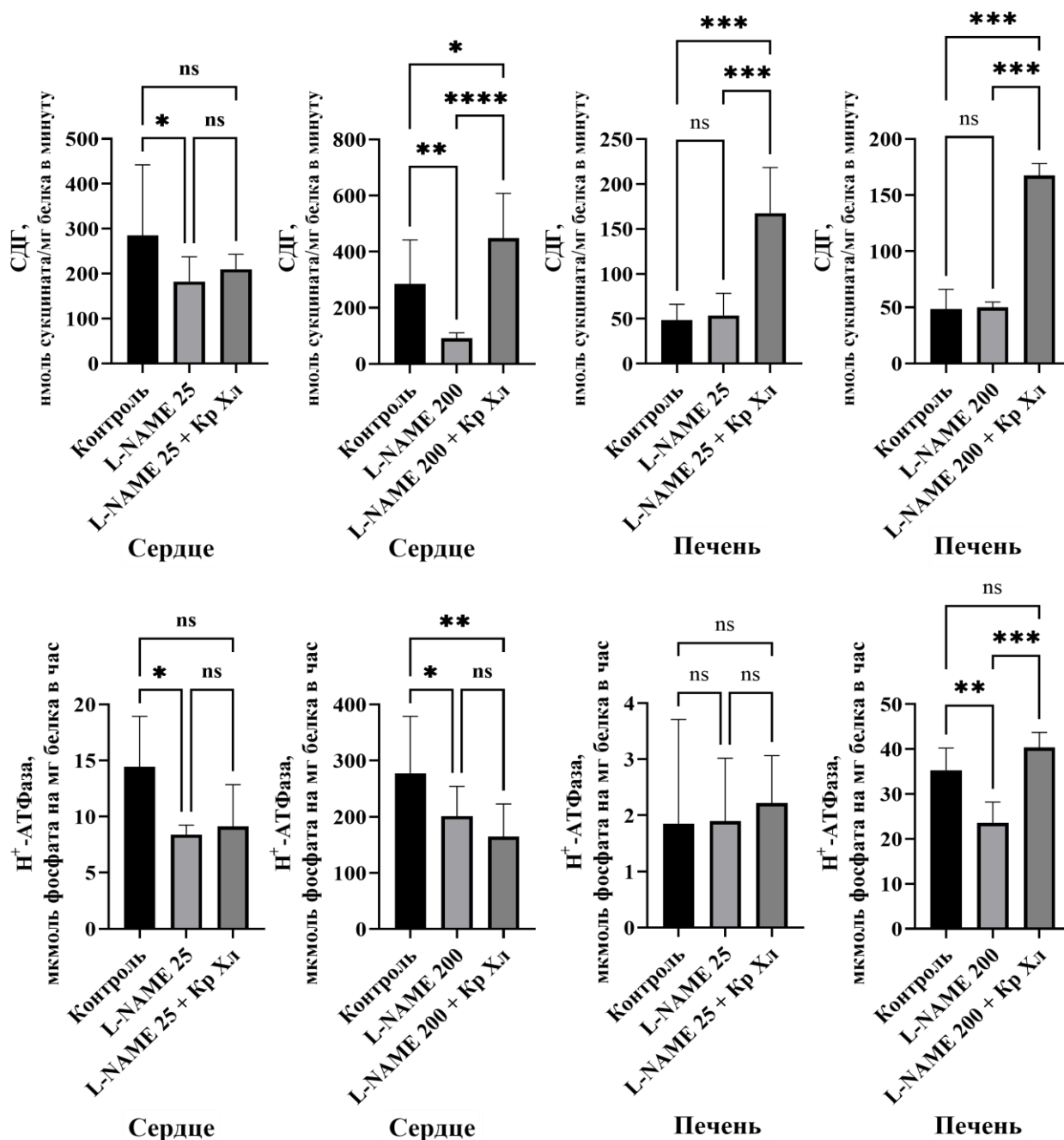


Рисунок 40 – Влияние карнитина хлорида на активность СДГ и Н⁺АТФазы в митохондриях сердца и печени на фоне введения L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

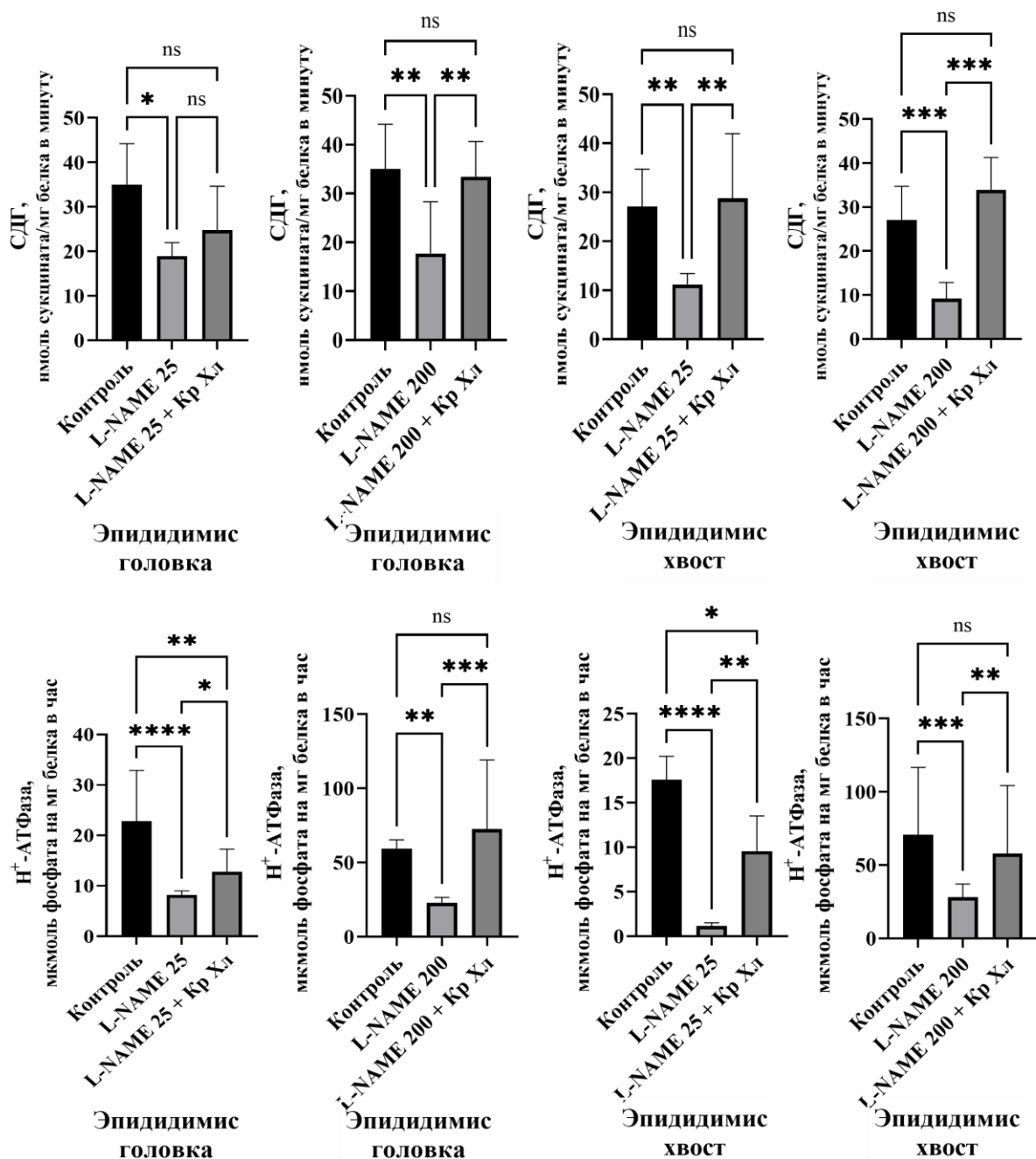


Рисунок 41 – Влияние карнитина хлорида на активность СДГ и Н⁺АТФазы в митохондриях эпидидимисана фоне введения L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Таблица 19 – Влияние карнитина хлорида на биохимические показатели окислительного стресса в митохондриях исследуемых органов на фоне введения L-NAME, Me [Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг +КрХл (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг +КрХл (4)
<i>Митохондрии сердца</i>				
Активность СОД, УЕ/мг белка	2,65 [2,39; 3,63]	2,05 [1,72; 3,08] p ₁₋₂ =0,1892	11,51 [7,54; 13,65]	7,05 [5,12; 12,76] p ₃₋₄ = 0,4308
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	10,08 [8,04; 13,31]	6,53 [4,72; 8,74] p ₁₋₂ = 0,0520	10,02 [8,11; 13,68]	7,69 [4,76; 13,24] p ₃₋₄ = 0,2271
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	77,45 [63,98; 86,64]	40,57 [33,22; 49,22]* p ₁₋₂ = 0,0013	78,20 [55,58;70,41]	51,04 [39,51; 54,91]** p ₃₋₄ = 0,0191
<i>Митохондрии печени</i>				
Активность СОД, УЕ/мг белка	11,91 [9,90; 15,65]	7,44 [5,04; 7,65]* p ₁₋₂ =0,0019	6,03 [4,74; 7,29]	3,03 [2,11; 4,13]** p ₃₋₄ = 0,0053
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	9,55 [7,21; 10,78]	8,97 [5,24; 12,33] p ₁₋₂ = 0,9163	9,17 [8,20; 15,41]	8,62 [6,98; 9,91] p ₃₋₄ = 0,5635
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	53,45 [28,12; 64,78]	57,96 [55,61;61,29] p ₁₋₂ = 0,5635	63,26 [54,19;83,19]	52,27 [43,17; 56,77] p ₃₋₄ = 0,1278
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>				
Активность СОД, УЕ/мг белка	3,8 [1,61; 9,98]	22,28 [9,43;35,20]* p ₁₋₂ =0,0135	6,17 [4,45;8,54]	30,27 [23,21; 34,24]** p ₃₋₄ = 0,00094
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	13,38 [11,7; 14,55]	10,99 [8,74; 15,91] p ₁₋₂ =0,4308	23,36 [13,93; 27,1]	18,31 [13,2; 20,67] p ₃₋₄ =0,1892
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	80,83 [62,22; 95,52]	58,27 [41,87; 68,92] p ₁₋₂ = 0,05208	76,67 [68,41; 86,67]	54,8 [45,4; 72,54] p ₃₋₄ =0,0660
<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>				
Активность СОД, УЕ/мг белка	5,54 [3,99; 10,54]	9,15 [7,84;10,58] p ₁₋₂ =0,1892	5,44 [3,8; 9,08]	28,4 [26,39; 32,61]** p ₃₋₄ = 0,00094
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	9,3 [8,09; 10,34]	7,35 [5,95; 9,82] p ₁₋₂ =0,2781	10,55 [9,15; 12,07]	11,68 [6,2; 13,09] p ₃₋₄ =0,9581

Продолжение Таблицы 19

S OMB, СП/МК (РАП), %	64,36 [52,72; 72,12]	57,59 [24,94; 69,97] p ₁₋₂ = 0,3720	78,93 [75,56; 83,12]	35,39 [28,86; 43,66]** p ₃₋₄ = 0,00136
--------------------------	--------------------------	--	-------------------------	---

Примечание: * - изменения в серии «L-NAME 25 мг/кг» относительно группы «L-NAME 25 мг/кг+Карнитина хлорид»; ** - изменения в серии «L-NAME 200 мг/кг» относительно «L-NAME 200 мг/кг + Карнитина хлорид»

Таким образом, моделирование экспериментального дефицита NO на фоне назначения карнитина хлорида в большинстве исследуемых тканей предупреждает снижение уровня метаболитов NO, а также способствует повышению уровня лактата в митохондриях, что возможно предполагает наличие, метаболической гибкости, связанной с переключением митохондрий на использование лактата в качестве энергосубстрата, в условиях ограниченного использования жирных кислот. Карнитина хлорид при ингибировании NO-синтаз не влияет на суммарное изменение количества карбонильных производных белков, однако предотвращает истощение РАП в митохондриях сердца и хвоста эпидидимиса.

3.2. Изменения функционирования митохондрий при гипергомоцистеинемии

Гомоцистеин - это продукт цикла превращения метионина. Гомоцистеин в высокой концентрации обладает выраженным токсическим действием на клетку. Несмотря на большое количество исследований, изучение механизма его повреждающего действия остается актуальным в настоящее время. Превалирующей точкой зрения является гипотеза об активации окислительного стресса, ведущего к повреждению эндотелия и развитию эндотелиальной дисфункции, проявлением которой является нарушение генерации и биодоступности NO [148, 149]. Поэтому для дальнейшего исследования корректирующего действия L-карнитина, обладающего антиоксидантными свойствами и возможностью повышать уровень метаболитов NO, была выбрана модель тяжелой формы гипергомоцистеинемии.

Модель гипергомоцистеинемии была разработана автором при участии Медведева Д.В. и Фоминой М.А. [19,20].

3.2.1. Характеристика экспериментальной модели

Для подтверждения наличия гипергомоцистеинемии был измерен уровень гомоцистеина в сыворотке крови экспериментальных и контрольных групп самцов крыс. Обнаружено, что модель метиониновой нагрузки приводила к статистически значимому многократному увеличению концентрации гомоцистеина в сыворотке крови относительно группы контроля (ТВИН) (Рисунок 42).

Гипергомоцистеинемия сформировалась в тяжёлой форме при содержании гомоцистеина в сыворотке крови >100 мкмоль/л [17].

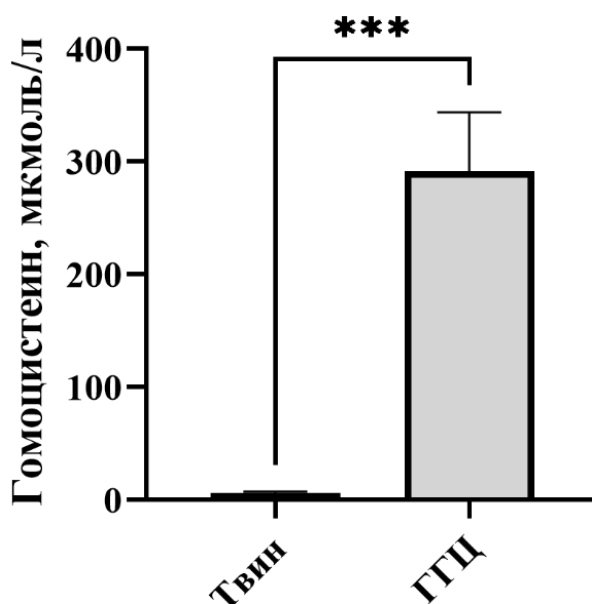


Рисунок 42 – Содержание гомоцистеина в сыворотке крови у животных с гипергомоцистеинемией

Примечание: символом *** отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,001$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

3.2.2. Изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина

У животных с развившейся тяжелой формой гипергомоцистеинемии была измерена концентрация NO_x в сыворотке крови (Рисунок 43), цитоплазме и митохондриях клеток исследуемых органов (Таблица 20).

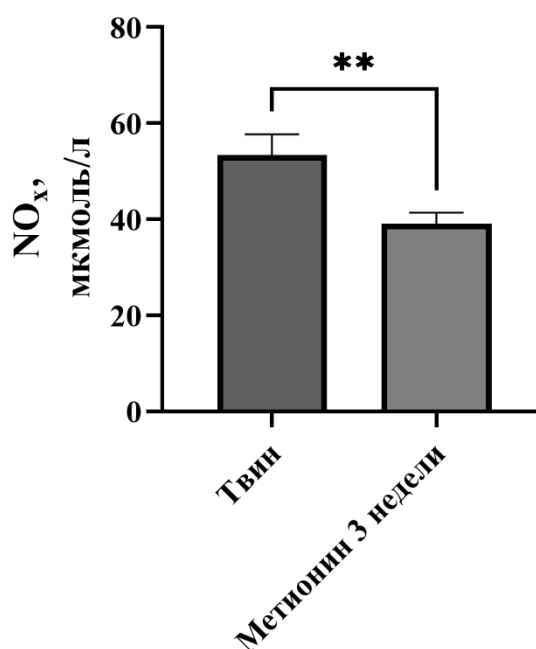


Рисунок 43 – Содержание NO_x в сыворотке крови у животных с гипергомоцистеинемией

Примечание: символом ** отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,01$.

Значения представлены как Me[Q1;Q3]

При гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением животным метионина, было обнаружено снижение суммарной концентрации NO_x в сыворотке крови и субклеточных фракциях сердца, печени, головки эпидидимиса; в хвосте придатка яичка изменения уровня NO_x не выявлено. При этом наблюдаемое снижение содержания NO_x при гипергомоцистеинемии не

сопровождалось статистически значимым изменением экспрессии NO-синтазы I ни в одном из исследуемых органов.

Таблица 20 – Концентрация метаболитов NO_x в клетках тканей крыс при гипергомоцистеинемии, мкмоль/г белка, Me [Q₁; Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
<i>Цитоплазма</i>				
Суспензионная основа (контроль 1)	45,53 [34,0; 53,1]	76,99 [70,04;82,29]	46,19 [36,25; 48,61]	59,84 [57,29;75,57]
Суспензия метионина (ГГЦ)	28,85 [23,95;34,34]* p=0,01008	29,41 [26,94;32,66]* p=0,00094	32,14 [27,25; 34,09]* p=0,00276	59,97 [52,35;66,56] p=0,6365
<i>Митохондрии</i>				
Суспензионная основа (контроль 1)	59,60 [55,34;79,11]	38,03 [34,46; 9,68]	42,29 [37,77; 8,75]	41,79 [30,65; 3,03]
Суспензия метионина (ГГЦ)	44,25 [33,38;56,09]* p=0,02394	27,49 [22,01;30,93]* p=0,01008	31,11 [26,51; 2,32]* p=0,0135	43,2 [83,1; 47,34] p=0,9593

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы ($p < 0,05$) относительно соответствующей контрольной группы

Расчет общей площади под кривой абсорбции света показал, что в группе животных с гипергомоцистеинемией наблюдалось увеличение общего количества карбонильных производных белков нейтрального и основного характера в митохондриях, всех изучаемых органов как за счёт АДНФГ, так и за счёт КДНФГ относительно контрольной группы, получавшей только суспензионную основу (Рисунок 44, 45).

При этом соотношение АДНФГ / КДНФГ в сердце и хвосте придатка яичка статистически значимо не отличалось от группы животных, которым вводили только суспензионную основу. В печени же наблюдалось увеличение содержания первичных маркеров повреждения - АДНФГ, а в головке эпидидимиса возрастала доля кетонов, что могло приводить к агрегации белков, нарушению нативной структуры и более глубокому их повреждению.

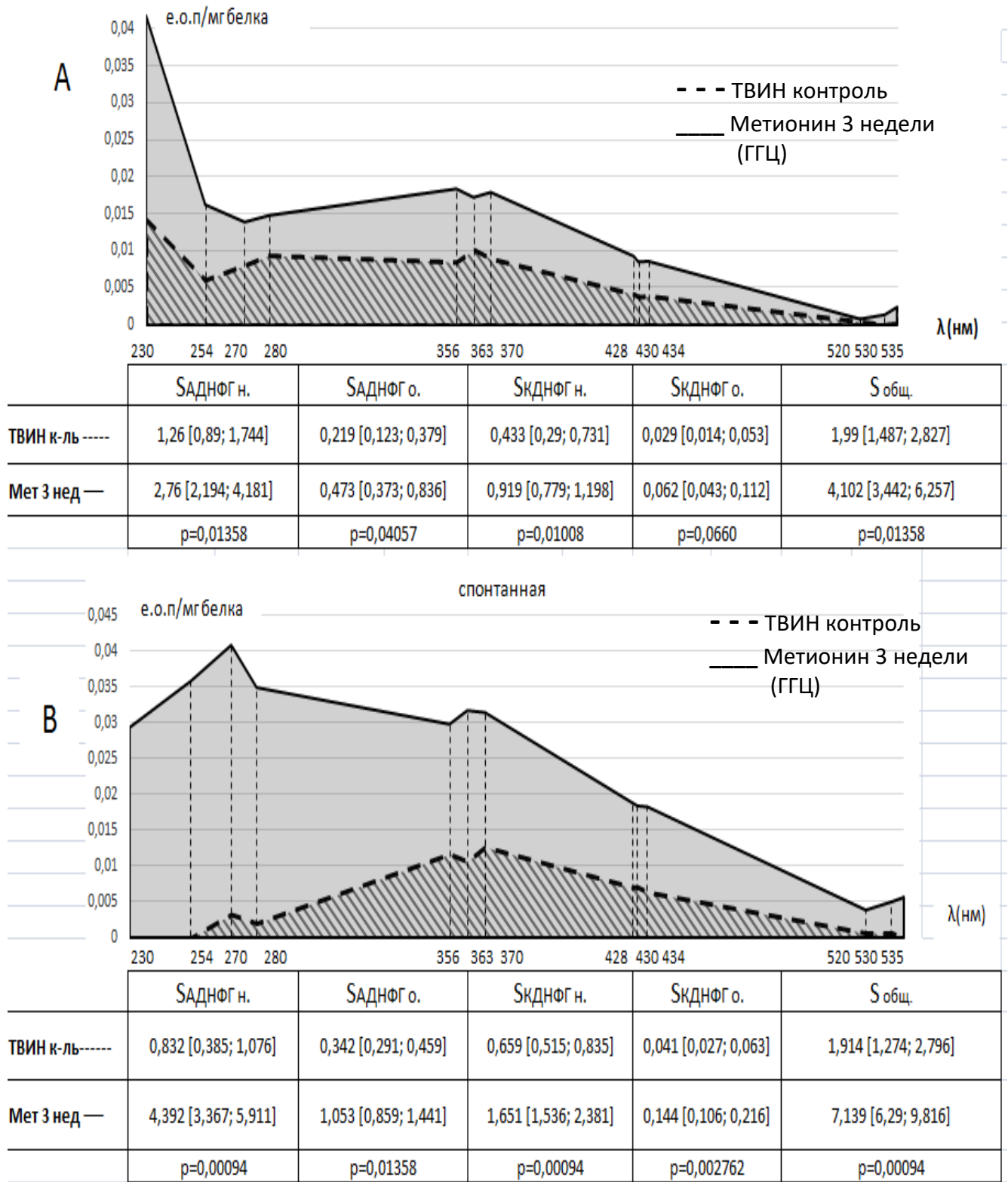


Рисунок 44 – Содержание продуктов ОМБ в митохондриях исследуемых органов крыс при гипергомоцистеинемии:

А - в сердце, В - в печени, е.о.п./мг белка: Ме [Q₁; Q₃]

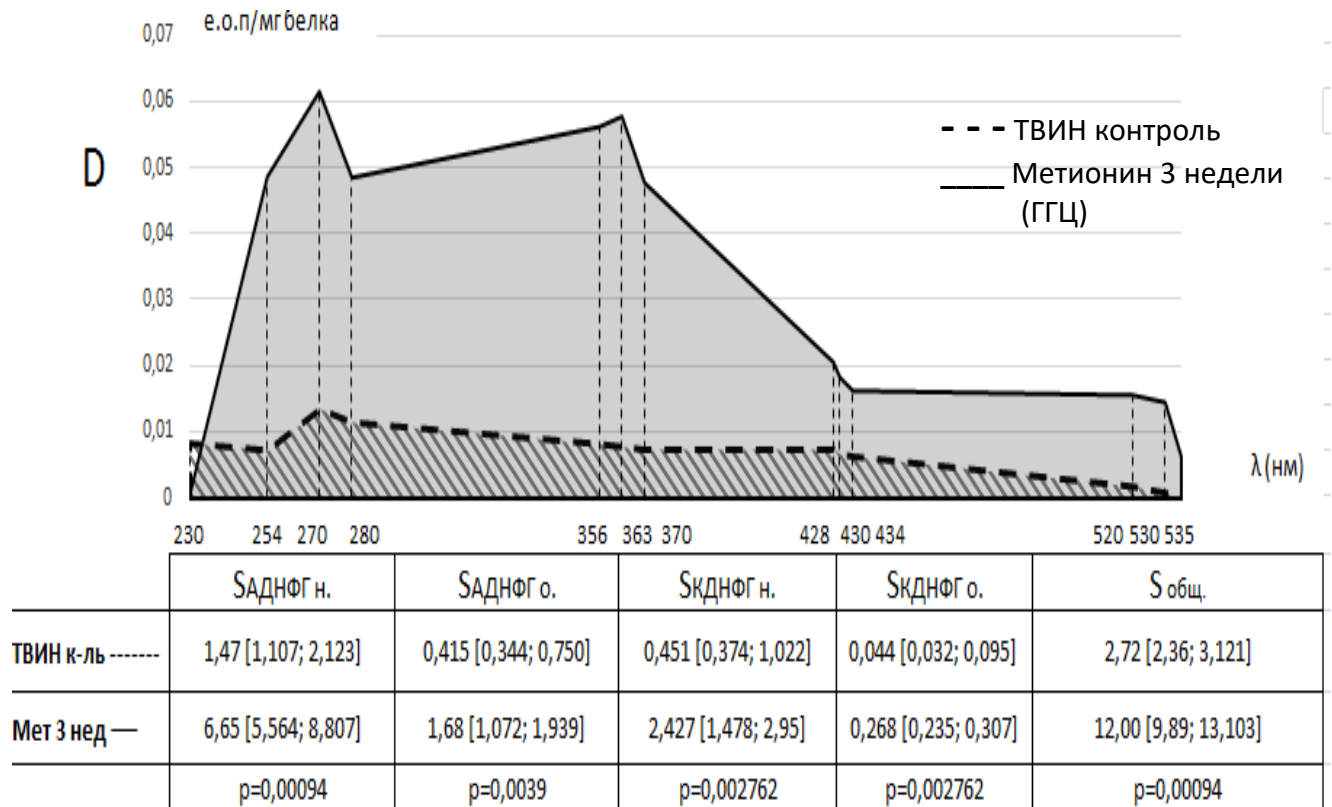
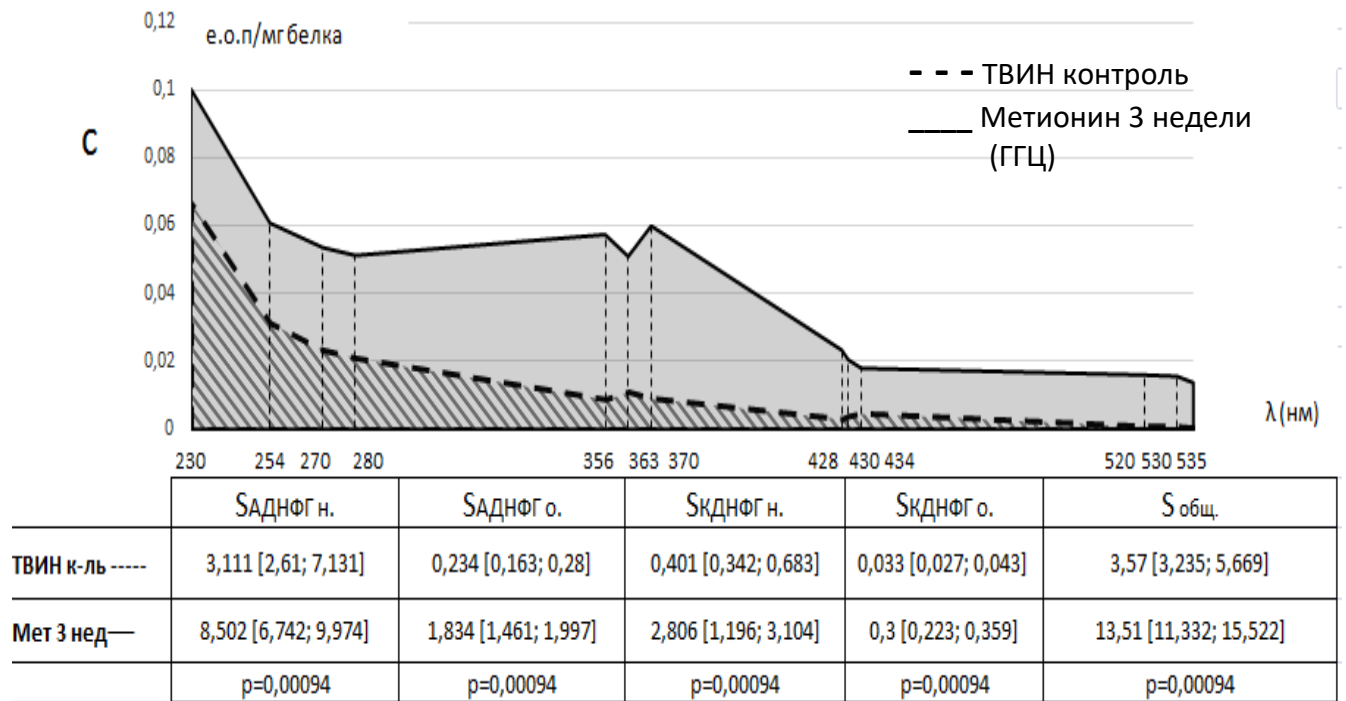


Рисунок 45 – Содержание продуктов ОМБ в митохондриях исследуемых органов крыс при гипергомоцистеинемии: С - в головке придатка яичка и D - в хвосте эпидидимиса, е.о.п/мг белка: Me [Q₁; Q₃]

Помимо этого, выявлено истощение РАП ОМБ митохондрий сердца в 1,69 раза ($p=0,0027$), головки эпидидимиса в 2,37 раза ($p=0,0100$) относительно животных, получавших суспензионную основу (Таблица 21).

Анализ же РАП ОМБ митохондрий печени и хвоста придатка яичка не выявил статистически значимых отличий от уровня контрольных животных, что указывает на большую устойчивость данных тканей к окислительному повреждению белков, вызванных высокой метиониновой нагрузкой.

Таблица 21 – Изменения маркерных показателей окислительного стресса при гипергомоцистеинемии, Ме [Q₁; Q₃]

	Митохондрии сердца		Митохондрии печени	
	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ) (2)	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ) (2)
Активность СОД, УЕ/мг белка	0,42 [0,32; 0,49]	2,37 [0,93; 6,63]* $p_{1-2}=0,0013$	3,05 [2,26; 4,20]	8,78 [6,21; 11,01]* $p_{1-2}=0,0013$
S общ. СП ОМБ, е.о.п. /мг белка	1,99 [1,29; 3,27]	4,1 [3,40; 6,60]* $p_{1-2}=0,0013$	1,91 [1,14; 2,94]	7,14 [6,28; 10,30]* $p_{1-2}=0,0009$
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	40,35 [27,38; 51,86]	68,20 [55,58; 90,41]* $p_{1-2}=0,0027$	31,80 [22,01; 41,83]	46,85 [42,36; 60,37] $p_{1-2}=0,0660$
	Митохондрии головки эпидидимиса		Митохондрии хвоста эпидидимиса	
Активность СОД, УЕ/мг белка	1,73 [1,27; 2,06]	5,65 [3,57; 7,27]* $p_{1-2}=0,0027$	2,71 [1,90; 2,96]	9,09 [6,85; 10,80]* $p_{1-2}=0,0013$
S общ. СП ОМБ, е.о.п. /мг белка	3,56 [3,04; 5,67]	13,52 [11,31; 16,30]* $p_{1-2}=0,0010$	2,72 [2,37; 3,12]	12,00 [9,00; 13,22]* $p_{1-2}=0,0009$
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	34,01 [30,45; 42,10]	80,69 [70,56; 90,38]* $p_{1-2}=0,0010$	42,60 [22,38; 51,05]	46,79 [44,26; 55,22] $P=0,1893$

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы при $p<0,05$

Одновременно с повышенной продукцией АФК наблюдалось усиление антиоксидантной защиты: активность общей митохондриальной СОД возрастала: в сердце в 5,6 раза ($p=0,0013$), в печени в 2,87 ($p=0,0013$), в головке в 3,26 ($p=0,0027$) и хвосте – в 3,35 раза ($p=0,0013$).

Следует отметить, что при анализе зависимости показателей содержания продуктов окислительной модификации белков в головке и хвосте придатка яичка от концентрации гомоцистеина в сыворотке крови, выявлены статистически значимые прямые корреляционные связи (Рисунок 46), что предполагает наличие у гомоцистеина прооксидантных свойств в отношении протеинов эпидидимиса.

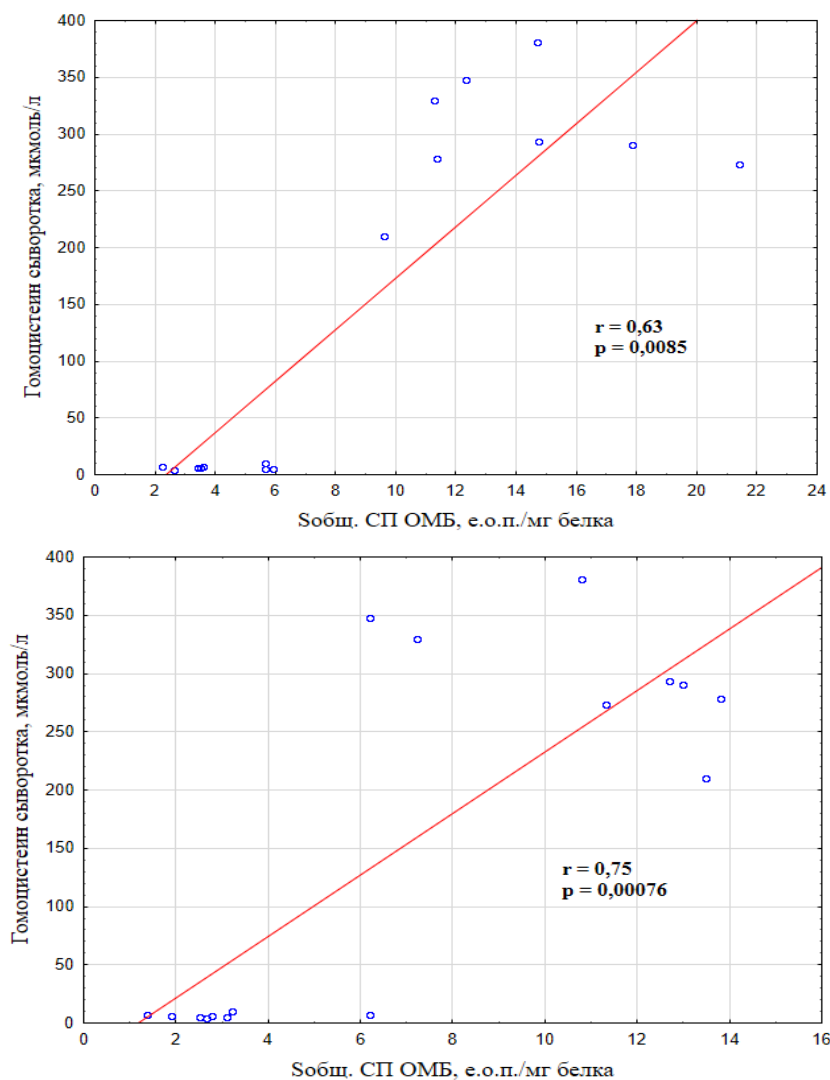


Рисунок 46 – Зависимость общего содержания продуктов ОМБ в митохондриальной фракции А – головки эпидидимиса, В – хвоста эпидидимиса от уровня гипергомоцистеина в сыворотке крови

Обнаруженные изменения согласуются с представлениями о возможности гипергомоцистеинемии изменять структуру и функцию белков, а также являться предиктором для развития ряда заболеваний, в том числе нарушений мужской репродуктивной системы [156, 160, 317].

Состояние энергетического обмена тканей сердца, печени и придатка яичка в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии у животных отражено в Таблицах 22,23.

Таблица 22 – Изменения биохимических показателей сердца и печени крыс при гипергомоцистеинемии, Ме [Q₁; Q₃]

	<i>Цитоплазма клеток сердца</i>		<i>Цитоплазма клеток печени</i>	
	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ) (2)	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ) (2)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	460,88 [422,69; 502,83]	471,67 [264,26; 593,04] p ₁₋₂ =0,9567	1292,51 [1168,76; 1363,15]	982,76 [960,49; 1124,96]* p ₁₋₂ =0,0108
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	6,70 [5,80; 7,52]	8,76 [7,59; 12,91]* p ₁₋₂ =0,0181	9,59 [8,24; 11,76]	8,96 [7,38; 11,10] p ₁₋₂ =0,4308
	<i>Митохондрии сердца</i>		<i>Митохондрии печени</i>	
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	276,12 [235,26; 298,63]	109,02 [69,19; 191,42]* p ₁₋₂ =0,01358	39,69 [26,54; 51,13]	82,46 [63,90; 98,33]* p ₁₋₂ =0,01813
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	13,90 [12,05; 15,30]	12,35 [10,05; 14,73] p ₁₋₂ =1,000	2,26 [1,66; 2,67]	3,77 [2,62; 5,35]* p ₁₋₂ =0,02394
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	226,77 [215,01; 308,24]	408,54 [330,07; 434,12]* p ₁₋₂ =0,0194	639,38 [606,02; 724,99]	1041,99 [976,38; 1456,56]* p ₁₋₂ =0,0043
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	4,01 [3,06; 5,7]	10,91 [7,68; 12,29]* p ₁₋₂ =0,0112	18,31 [16,32; 21,41]	19,03 [15,76; 21,97] p ₁₋₂ =0,9581

Примечание:* - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы (p<0,05)

Таблица 23 – Изменения биохимических показателей эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, Me [Q₁; Q₃]

	<i>Цитоплазма клеток головки эпидидимиса</i>		<i>Цитоплазма клеток хвоста эпидидимиса</i>	
	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ)	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ)
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	169,90 [158,14; 182,83]	135,83 [118,95; 142,54]* p ₁₋₂ =0,0074	61,85 [51,76; 71,66]	62,62 [57,76; 66,58] p ₁₋₂ =0,4948
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	21,25 [16,15; 24,40]	32,69 [24,92; 36,44]* p ₁₋₂ =0,041	23,74 [19,30; 25,74]	27,15 [24,89; 31,13]* p ₁₋₂ =0,4902
	<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>		<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>	
	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ)	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (ГГЦ)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	70,30 [32,72; 93,09]	20,79 [11,15; 24,44]* p ₁₋₂ =0,0054	56,38 [39,34; 93,56]	14,77 [10,03; 21,48]* p ₁₋₂ =0,0054
Активность Н ⁺ -АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	26,23 [21,43; 44,40]	14,77 [11,51; 18,58]* p ₁₋₂ =0,001	20,13 [15,58; 27,18]	9,52 [6,90; 11,13]* p ₁₋₂ =0,0014
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	33,04 [25,53; 36,73]	19,19 [13,27; 25,57]* p ₁₋₂ =0,0136	21,09 [13,03; 27,48]	15,58 [12,97; 17,92] p ₁₋₂ =0,2701
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	11,21 [10,30; 16,55]	29,60 [25,40; 31,17]* p ₁₋₂ =0,001	10,94 [8,07; 16,45]	38,15 [27,41; 43,09]* p ₁₋₂ =0,001

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы при p<0,05

В условиях развившейся тяжелой формы гипергомоцистеинемии у животных отмечалось снижение активности СДГ в митохондриях сердца и обоих отделов эпидидимиса. Активность Н⁺-АТФазы статистически значимо уменьшалась в головке и хвосте эпидидимиса. Данные изменения сопровождалось увеличением концентрации лактата как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток всех исследуемых органов, за исключением печени.

Образование лактата ранее считалось тупиковым путем метаболизма, но, исследования последних лет продемонстрировали, что межклеточный транспорт лактата осуществляется через систему челночных белков монокарбоксилатного транспортера (МСТ) и при этом превращение лактата в пируват и из пирувата в лактат регулируется специфическими изоформами лактатдегидрогеназы, образуя тем самым высоко адаптируемую метаболическую промежуточную систему [82]. Увеличение концентрации лактата может служить реакцией активации сигнальных систем организма в ответ на токсическое действие избыточно образующегося гомоцистеина.

Активность ЛДГ статистически значимо снижалась в цитоплазме и митохондриях клеток головки придатка яичка, в кардиомиоцитах - активность данного фермента повышалась в митохондриях, без статистически значимого изменения ее в цитоплазме.

На фоне вышеописанных сдвигов большой интерес представляют зафиксированные изменения показателей ферментов митохондрий печени. В отличие от сердца и эпидидимиса, активность СДГ и H^+ -АТФазы в условиях гипергомоцистеинемии в митохондриях данного органа возрастала в 2,1 ($p=0,0181$) и 1,7 раза ($p=0,0239$), соответственно, относительно уровня контрольных животных. Также обнаружено увеличение активности митохондриальной ЛДГ и снижение ее активности в цитоплазме клеток без статистически значимого изменения уровня лактата в обеих субклеточных фракциях.

Данные результаты свидетельствуют о преобладании в гепатоцитах гликолитического окисления в качестве источника энергии в условиях гипергомоцистеинемии.

Так как печень является основным органом, который координирует метаболическую гибкость всего организма, характеризующуюся способностью динамически адаптироваться в ответ на колебания потребностей и поставок энергии. Печень является одним из самых богатых органов с точки зрения количества митохондрий, можно предполагать, что избыточное поступление в организм метионина приводило к активизации процессов трансаминирования и

образованию кетокислот, являющихся промежуточными продуктами для цикла лимонной кислоты. Особенность гепатоцеллюлярного цикла Кребса как раз заключается в том, что активность анаэробных и неокислительных катаболических путей, необходимых для глюконеогенеза, липогенеза и уреагеноза в несколько раз выше, чем в других органах [291].

Таким образом, гипергомоцистеинемия, вызванная длительной метиониновой нагрузкой приводит к уменьшению содержания NO_x в сыворотке крови, субклеточных фракциях сердца, печени, головки эпидидимиса, способствует развитию окислительного стресса в митохондриях, выражающегося в увеличении количества карбонильных производных аминокислотных остатков в белках митохондрий сердца, печени и эпидидимиса крыс. При этом на фоне усиления ОМБ наблюдается повышение активности антиоксидантного фермента - СОД. Нарушение редокс-регуляции в условиях окислительного дистресса сопровождается снижением активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки: СДГ - в сердце и эпидидимисе, а также H^+ -АТФазы - в головке и хвосте эпидидимиса, причем в преобладающей степени митохондриальная дисфункция выражена в митохондриях сердца и головке придатка яичка, в то же время наибольшие адаптационные возможности отмечаются в печени и хвосте эпидидимиса.

3.2.3. Воздействие L-аргинина на биохимические показатели сыворотки крови, цитоплазмы и митохондрий клеток сердца, печени и эпидидимиса в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии

Введение L-аргинина, как донора NO, крысам на фоне моделирования гипергомоцистеинемии приводило к меньшему повышению концентрации сывороточного гомоцистеина относительно модели животных с гипергомоцистеинемией (Рисунок 47).

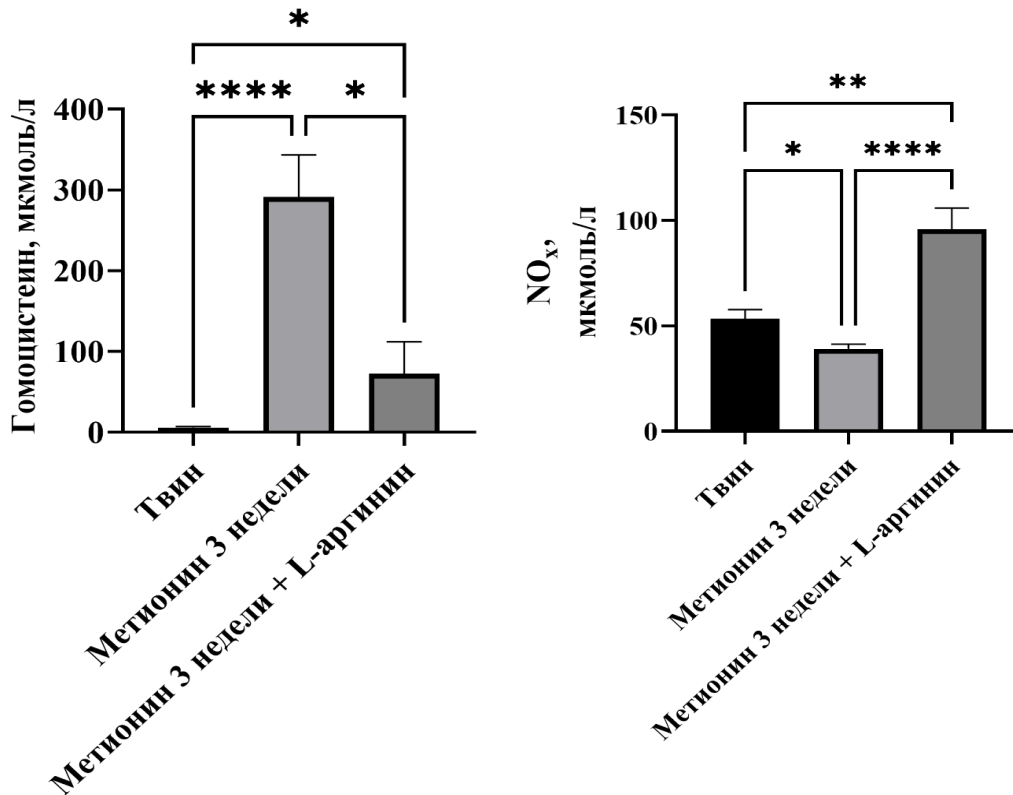


Рисунок 47 – Концентрация гомоцистеина и NO_x в сыворотке крови исследуемых групп животных

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, **** при $p < 0,0001$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Также наблюдалось увеличение уровня метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови в 2,7 раза ($p=0,0009$) по сравнению с животными, которым вводили суспензию метионина и в 1,8 раз $p=(0,0013)$ относительно уровня контроля; в цитоплазме клеток сердца содержание NO_x на фоне назначения L-аргинина повышалось в 1,7 раза ($p=0,0009$), печени – 1,5 раза ($p=0,0135$), головки эпидидимиса – 1,8 раза ($p=0,0054$); в митохондриях печени – в 1,7 раза ($p=0,0054$) и головки эпидидимиса – в 1,8 раза ($p=0,0009$) (Таблица 24). В цитоплазме и митохондриях клеток хвоста придатка яичка статистически значимых изменений содержания метаболитов NO не выявлено, как и в митохондриях кардиомиоцитов.

Таблица 24 – Влияние L-аргинина на уровень NO_x в тканях крыс при гипергомоцистеинемии, мкмоль/г белка: Ме [Q₁; Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
<i>Цитоплазма</i>				
Контроль ТВИН (1)	45,53 [34,0; 53,1]	76,99 [70,04; 82,29]	46,19 [36,25; 48,61]	59,84 [57,29; 75,57]
Метионин 3 недели (2)	28,85 [23,95; 34,34]* p ₁₋₂ =0,01008	29,41 [26,94; 32,66]* p ₁₋₂ =0,00094	32,14 [27,25; 34,09]* p ₁₋₂ =0,00276	59,97 [52,35; 66,56] p ₁₋₂ =0,6365
Метионин 3 недели + L-аргинин (3)	48,94 [29,23; 41,87]** p ₂₋₃ =0,0009 p ₁₋₃ =0,2714	44,13 [40,34; 52,0]** p ₂₋₃ =0,0135 p ₁₋₃ =0,0100	56,98 [49,63; 61,24]** p ₂₋₃ =0,0054 p ₁₋₃ =0,0405	70,55 [66,85; 75,65] p ₂₋₃ =0,0660 p ₁₋₃ =0,4308
<i>Митохондрии</i>				
Контроль ТВИН (1)	61,73 [55,17; 80,42]	37,77 [35,46; 40,78]	43,23 [37,48; 47,99]	41,79 [30,65; 53,03]
Метионин 3 недели (2)	44,25 [33,38; 56,09] p ₁₋₂ =0,02394	27,49 [22,01; 30,93] p=0,02313	31,11 [26,51; 32,32]* p ₁₋₂ =0,0038	43,2 [83,1; 47,34] p ₁₋₂ =0,9593
Метионин 3 недели + L-аргинин (3)	56,59 [44,60; 63,18] p ₂₋₃ =0,5373 p ₁₋₃ =0,6477	47,41 [41,64; 51,61]** p ₂₋₃ =0,0054 p ₁₋₃ =0,6477	56,87 [52,87; 65,89]** p ₂₋₃ =0,0009 p ₁₋₃ =0,0027	56,53 [56,53; 58,02] p ₂₋₃ =0,0399 p ₁₋₃ =0,0486

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони ($p < 0,017$) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы ($p < 0,017$) относительно «Метионин 3 недели + L-Аргинин»

При назначении L-аргинина на фоне гипергомоцистеинемии отмечалось статистически значимое уменьшение продуктов ОМБ в печени и обоих исследуемых отделах эпидидимиса (Таблица 25). В митохондриях сердца степень окисления белков статистически значимо не отличалась от серии ГГЦ, но назначение L-аргинина в тканях сердца и эпидидимиса предотвращало истощение РАП ОМБ.

Таблица 25 – Влияние L-аргинина на степень окисления белков и активности фермента антиоксидантной защиты СОД в тканях крыс при гипергомоцистеинемии, Me[Q₁;Q₃]

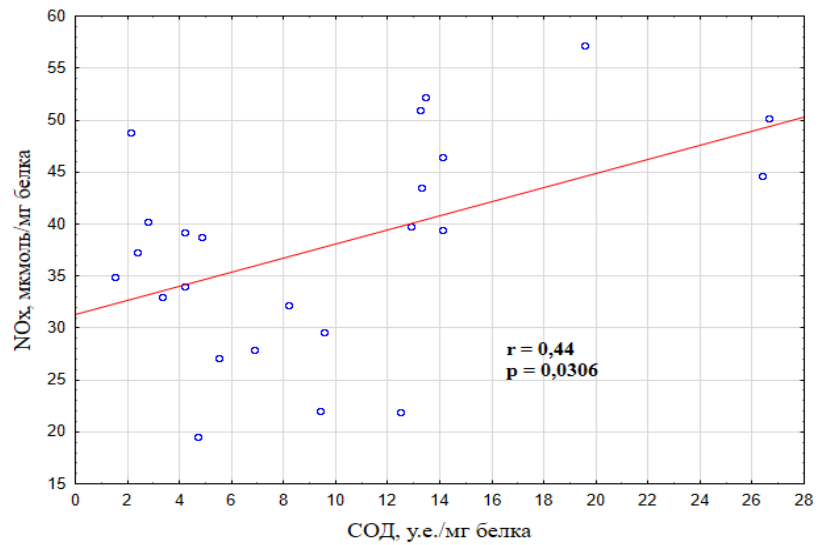
Показатели/ Группы	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (2)	Метионин 3 недели + L-аргинин (3)
<i>Митохондрии сердца</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	0,43 [0,32; 0,49]	2,36 [0,92; 6,63]* p ₁₋₂ =0,0019	4,95 [4,09; 5,88] p ₁₋₃ =0,0006; p ₂₋₃ =0,2701
S общ.СП ОМБ, е.о.п на мг белка	1,76[1,26; 3,33]	4,10 [3,40; 6,60]* p ₁₋₂ =0,0136	4,40 [3,44; 7,79] p ₁₋₃ =0,01002; p ₂₋₃ =1,000
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	40,35 [27,37; 51,86]	68,20 [55,58; 90,41]* p ₁₋₂ =0,0009	38,93 [33,15; 53,95]** p ₁₋₃ =1,000; p ₂₋₃ =0,0136
<i>Митохондрии печени</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	3,13 [2,22; 4,37]	8,78 [6,21; 11,01]* p ₁₋₂ =0,0136	13,75 [13,27; 22,99]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0053
S ОМБ, СП ОМБ, е.о.п на мг белка	1,99[1,14; 2,93]	7,14 [6,28; 10,30]* p ₁₋₂ =0,0009	3,14 [2,61; 3,83]** p ₁₋₃ =0,0523; p ₂₋₃ =0,0136
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	31,80 [22,01; 41,83]	46,85 [42,36; 60,37] p ₁₋₂ =0,1683	35,09 [17,05; 50,55] p ₁₋₃ =1,000; p ₂₋₃ =0,6092
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	1,73 [1,27; 2,06]	5,65 [3,57;7,27]* p ₁₋₂ =0,0009	12,71 [9,61; 15,33]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0019
S ОМБ, СП ОМБ, е.о.п на мг белка	3,56 [3,03; 5,67]	13,51 [11,31; 16,30]* p ₁₋₂ =0,0009	5,57 [3,47; 6,06]** p ₁₋₃ =0,3720; p ₂₋₃ =0,0009
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	34,00 [30,45; 42,10]	80,69 [70,56; 90,12]* p ₁₋₂ =0,0009	38,95 [29,16; 60,51]** p ₁₋₃ =0,5635; p ₂₋₃ =0,0009
<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	2,71 [1,90; 2,96]	9,09 [6,85;10,80]* p ₁₋₂ =0,0074	16,23 [12,60; 21,45]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0074
S ОМБ, СП ОМБ, е.о.п на мг белка	2,71[2,20; 3,15]	12,00 [9,00; 13,22]* p ₁₋₂ =0,0009	4,53 [3,29; 5,68]** p ₁₋₃ =0,0520; p ₂₋₃ =0,0019
S ОМБ, СП/МК (РАП, %)	42,60 [22,38; 51,05]	46,97 [44,26; 55,22] p ₁₋₂ =0,1892	14,50[10,23; 27,83]** p ₁₋₃ =0,04057; p ₂₋₃ =0,0074

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони (p<0,017) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы (p<0,017) относительно «Метионин 3 недели +L-Аргинин»

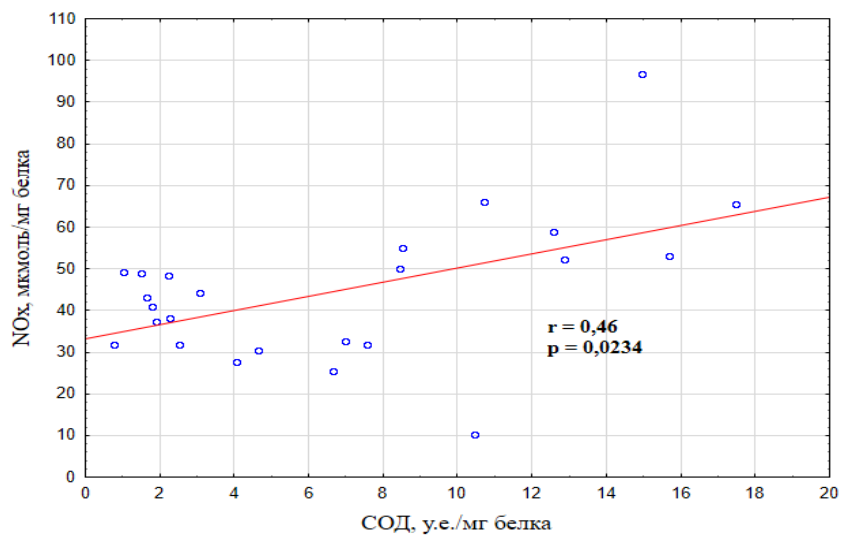
Интересен тот факт, что при назначении L-аргинина здоровым крысам, отмечалось снижение активности митохондриальной СОД во всех исследуемых органах, кроме сердца (Таблица 6). При введении L-аргинина на фоне гипергомоцистеинемии имело место, выраженное статистически значимое увеличение активности данного фермента относительно серии с гипергомоцистеинемией в митохондриях печени и эпидидимиса; в митохондриях сердца активность фермента под влиянием L- аргинина статистически значимо не изменялась (Таблица 25).

Определение зависимости показателей метаболитов NO и активности СОД в митохондриальной фракции показало наличие прямых умеренных статистически значимых корреляционных связей между данными показателями в тканях печени и эпидидимиса (Рисунок 48).

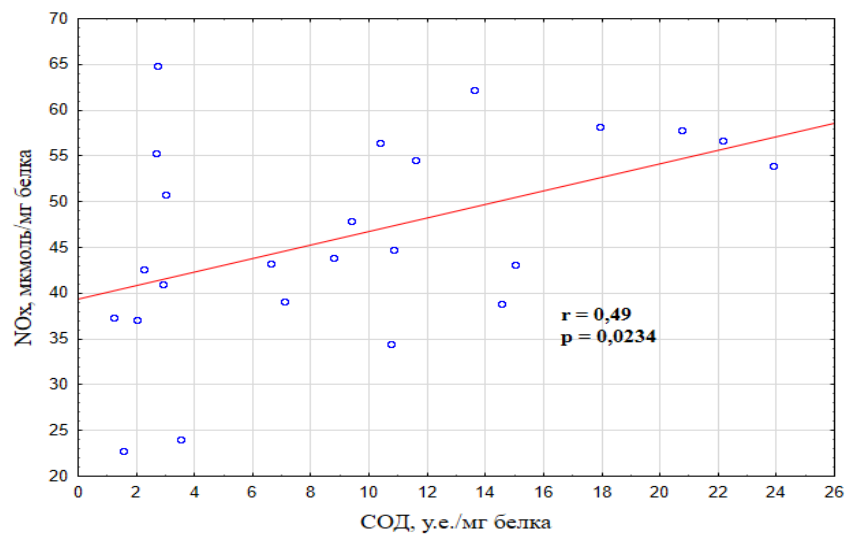
И хотя L-аргинин обладает прямым антиоксидантным действием [183], не исключено, что в данном случае его антиоксидантное свойство связано с увеличением продукции NO и его последующим взаимодействием со свободными радикалами. Такое антиоксидантное свойство NO может быть связано с формированием, в том числе в митохондриях, динитрозильных комплексов железа [109]. Известно, что эти комплексы NO эффективно ингибируют процессы свободнорадикального окисления и окислительной модификации биополимеров [7,109, 265]. Вместе с тем, при взаимодействии супероксидного радикала с NO продуцируется очень сильный окислитель – пероксинитрит, что в условиях окислительного стресса может приводить к усилению экспрессии СОД [7,109, 265] .



A



B



C

Рисунок 48 – Зависимость активности СОД от концентрации NO_x в митохондриальной фракции ткани А) печени В) головки эпидидимиса С) хвоста эпидидимиса

Предполагаемый механизм снижения концентрации гомоцистеина и повышение уровня метаболитов NO под воздействием L-аргинина можно описать следующим образом: при длительном введении метионина (донора метильных групп) создаются условия усиленного образования диметиларгининов (АДМА, СДМА), которые, с одной стороны, способны ингибировать клеточное поглощение L-аргинина при участии катионных транспортеров (CAT) [346], за счет чего, предположительно, концентрация метаболитов NO в сыворотке крови возрастает более выражено, чем в митохондриях органов. С другой стороны, диметиларгинины (в первую очередь АДМА) являются ингибиторами NO-синтазы, что способствует ее разобщению. Этот процесс сопровождается интенсификацией образования АФК, что подтверждается увеличением образования карбонильных производных белков, и, за счет чего, возможно, мы наблюдаем более значительное повышение активности митохондриальной СОД, фермента антиоксидантной защиты, чем при введении только метионина. В свою очередь, АФК способны стимулировать активность аргининметилтрансфераз (PRMT) и вновь усиливать синтез диметиларгининов [324].

Из литературных источников известно также, что гомоцистеин может ингибировать активность фермента диметиларгининдиметиламиногидролазы (DDAH), который метаболизирует АДМА до неактивных продуктов, способствуя тем самым его накоплению и ингибированию синтеза оксида азота [148].

Можно предположить, что снижение уровня гомоцистеина и уменьшение степени гипергомоцистеинемии под влиянием экзогенного L-аргинина происходило за счет конкурентного транспорта аргинина и метионина. Так, Robinson J.W. (1968) выявил, что поглощение L-метионина сильно ингибируется L-аргинином и цитруллином [289]. И таким образом, уменьшается ингибирующее действие АДМА на NO-синтазу, вследствие ее метаболизма и реактивации активности DDAH с последующим снижением концентрации АДМА и увеличением уровня NO [29] (Рисунок 49).

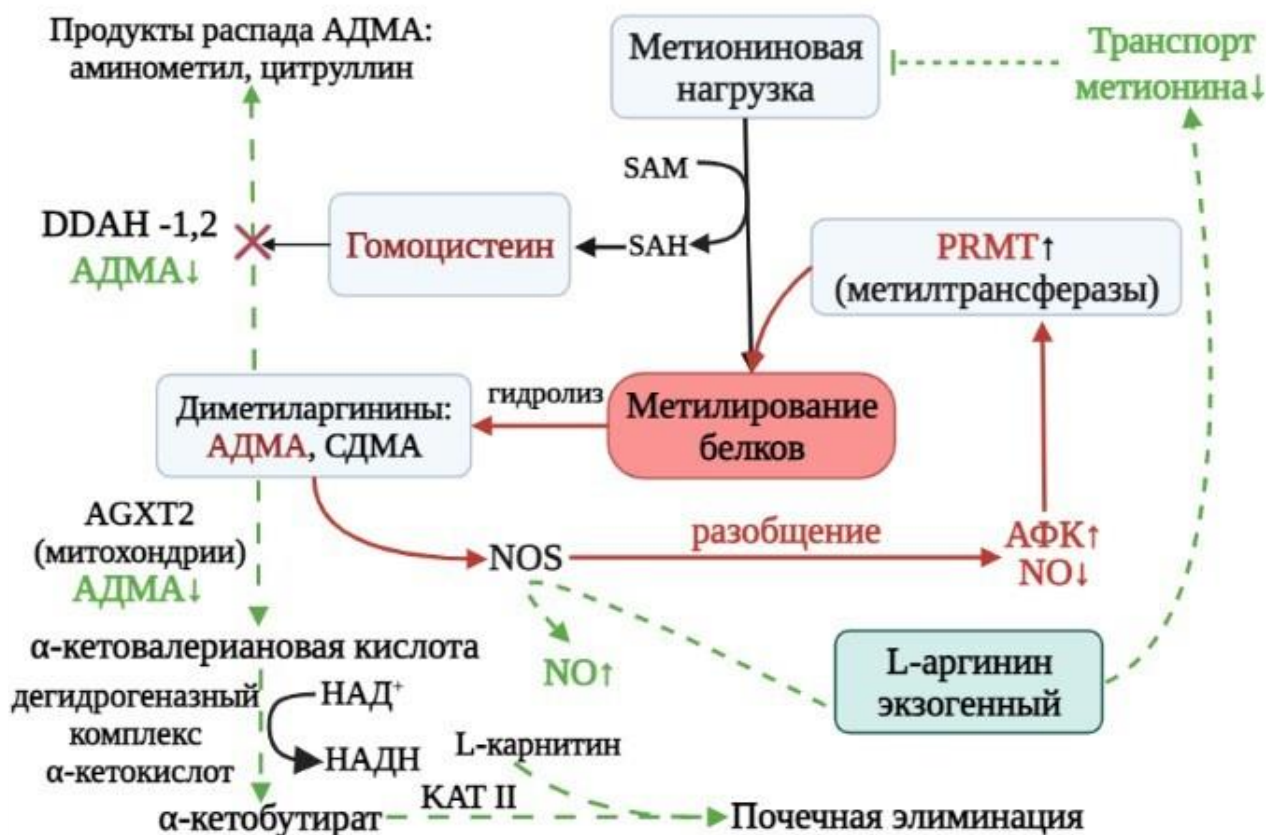


Рисунок 49 – Возможный механизм снижения уровня гомоцистеина под воздействием L-аргинина

Примечание: DDAH – диметиларгининдиметиламиногидролаза, PRMT – аргининметилтрансфераза, AGXT-2 - аланинглиоксилатаминотрансфераза 2, КАТ - карнитинацетил КоАтрансфераза. Рисунок выполнен с помощью BioRender.com. (Лицензионное соглашение AR25GW2YB5)

Анализ изменения биохимических показателей в цитоплазме и митохондриях клеток исследуемых тканей при гипергомоцистеинемии на фоне введения L-аргинина отражен в Таблицах 26-29:

При моделировании гипергомоцистеинемии на фоне назначения L-аргинина в митохондриях кардиомиоцитов, наблюдалась повышение активности СДГ относительно введения только метионина и снижение активности Н⁺-АТФазы, также отмечалось статистически значимое уменьшение содержания молочной кислоты до показателей контрольной группы животных (Таблица 26).

Таблица 26 – Влияние L-аргинина на биохимические показатели цитоплазмы и митохондрий клеток сердца при гипергомоцистеинемии, Me[Q₁;Q₃]

Показатели/ Группы	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (2)	Метионин 3 недели + L-аргинин (3)
<i>Цитоплазма</i>			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	460,88 [422,69; 502,83]	471,69 [264,26; 593,04] p ₁₋₂ =0,9485	442,49 [354,12; 483,83] p ₂₋₃ = 0,1575; p ₁₋₃ =0,5776
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	6,7 [5,8; 7,52]	8,76 [7,59; 12,91] p ₁₋₂ =0,0181	11,14 [8,55; 12,86] p ₂₋₃ = 0,9485; p ₁₋₃ =0,0009
<i>Митохондрии</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	271,72 [231,04; 323,28]	109,02 [69,19; 191,42]* p ₁₋₂ =0,0136	401,89 [348,52; 505,39]** p ₁₋₃ =0,0313; p ₂₋₃ =0,0136
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	13,77 [12,40; 15,16]	12,35 [10,05; 14,73] p ₁₋₂ =1,000	7,94 [7,13; 8,46]** p ₁₋₃ =0,0006; p ₂₋₃ =0,0089
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	239,49 [216,56; 285,68]	408,53 [330,077; 434,13] p ₁₋₂ =0,01944	465,81 [376,07; 487,03] p ₁₋₃ =0,007; p ₂₋₃ =1,000
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	4,01 [3,28; 5,59]	10,90 [7,67; 12,28]* p ₁₋₂ =0,0112	3,98 [3,28; 4,43]** p ₁₋₃ =1,000; p ₂₋₃ = 0,0015

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони ($p < 0,017$) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы ($p < 0,017$) относительно «Метионин 3 недели +L-Аргинин»

В митохондриях печени L-аргинин способствовал снижению активности СДГ (Таблица 27), при этом активность ЛДГ, оставалась повышенной, как и при назначении только метионина, при одновременном уменьшении содержания лактата. Статистически значимого изменения активности Н⁺-АТФазы не выявлено.

Таблица 27 – Влияние L-аргинина на биохимические показатели цитоплазмы и митохондрий клеток печени при гипергомоцистеинемии, Me[Q₁;Q₃]

Показатели/ Группы	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (2)	Метионин 3 недели + L-аргинин (3)
<i>Цитоплазма</i>			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	1292,51 [1168,76; 1363,15]	982,76 [960,49; 1124,96]* p ₁₋₂ =0,0108	884,70 [795,2; 1038,11] p ₁₋₃ =0,0027; p ₂₋₃ = 0,1278
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	6,7 [5,8; 7,52]	8,76 [7,59; 12,91] p ₁₋₂ =0,4308	11,14 [8,55; 12,86] p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ = 0,9485
<i>Митохондрии</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	38,68 [27,40; 51,91]	82,46 [63,90;98,33]* p ₁₋₂ =0,0156	49,66 [39,06; 63,95]** p ₁₋₃ =0,2897; p ₂₋₃ =0,00054
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	2,33 [1,61; 2,69]	3,77 [2,62;5,35]* p ₁₋₂ =0,0239	4,13 [2,37; 5,62] p ₁₋₃ =0,0660; p ₂₋₃ =0,9581
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	643,85 [599,89; 716,66]	1041,99 [976,38; 1456,56]* p ₁₋₂ =0,0043	1230,53 [1164,97; 1333,36] p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =1,000
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	19,26 [17,17; 22,04]	19,03 [15,76; 21,97] p ₁₋₂ =1,000	8,76 [3,42; 12,42]** p ₁₋₃ =0,0030; p ₂₋₃ = 0,0063

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони (p<0,017) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы (p<0,017) относительно «Метионин 3 недели +L-Аргинин»

В митохондриях придатка яичка на фоне применения L-аргинина активность СДГ и Н⁺-АТФазы не отличалась от серии животных с тяжелой формой гипергомоцистеинемии и была ниже уровня контрольных значений. В хвосте эпидидимиса отмечается повышение активности ЛДГ с одновременным уменьшением содержания молочной кислоты (Таблица 28,29).

Таблица 28 – Влияние L-аргинина на биохимические показатели цитоплазмы и митохондрий клеток головки эпидидимиса при гипергомоцистеинемии, Ме [Q₁;Q₃]

Показатели/ Группы	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (2)	Метионин 3 недели + L-аргинин (3)
<i>Цитоплазма</i>			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	169,9 [158,14; 182,83]	135,83 [118,95; 142,54]* p ₁₋₂ =0,0019	135,08 [131,09; 144,9] p ₁₋₃ =0,0070; p ₂₋₃ =1,000
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	23,74 [19,30; 5,74]	27,15 [24,89; 31,13] p ₁₋₂ =0,0520	28,52 [26,24; 30,53] p ₁₋₃ =0,0181; p ₂₋₃ = 0,7928
<i>Митохондрии</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	70,30 [33,66;95,88]	20,79 [11,16;24,45]* p ₁₋₂ =0,0089	28,98 [10,22; 35,05] p ₁₋₃ =0,1316; p ₂₋₃ =1,000
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	26,23 [21,58; 0,85]	14,78 [11,51;18,58]* p ₁₋₂ =0,0009	11,16 [7,74; 12,21] p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0523
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	33,04 [25,53; 36,73]	19,19 [13,27; 25,57]* p ₁₋₂ =0,0136	11,16 [7,73; 12,21] p ₁₋₃ =0,0070; p ₂₋₃ =1,000
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	11,21 [10,30; 16,55]	29,60 [25,40; 31,17]* p ₁₋₂ =0,001	15,16 [13,15; 19,46] p ₁₋₃ =0,0001; p ₂₋₃ = 0,4718

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони ($p < 0,017$) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы ($p < 0,017$) относительно «Метионин 3 недели +L-Аргинин»

Таблица 29 – Влияние L-аргинина на биохимические показатели цитоплазмы и митохондрий клеток хвоста эпидидимиса при гипергомоцистеинемии, Ме[Q₁;Q₃]

Показатели/ Группы	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (2)	Метионин 3 недели + L-аргинин (3)
<i>Цитоплазма</i>			
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	61,65 [57,76; 71,66]	62,62 [51,77; 66,58] p ₁₋₂ = 0,4978	55,92 [46,33; 64,37] p ₁₋₃ = 0,2701; p ₂₋₃ =0,3184

Концентрация лактата, мкмоль/г белка	21,25 [16,15; 24,40]	32,69 [24,92; 36,44] p ₁₋₂ =0,0405	33,05 [26,74; 38,31] p ₁₋₃ =0,0027; p ₂₋₃ = 0,7928
Митохондрии			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	56,38 [39,35; 93,56]	14,77 [10,04; 21,49]* p ₁₋₂ = 0,0023	19,2 [15,01; 34,17] p ₁₋₃ = 0,0235; p ₂₋₃ =1,000
Активность Н ⁺ -АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	20,14 [15,48; 27,19]	9,52 [6,91; 11,13]* p ₁₋₂ = 0,0014	9,81 [6,86; 10,4] p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,9581
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	21,09 [13,03; 27,48]	15,59 [12,97; 17,93] p ₁₋₂ = 0,2701	38,67 [34,71; 46,22]** p ₁₋₃ = 0,0140; p ₂₋₃ =0,0002
Концентрация лактата, мкмоль/г белка	10,94 [8,08; 16,46]	38,16 [27,42; 43,09]* p ₁₋₂ =0,0010	8,67 [4,59; 12,11]** p ₁₋₃ = 1,000 p ₂₋₃ = 0,0140

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони ($p < 0,017$) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы ($p < 0,017$) относительно «Метионин 3 недели +L-Аргинин»

Таким образом, L-аргинин уменьшает степень выраженности гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина в высокой дозе, вероятно, за счет ингибирования транспорта метионина в клетки, с сопутствующим увеличением концентрации метаболитов оксида азота. L-аргинин способствует снижению уровня молочной кислоты в митохондриальной фракции всех исследуемых органов, за исключением головки эпидидимиса. Также L-аргинин проявляет выраженные антиоксидантные свойства, препятствуя развитию окислительного стресса, ассоциированного с гиперпродукцией гомоцистеина. Поэтому существуют убедительные предпосылки для изучения коррекции нарушений, вызванных поступлением избыточного количества метионина назначением L-аргинина, способного повышать содержание NO_x, блокировать процессы перекисного окисления липидов и избыточного образования АФК, а также восстанавливать активность ферментов митохондрий, корригируя развитие митохондриальной дисфункции.

3.2.4. Воздействие экспериментальной гипергомоцистеинемии на содержание фракций эндогенного карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени, эпидидимиса изолированно и в комбинации с L-аргинином

Анализ пула карнитина при моделировании тяжелой формы гипергомоцистеинемии показал выраженное снижение содержания всех фракций карнитина: общего, свободного и связанного в сыворотке крови (Рисунок 50), цитоплазме и митохондриях клеток всех изучаемых органов (Таблица 30, 31).

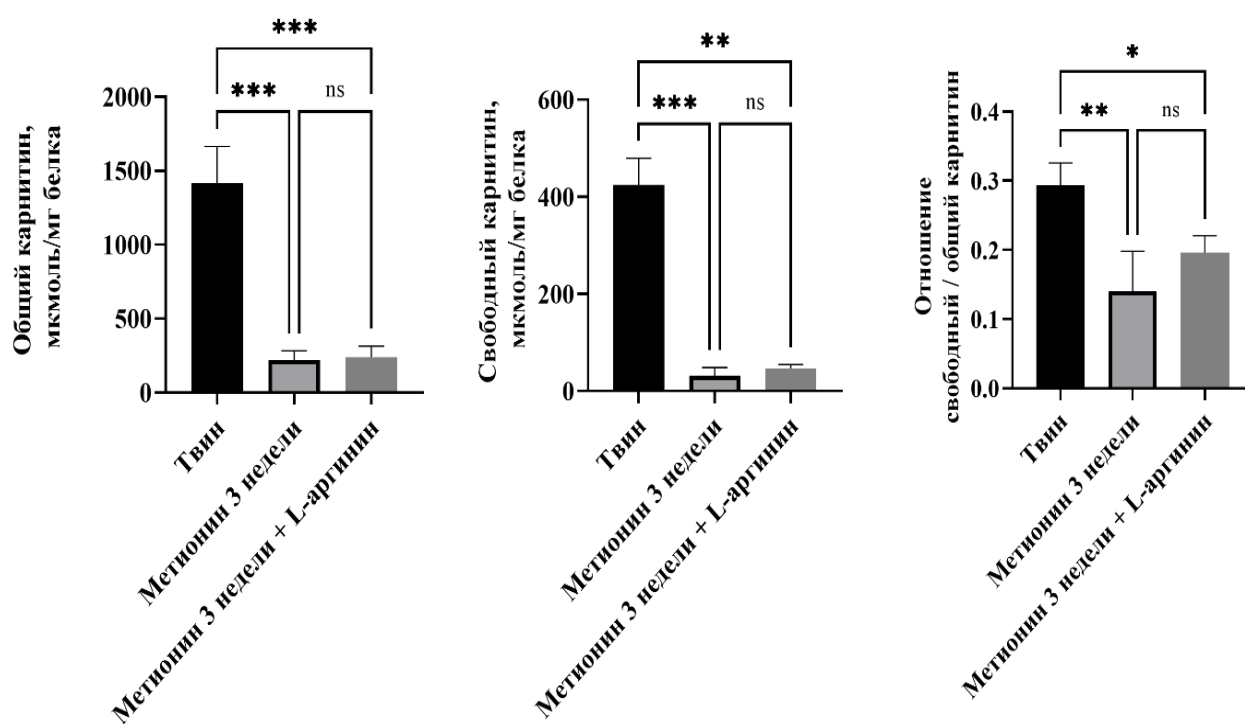


Рисунок 50 – Содержание фракций карнитина в сыворотке крови при гипергомоцистеинемии изолированно и на фоне L-аргинина

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Таблица 30 – Содержание карнитина в митохондриях исследуемых органов крыс при гипергомоцистеинемии, мкмоль/мг белка: Ме [Q₁; Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Контроль Твин				
Карнитин общ.	47,04 [42,25; 60,07]	47,47 [45,09; 51,83]	86,61 [86,91;102,54]	85,20 [74,77;94,13]
Карнитин своб.	22,99 [18,89;26,40]	11,97 [10,72; 15,21]	46,41 [41,30;64,39]	48,21 [44,06;54,70]
Карнитин связ.	28,29 [19,55; 34,12]	35,09 [32,35; 38,9]	45,61 [31,66;49,59]	37,42 [33,84;42,68]
Гипергомоцистеинемия				
Карнитин общ.	5,22 [4,37; 6,52]* p=0,00094	5,37 [4,21; 6,03]* p=0,00094	24,89 [22,93;26,00]* p=0,00094	21,05 [20,88;24,45]* p=0,00094
Карнитин своб.	2,68 [1,96; 3,90]* p=0,00094	2,61 [1,78; 4,21]* p=0,00094	13,52 [11,72;15,19]* p=0,00094	9,70 [8,97;10,74]* p=0,00094
Карнитин связ.	2,08 [0,88; 3,0]* p=0,00094	2,03 [1,65;3,21]* p=0,00094	12,20 [9,37;12,34]* p=0,00136	11,81 [11,37;14,12]* p=0,00194

Примечание: * - изменения показателя считаются статистически значимыми относительно контрольной группы ТВИН (p<0,05)

Таблица 31 – Содержание карнитина в цитоплазме клеток исследуемых органов крыс при гипергомоцистеинемии, мкмоль/мг белка: Ме [Q₁; Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Контроль Твин				
Карнитин общ.	46,98 [44,96; 52,38]	43,40 [40,36; 49,22]	147,35 [141,11;159,43]	145,65 [141,2; 180,33]
Карнитин своб.	21,60 [20,09; 23,78]	26,76 [23,54; 29,52]	100,42 [96,86; 108,98]	93,46 [81,57;102,75]
Карнитин связ.	25,13 [22,51; 26,10]	16,78 [15,28; 18,16]	49,96 [31,66;49,59]	59,95 [50,75;70,0]

<i>Гипергомоцистеинемия</i>				
Карнитин общ.	5,22 [4,37; 6,52]* p=0,00094	14,70 [14,45; 17,02]* p ₁₋₂ =0,00094	56,94 [43,97;61,23]* p=0,00094	32,68 [30,84;33,25]* p=0,00094
Карнитин своб.	2,68 [1,96; 3,90]* p=0,00094	1,39 [1,23; 2,04]* p ₁₋₂ =0,00094	43,25 [35,13;43,85]* p=0,00094	18,70 [18,48;19,53]* p=0,00094
Карнитин связ.	2,08 [0,88; 3,0]* p=0,00094	13,4 [13,16; 14,46]* p ₁₋₂ =0,0027	14,40 [10,2;17,3]* p=0,00094	13,68 [11,2;14,72]* p=0,00194

Примечание: * - изменения показателя считаются статистически значимыми относительно контрольной группы ТВИН (p<0,05)

Механизм возможного снижения уровня карнитина в тканях остается неясным, однако, можно предположить, что в условиях длительной метиониновой нагрузки в течение 21 дня, происходила индукция трансаминаз с последующим образованием α -кетокислоты 4-метилтио-2-оксобутирата, которая в митохондриях служит субстратом дегидрогеназного комплекса разветвленных α -кетокислот [168] (Рисунок 51).

Образующийся в результате окислительного декарбоксилирования данной α -кетокислоты 3-метилтиопропионил-SКоА под действием карнитинацилтрансферазы-II способен превращаться в эфир карнитина с высвобождением HSKoA [208]. В дальнейшем 3-метилтиопропионилкарнитин, как и эфиры карнитина с другими короткоцепочечными ацилами, обладающими способностью к диффузии через клеточные мембраны, может экскретироваться почками [133], что в итоге способствует защите организма от повреждающего воздействия гомоцистеина и уменьшению степени выраженности гипергомоцистеинемии.

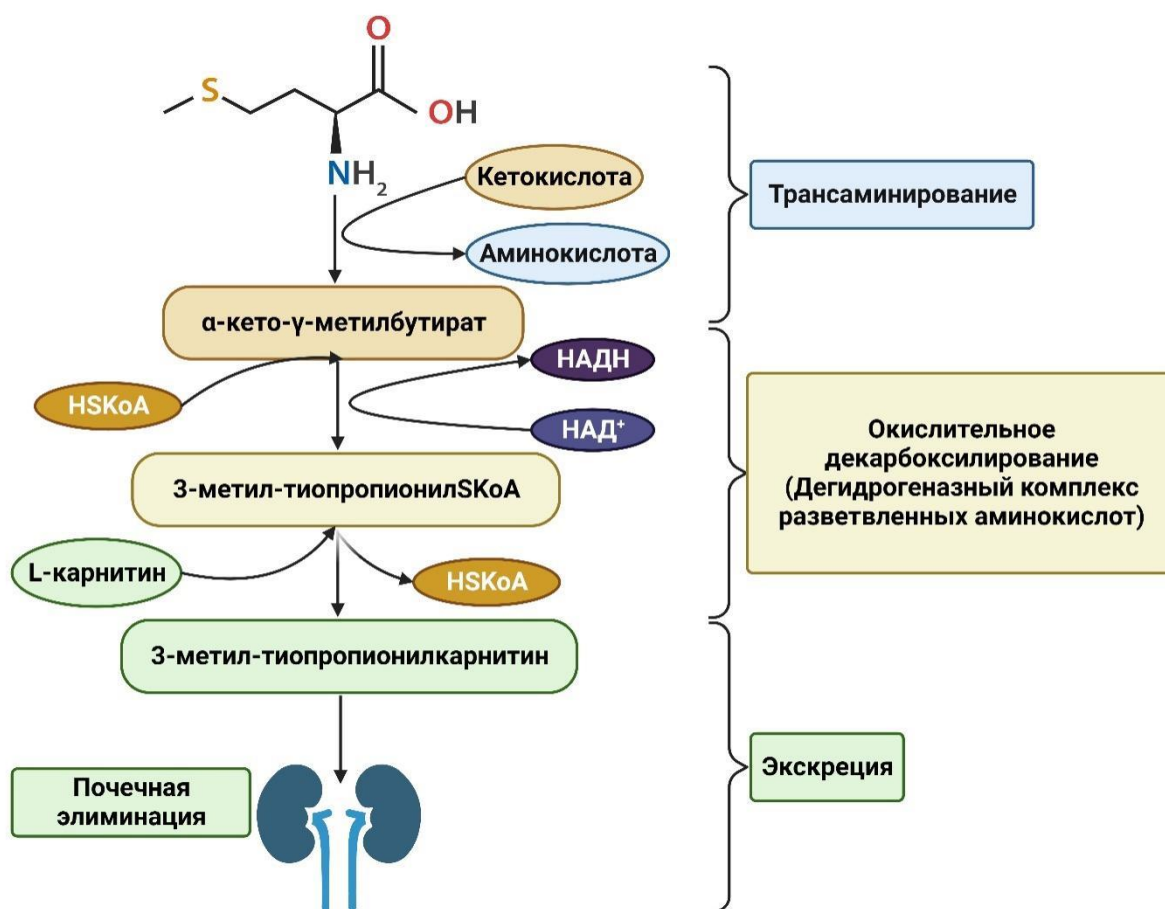


Рисунок 51 – Возможный механизм снижения уровня гомоцистеина в сыворотке крови при метиониновой нагрузке под влиянием карнитина хлорида.

Примечание: Рисунок выполнен с помощью BioRender.com. (Лицензионное соглашение QH25SLM0NZ)

Хотя при моделировании гипергомоцистеинемии на фоне назначения животным L-аргина наблюдались повышение отдельных фракций карнитина (общий карнитин в митохондриях сердца, печени и головки эпидидимиса, цитоплазме клеток печени и хвоста придатка яичка; свободный карнитин в митохондриях головки эпидидимиса, цитоплазме клеток сердца, печени и хвоста эпидидимиса), содержание эндогенного карнитина оставалось ниже уровня контрольных значений (Таблица 32, 33, Рисунок 52).

Таблица 32 – Содержание L-карнитина в цитоплазме и митохондриях клеток сердца при гипергомоцистеинемии изолированно и на фоне назначения L-аргинина, Me[Q₁;Q₃]

Показатели/ Группы	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (2)	Метионин 3 недели + L-аргинин (3)
<i>Цитоплазма</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	46,98 [44,96; 52,38]	12,44 [10,43; 14,74]* p ₁₋₂ =0,00094	16,33 [15,02; 17,57] p ₁₋₃ =0,00094; p ₂₋₃ = 0,0313
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	21,60 [20,09; 23,78]	3,52 [3,23; 4,07]* p ₁₋₂ =0,0009	7,68 [7,41; 7,87]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0009
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	25,13 [22,51; 26,10]	8,77 [6,71; 11,49]* p ₁₋₂ =0,0009	8,62 [8,18; 9,53] p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,1575;
Отношение свободный/общий карнитин	0,46 [0,44; 0,48]	0,28 [0,24; 0,32]* p ₁₋₂ =0,0100	0,47 [0,43; 0,50]** p ₁₋₃ =0,8748; p ₂₋₃ =0,0100
<i>Митохондрии</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	47,04 [42,28;60,07]	5,22 [4,37;6,52]* p ₁₋₂ =0,0009	8,31 [7,52; 11,16]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0074
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	22,99 [11,88; 26,39]	2,68 [1,96; 3,90]* p ₁₋₂ =0,0009	4,51 [4,03; 6,62] p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0239
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	28,29 [19,54; 34,11]	2,07 [0,87; 3,00]* p ₁₋₂ =0,0009	3,40 [3,29; 4,85]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0135;
Отношение свободный/общий карнитин	0,46 [0,42; 0,52]	0,52 [0,44; 0,76] p ₁₋₂ =0,2701	0,57 [0,54; 0,63] p ₁₋₃ =0,0100; p ₂₋₃ =0,9581

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони ($p < 0,017$) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы ($p < 0,017$) относительно «Метионин 3 недели +L-Аргинин»

Таблица 33 – Содержание L-карнитина в цитоплазме и митохондриях клеток печени при гипергомоцистеинемии изолированно и на фоне назначения L-аргинина, Me[Q₁;Q₃]

Показатели/ Группы	Контроль ТВИН (1)	Метионин 3 недели (2)	Метионин 3 недели + L-аргинин (3)
<i>Цитоплазма</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	43,40 [40,36; 49,22]	14,70 [14,45; 17,02]* p ₁₋₂ =0,0009	19,09 [18,25; 20,83]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ = 0,0074
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	26,76 [23,54; 29,52]	1,39 [1,23; 2,04]* p ₁₋₂ =0,0009	4,92 [3,92; 6,53]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0009
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	16,78 [15,28; 18,16]	13,4 [13,16; 14,46]* p ₁₋₂ =0,0027	14,27 [13,47; 14,46] p ₁₋₃ =0,0100; p ₂₋₃ =0,1575
Отношение свободный/общий карнитин	0,61 [0,56; 0,64]	0,095 [0,08; 0,12]* p ₁₋₂ =0,0009	0,26 [0,20; 0,30]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0027
<i>Митохондрии</i>			
Карнитин общий, мкмоль/мг белка	47,47 [45,09;51,83]	5,38 [4,22;6,03]* p ₁₋₂ =0,00001	12,62 [11,91; 13,21]** p ₁₋₃ =0,0399; p ₂₋₃ =0,070
Карнитин свободный, мкмоль/мг белка	11,97 [10,72; 15,21]	2,60 [1,77; 4,20]* p ₁₋₂ =0,0009	3,66 [3,46; 5,69] p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,1035
Карнитин связанный, мкмоль/мг белка	28,29 [19,54; 34,11]	2,07 [0,87; 3,00] p ₁₋₂ =0,0009	3,40 [3,29; 4,85]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0135
Отношение свободный/общий карнитин	0,25 [0,23; 0,27]	0,56 [0,42; 0,64] p ₁₋₂ =0,0009	0,32 [0,29; 0,43]** p ₁₋₃ =0,0009; p ₂₋₃ =0,0135

Примечание: * - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы с учетом поправки Бонферрони ($p < 0,017$) относительно группы «Контроль ТВИН»; ** - изменения в серии «Метионин 3 недели» статистически значимы ($p < 0,017$) относительно «Метионин 3 недели +L-Аргинин»

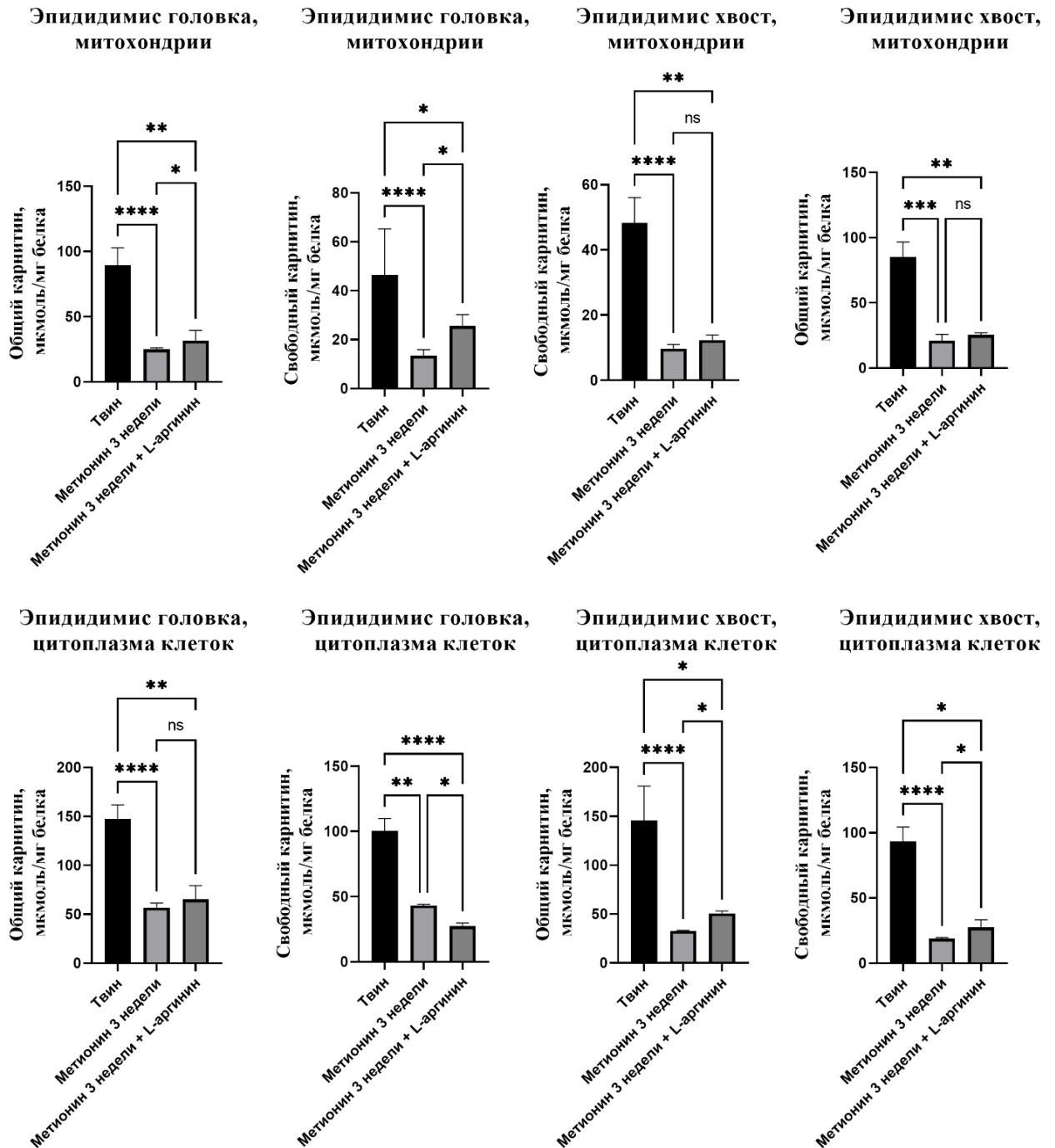


Рисунок 52 – Содержание L-карнитина в цитоплазме и митохондриях клеток эпидидимиса при гипергомоцистеинемии изолированно и на фоне назначения

L-аргинина, Me [Q₁;Q₃]

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$, символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q₁;Q₃]

Таким образом, карнитин в условиях метиониновой нагрузки, предположительно, участвует в утилизации излишков данной аминокислоты, за счет чего снижается степень выраженности гипергомоцистеинемии, однако, по всей видимости, физиологической концентрации карнитина недостаточно для полной экскреции всего поступающего метионина.

3.2.5. Воздействие карнитина хлорида на функционирование митохондрий в тканях сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальной гипергомоцистеинемии

Экзогенное введение карнитина хлорида на фоне гипергомоцистеинемии способствовало увеличению содержания общего карнитина в митохондриях миокарда и печени (Рисунок 53), а также цитоплазме клеток сердца, печени и хвоста эпидидимиса (Рисунок 55). Содержание митохондриального свободного карнитина увеличилось в сердце и головке придатка яичка. Уровень свободного карнитина повышался в цитоплазме клеток сердца, печени и хвоста придатка яичка.

Интересен и тот факт, что концентрация общего карнитина в сыворотке крови (Рисунок 56), также, как и в митохондриях обеих частей эпидидимиса, (Рисунок 54) оставалась на уровне серии животных с метиониновой нагрузкой. По всей видимости, большая часть поступающего экзогенного карнитина также использовалась организмом для выведения излишков метионина.

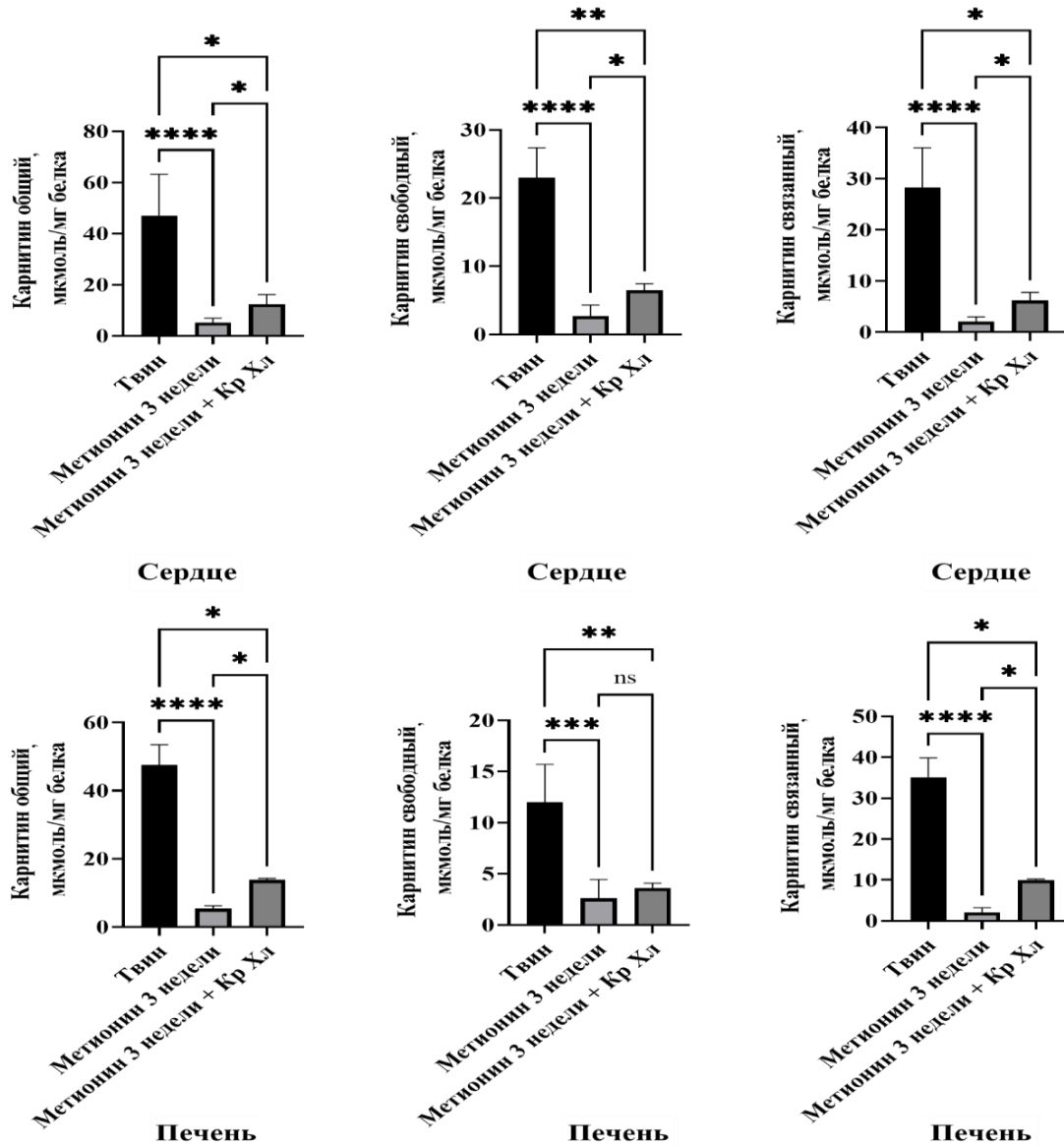


Рисунок 53 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень карнитина в митохондриальной фракции сердца и печени при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом *отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом ** - различия сравниваемых групп при $p < 0,01$, символом *** - различия сравниваемых групп при $p < 0,001$, символом **** - различия сравниваемых групп при $p < 0,0001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

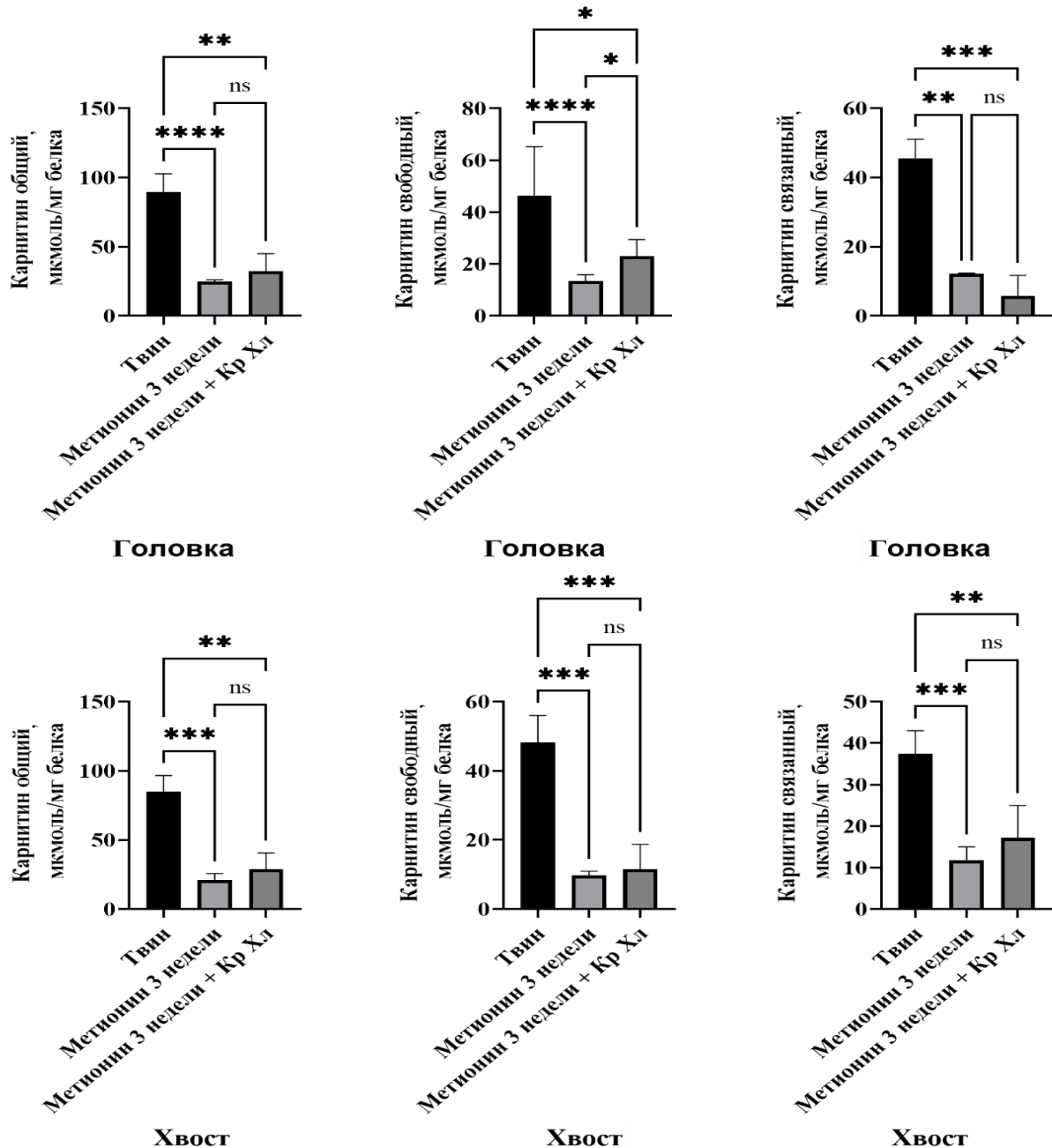


Рисунок 54 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень карнитина в митохондриальной фракции головки и хвоста эпидидимиса при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом *отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом ** - различия сравниваемых групп при $p < 0,01$, символом *** - различия сравниваемых групп при $p < 0,001$, символом **** - различия сравниваемых групп при $p < 0,0001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

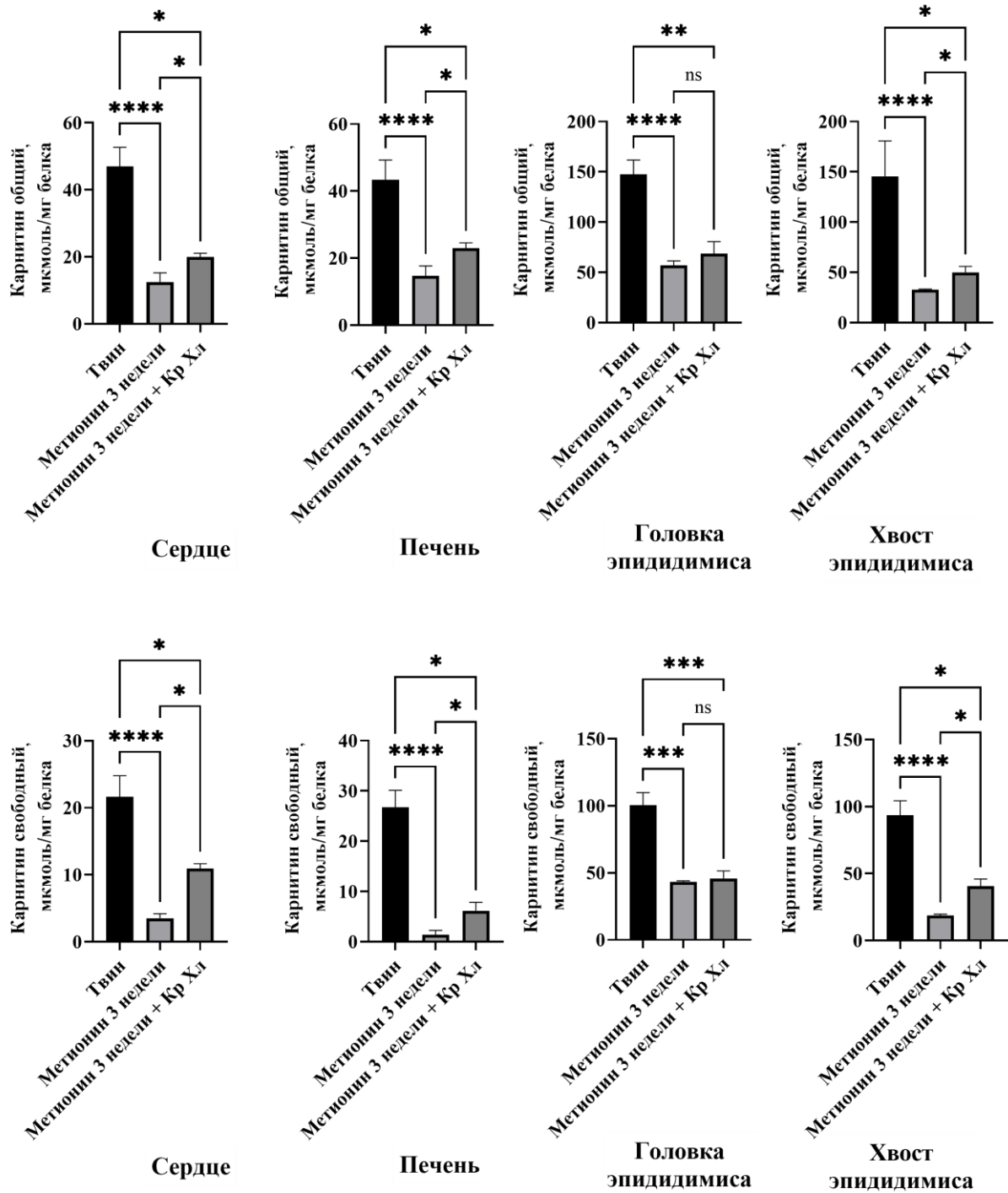


Рисунок 55 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень карнитина в цитоплазме клеток исследуемых органов при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом *отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом ** - различия сравниваемых групп при $p < 0,01$, символом *** - различия сравниваемых групп при $p < 0,001$, символом **** - различия сравниваемых групп при $p < 0,0001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Назначение карнитина хлорида на фоне гипергомоцистеинемии сопровождалось снижением уровня гомоцистеина сыворотки крови в 4 раза ($p=0,0009$), однако, его содержание, по-прежнему, было выше значений контрольной группы животных (Рисунок 56).

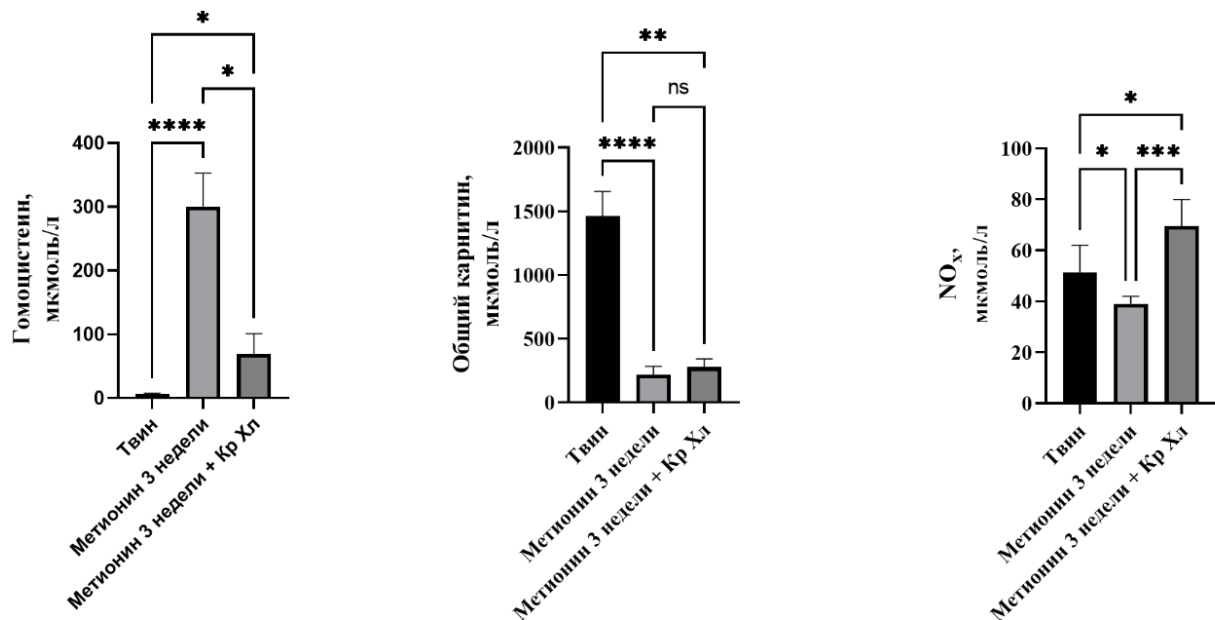


Рисунок 56 – Влияние карнитина хлорида на уровень гомоцистеина, общего карнитина и NO_x в сыворотке крови при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом *отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом ** - различия сравниваемых групп при $p < 0,01$, символом *** - различия сравниваемых групп при $p < 0,001$, символом **** - различия сравниваемых групп при $p < 0,0001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Вероятный механизм снижения концентрации гомоцистеина может быть связан с образованием эфиров карнитина с метаболитами метионина и их эффлюксом в системный кровоток с последующей их экскрецией [133]. Более подробно механизм рассматривался выше в главе 3.2.4.

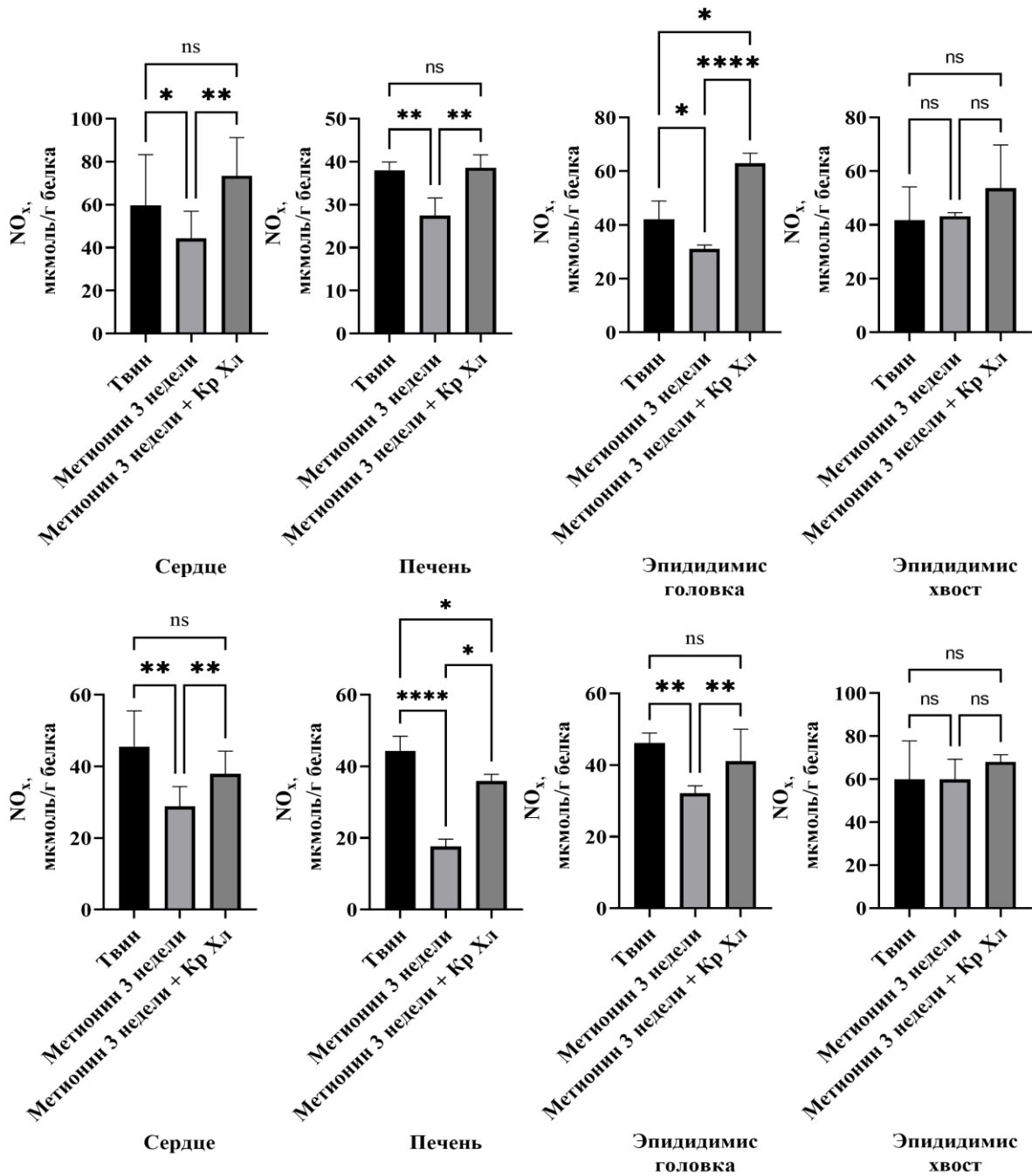


Рисунок 57 – Влияние карнитина хлорида NO_x в митохондриях (вверху) и цитоплазме клеток (внизу) исследуемых органов при гипергомоцистеинемии
Примечание: символом *отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом ** - различия сравниваемых групп при $p < 0,01$, символом **** - различия сравниваемых групп при $p < 0,0001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Анализ полученных данных показал, что назначение карнитина хлорида на фоне гипергомоцистеинемии предотвращало падение уровня NO_x в сыворотке крови (Рисунок 56) и всех исследуемых субклеточных фракциях по сравнению с группой экспериментальной гипергомоцистеинемии (Рисунок 57). Исключение составлял каудальный отдел эпидидимиса, где не наблюдалось статистически значимого изменения содержания метаболитов NO как в условиях гипергомоцистеинемии, так и при совместном введении карнитина хлорида и метионина.

На следующем этапе был измерен уровень pNOS в митохондриальной фракции исследуемых органов. В головке придатка яичка назначение карнитина хлорида способствовало повышению ее уровня в 2,7 раза ($p=0,0108$), в каудальной части эпидидимиса содержание pNOS увеличивалось в 11,6 раз ($p=0,0009$), при этом экспериментальная гипергомоцистеинемия статистически значимо не влияла на содержание pNOS . В сердце и печени статистически значимых изменений относительно серии с гипергомоцистеинемией не выявлено.

Известно, что зрелые и потенциально подвижные сперматозоиды хранятся в придатке яичка в неактивном состоянии, однако, во время эякуляции они восстанавливают свою подвижность. В недавнее время из плазмы придатка яичка был выделен и очищен белковый фактор покоя (QF), который обратимо подавляет поступательную подвижность сперматозоидов. Как оказалось, ингибирующая активность данного фактора опосредуется снижением активности фермента NOS [38]. Возможно, карнитина хлорид способствует инактивации данного фактора, путем увеличения уровня NO -синтазы, но данное предположение требует дальнейшего исследования.

Таким образом, можно констатировать, что карнитина хлорид стимулирует процесс генерации NO , как непосредственным путем, опосредуя влияние на уровень NOS , но этот процесс является тканеспецифичным и проявляется только в эпидидимисе, так и опосредованно, уменьшая содержание гомоцистеина, за счет возможного выведения продуктов метаболизма метионина. Также

предположительно карнитин может влиять на удаление продуктов распада диметиларгининов, в большей степени АДМА (Рисунок 58).

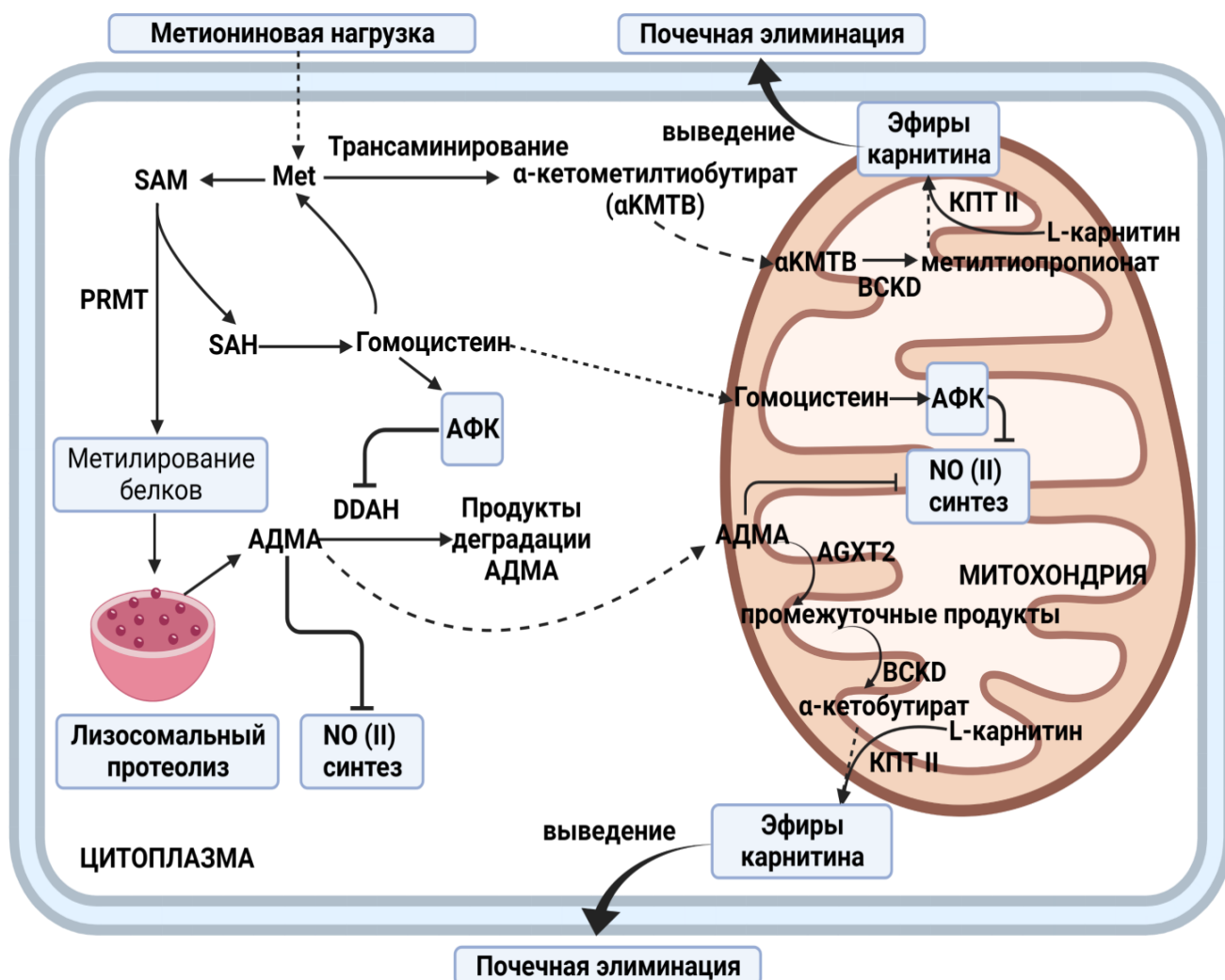


Рисунок 58 – Возможные механизмы предотвращения снижения продукции NO (II) в условиях моделирования тяжелой гипергомоцистеинемии.

Примечание: Met – метионин, SAM – S- аденозилметионин, SAH- S-аденозилгомоцистеин, Hcy-гомоцистеин, ADMA – асимметричный N^G, N^G -диметиларгинин, αKMТВ - α-кето-γ-метилтиобутират, PRMT – белковые аргининметилтрансферазы, DDAH-1.2 – N^G, N^G диметиларгининдиметиламиногидролазы-1,2, AGXT2 – аланин-глиоксиламинотрансфераза 2, BCKD – дегидрогеназный комплекс разветвленных альфа-кетокислот, Пунктиром обозначен транспорт через мембраны. Рисунок выполнен с помощью BioRender.com.(Лицензионное соглашение FL25GW5VUC)

Экспериментальная гипергомоцистеинемия на фоне введения крысам карнитина хлорида приводила к различной реакции клеток исследуемых тканей. При введении карнитина хлорида на фоне гипергомоцистеинемии в цитоплазме и митохондриях клеток кардиомиоцитов содержание лактата оставалось на уровне значений контрольной группы, т.е не происходило его повышения, наблюдаемого при ГГЦ, активность ЛДГ также статистически значимо не изменялась (Рисунок 59,60). В цитоплазме клеток печени отмечено снижение активности ЛДГ относительно серии с гипергомоцистеинемией и контроля ТВИН. В митохондриях выявлено уменьшение содержания лактата, при сохраненной активности ЛДГ. В митохондриях головки эпидидимиса наблюдалось повышение уровня молочной кислоты под действием карнитина хлорида. Активность ЛДГ также статистически значимо возрастала. В митохондриальной фракции и цитоплазме клеток хвоста статистически значимых изменений изучаемых показателей не наблюдалось.

Активность СДГ и H^+ -АТФазы в митохондриях сердца не изменялась, в печени активность СДГ была выше крыс контрольной группы ТВИН и статистически значимо не отличалась от серии животных с гипергомоцистеинемией (Рисунок 61). Активность H^+ -АТФазы оставалась на уровне контрольных значений и была ниже относительно серии с гипергомоцистеинемией.

В митохондриальной фракции эпидидимиса статистически значимых изменений активности СДГ и H^+ -АТФазы относительно группы животных с гипергомоцистеинемией выявлено не было.

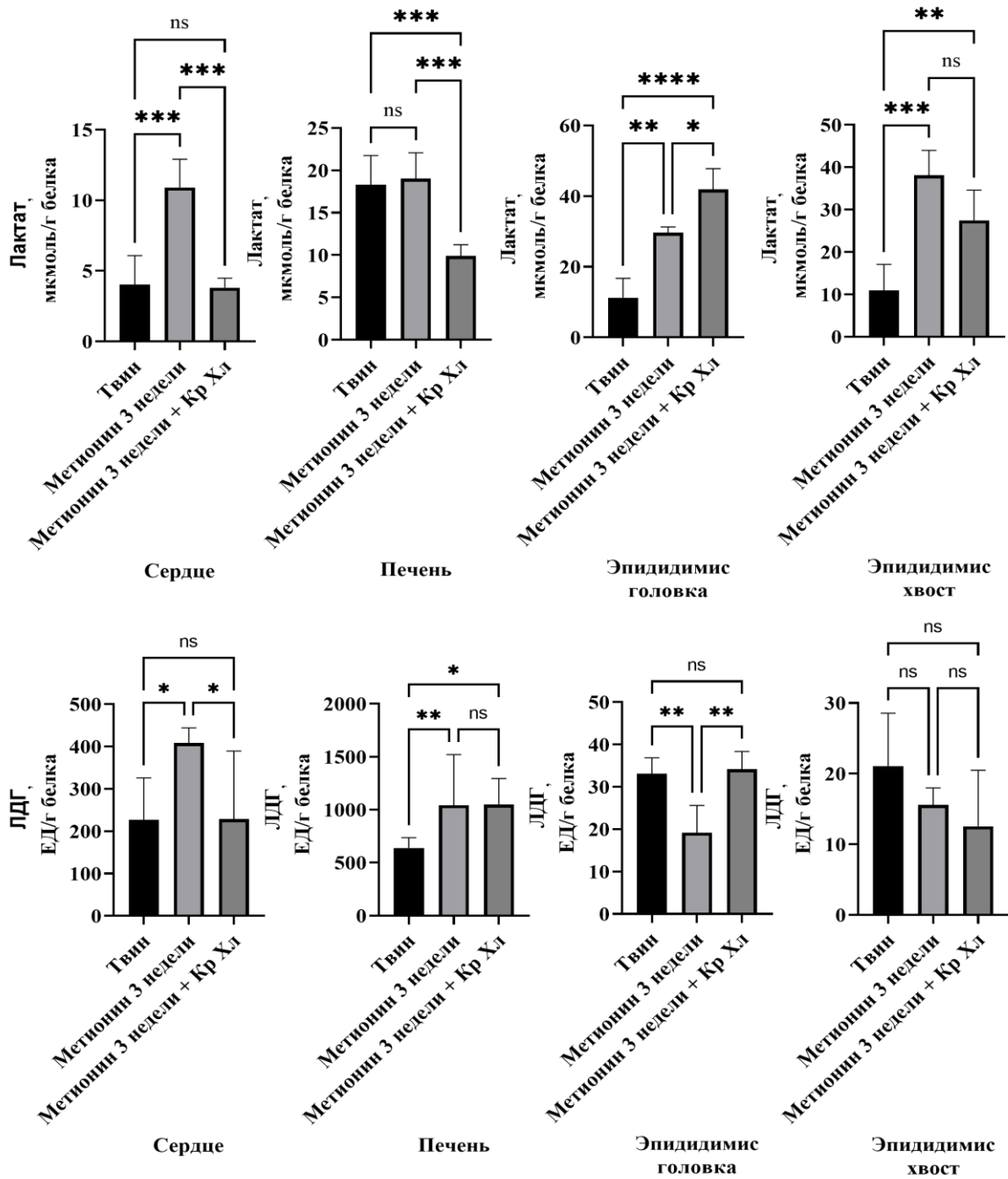


Рисунок 59 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень лактата и активность ЛДГ в митохондриях исследуемых органов при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом *отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом **–различия сравниваемых групп при $p < 0,01$, символом *** - различия сравниваемых групп при $p < 0,001$, символом **** - различия сравниваемых групп при $p < 0,0001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

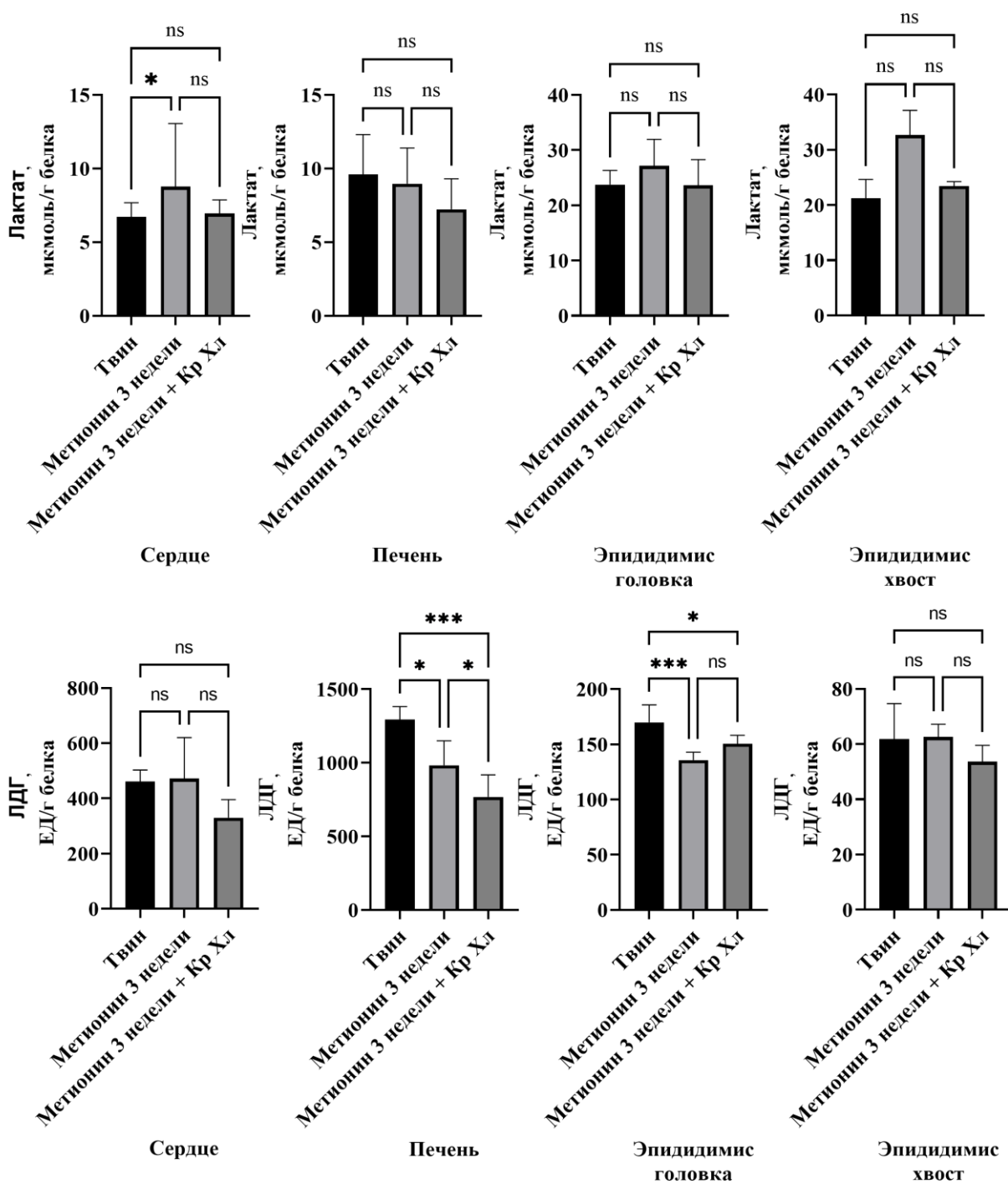


Рисунок 60 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень лактата и активность ЛДГ в цитоплазме клеток исследуемых органов при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом * отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом *** - различия сравниваемых групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

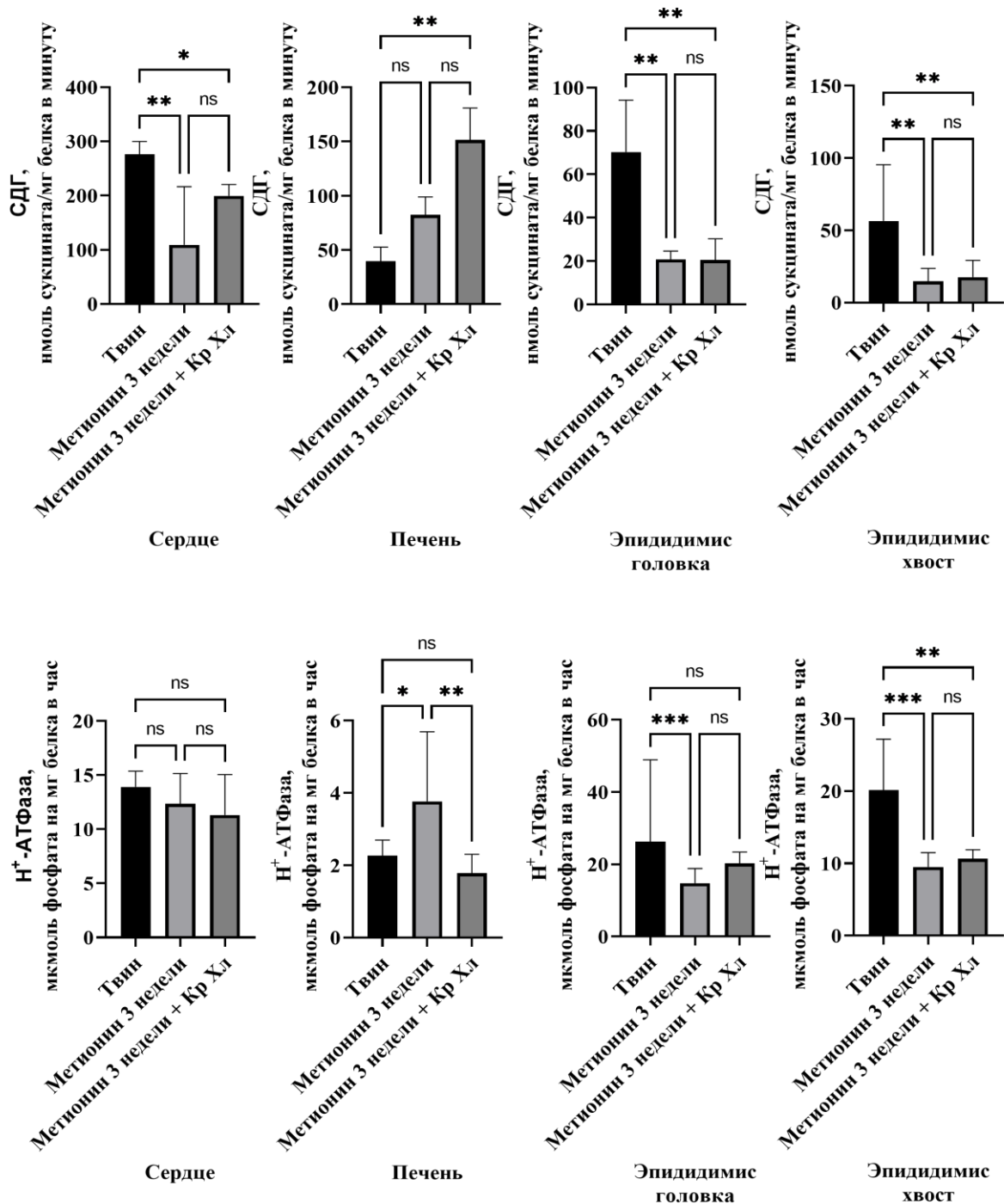


Рисунок 61 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на активность СДГ и

H⁺АТФазы в митохондриях исследуемых органов при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом *отмечены различия сравниваемых групп при $p < 0,05$; символом ** - различия сравниваемых групп при $p < 0,01$, символом *** - различия сравниваемых групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Повышение лактатдегидрогеназной активности в митохондриях головки эпидидимиса на фоне назначения карнитина хлорида позволяет предположить, что L-карнитин важен для реализации метаболической гибкости, связанной с переключением митохондрий на использование лактата в качестве энергосубстрата, в условиях ограниченного использования жирных кислот в данном органе. Возможен следующий механизм реализации данного эффекта: известно, что экспрессия монокарбоксилатного транспортера (МСТ 1) опосредуется за счет регуляторов митохондриального биогенеза PPAR, в то же время L-карнитин способен модулировать активность и экспрессию ядерных рецепторов, в том числе PPAR- α , PPAR- δ , PPAR- γ , путем увеличения сродства связывания ядерных рецепторов с их промоторными последовательностями – мишенями [185, 231].

Таким образом, карнитина хлорид способствует повышению концентрации лактата внутри митохондрий за счет усиления его транспорта в условиях тяжелой формы гипергомоцистеинемии.

В хвостовой части эпидидимиса не обнаружено статистически значимых отличий от серии с гипергомоцистеинемией в уровне лактата и активности ЛДГ в цитоплазматической фракции. В митохондриальной клеточной фракции также не было найдено значимых отличий в концентрации молочной кислоты, активности ЛДГ, СДГ и H^+ -АТФазы.

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 [82, 228]. Данная закономерность, возможно, обуславливала отсутствие статистически значимых различий в хвосте придатка яичка на фоне применения карнитина хлорида.

Уровень ОМБ, соотношение первичных и вторичных маркеров ОМБ, а также основных и нейтральных динитрофенилгидразонов в тканях сердца, печени и головки эпидидимиса на фоне назначения карнитина хлорида были сопоставимы с показателями животных с моделируемой гипергомоцистеинемией (Рисунок 62-64).

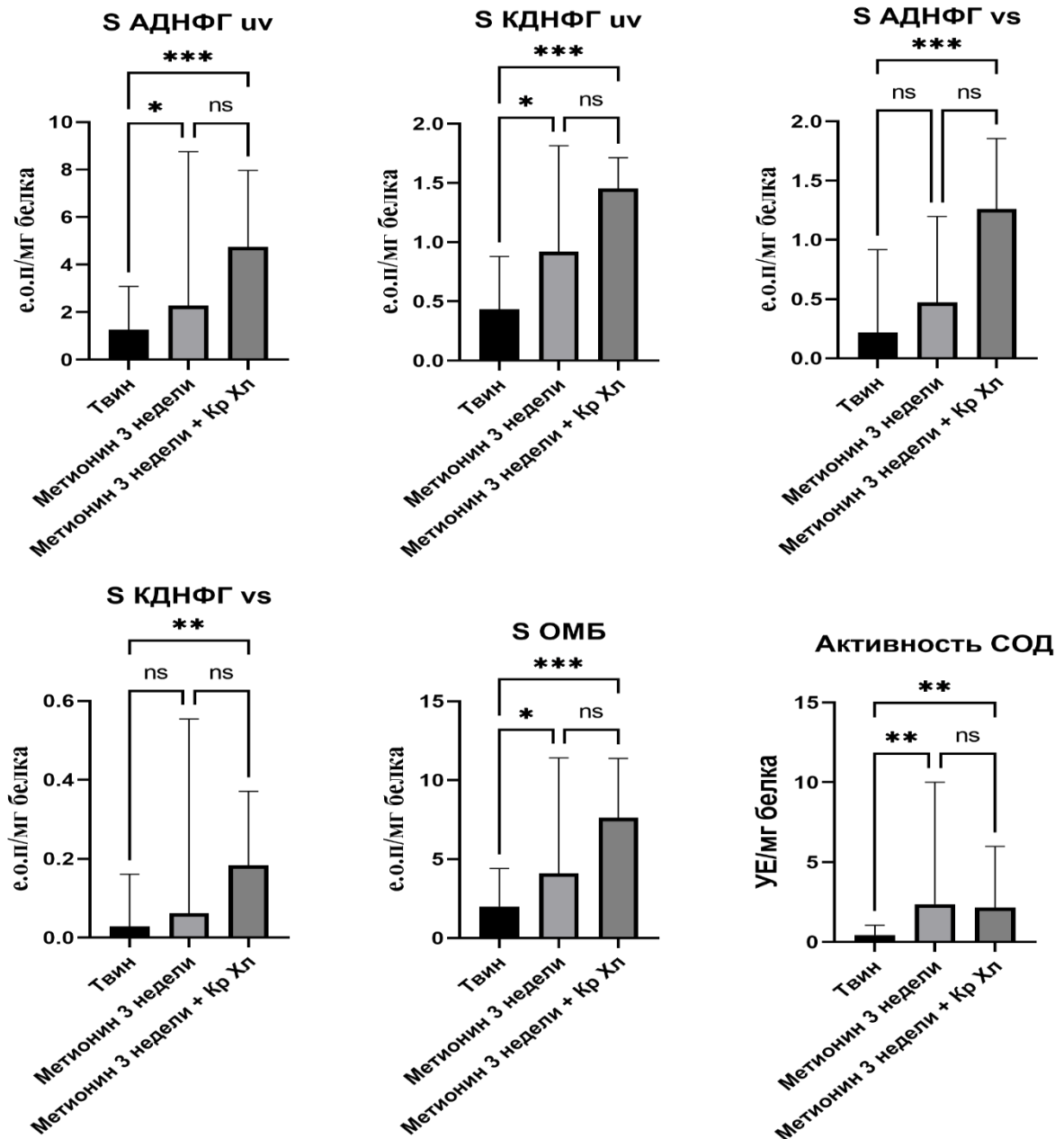


Рисунок 62 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на биохимические показатели - маркеры окислительного стресса митохондриальной фракции сердца при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - результаты статистически не значимы ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

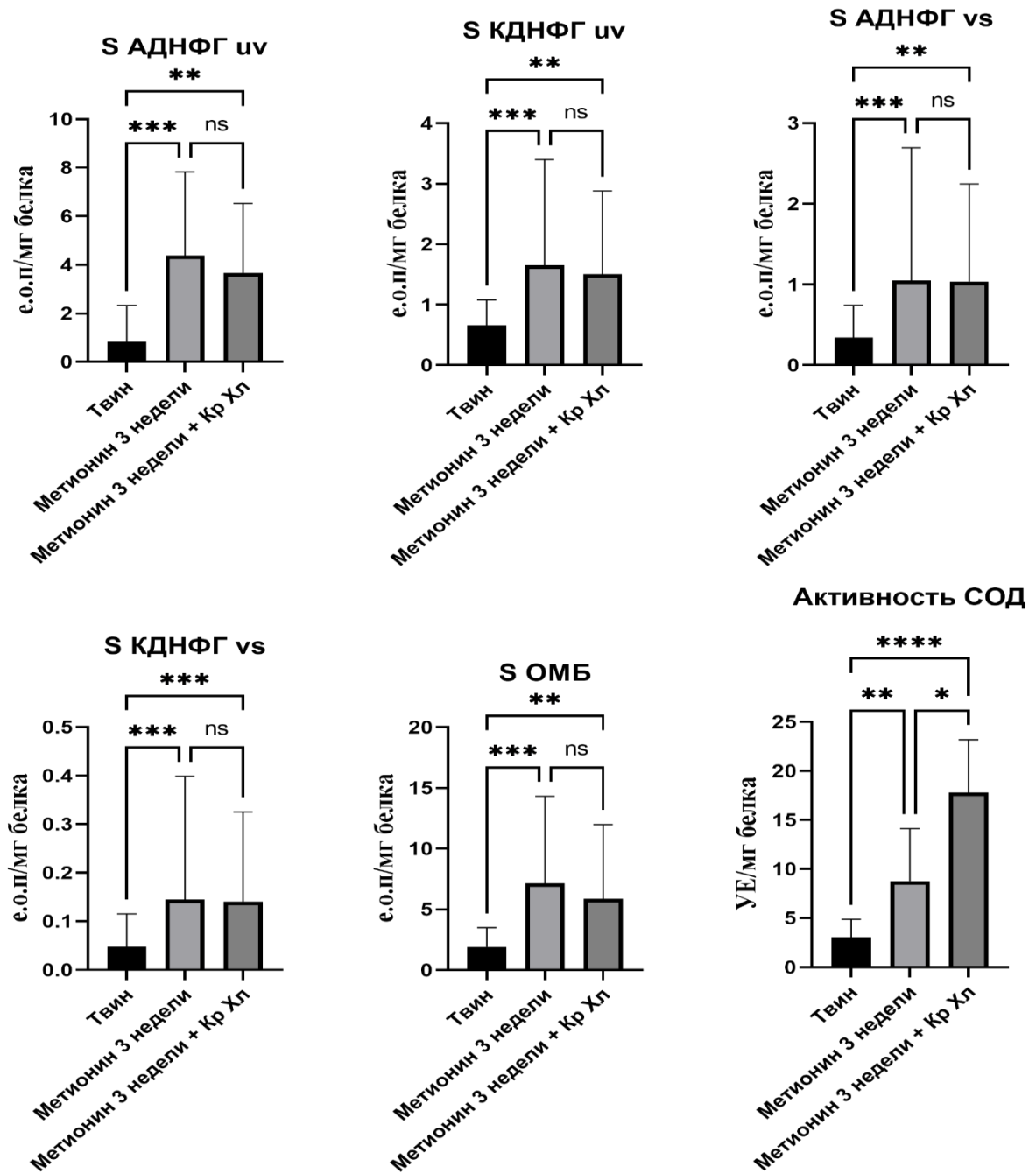


Рисунок 63 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на биохимические показатели маркеры окислительного стресса митохондрий печени при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом ** отмечены различия групп при $p < 0,01$, символом ***- различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

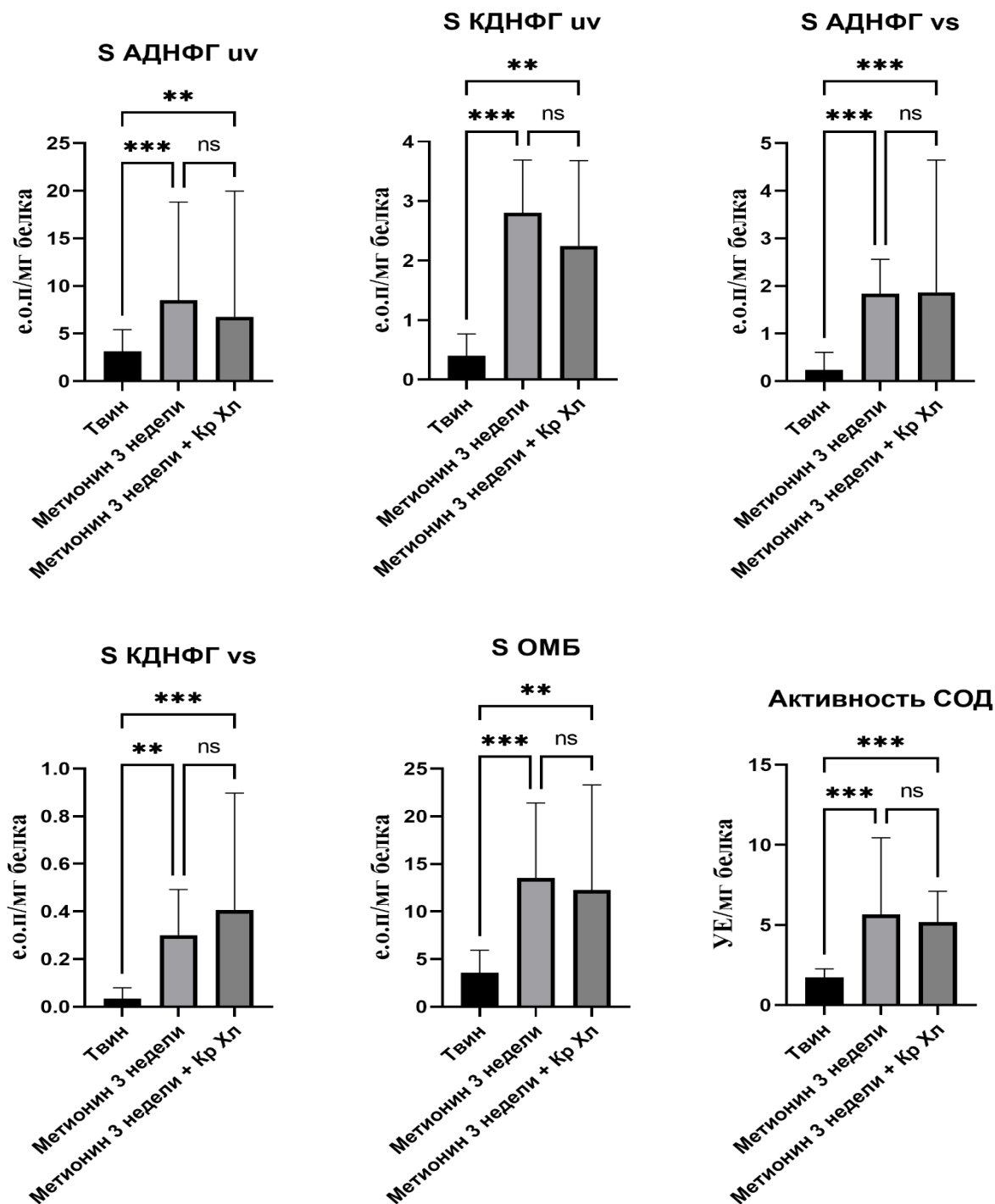


Рисунок 64 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на биохимические показатели - маркеры окислительного стресса митохондрий головки эпидидимиса

Примечание: символом ** отмечены различия групп при $p < 0,01$, символом *** отмечены различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Активность СОД в митохондриях сердца и головки придатка яичка статистически значимо также не изменялась, а в митохондриях печени активность исследуемого фермента была в 2 раза ($p=0,0009$) выше, чем у группы с гипергомоцистеинемией.

В хвосте эпидидимиса карнитина хлорид способствовал снижению уровня ОМБ в 4 раза ($p=0,0009$) относительно группы с гипергомоцистеинемией и был сопоставим с показателями контрольной группы (Рисунок 65). Активность СОД снижалась в 2,1 раза ($p=0,0052$) относительно модели ГГЦ, но оставалась выше контрольных значений.

Карнитина хлорид статистически значимо предотвращал истощение РАП окислительной модификации белков в обоих отделах эпидидимиса (Рисунок 66).

Таким образом, применение карнитина хлорида в условиях моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии позволило установить эффект, связанный с уменьшением выраженности гипергомоцистеинемии. Удаление избыточного метионина способно предупреждать развитие осложнений, связанных с нарушением его метаболизма. Карнитина хлорид повышал содержание метаболитов NO во всех субклеточных фракциях исследуемых органов, за исключением каудального отдела эпидидимиса. Карнитина хлорид способен стимулировать процесс генерации NO, как непосредственным путем, влияя на уровень NOS, но этот процесс является тканеспецифичным и обнаружен только в изучаемых отделах эпидидимиса, так и опосредованно, уменьшая содержание гомоцистеина.

Моделирование гипергомоцистеинемии на фоне назначения карнитина хлорида демонстрировало реализацию различных типов реакций клеток головки и хвоста придатка яичка крыс в патологических условиях. В головке эпидидимиса наблюдались процессы, связанные с поддержанием биоэнергетических процессов - увеличение уровня лактата в митохондриях, при одновременном увеличении лактатдегидрогеназной активности митохондрий. В тканях хвоста отмечались изменения, ассоциированные с уменьшением образования окислительно-модифицированных белков.

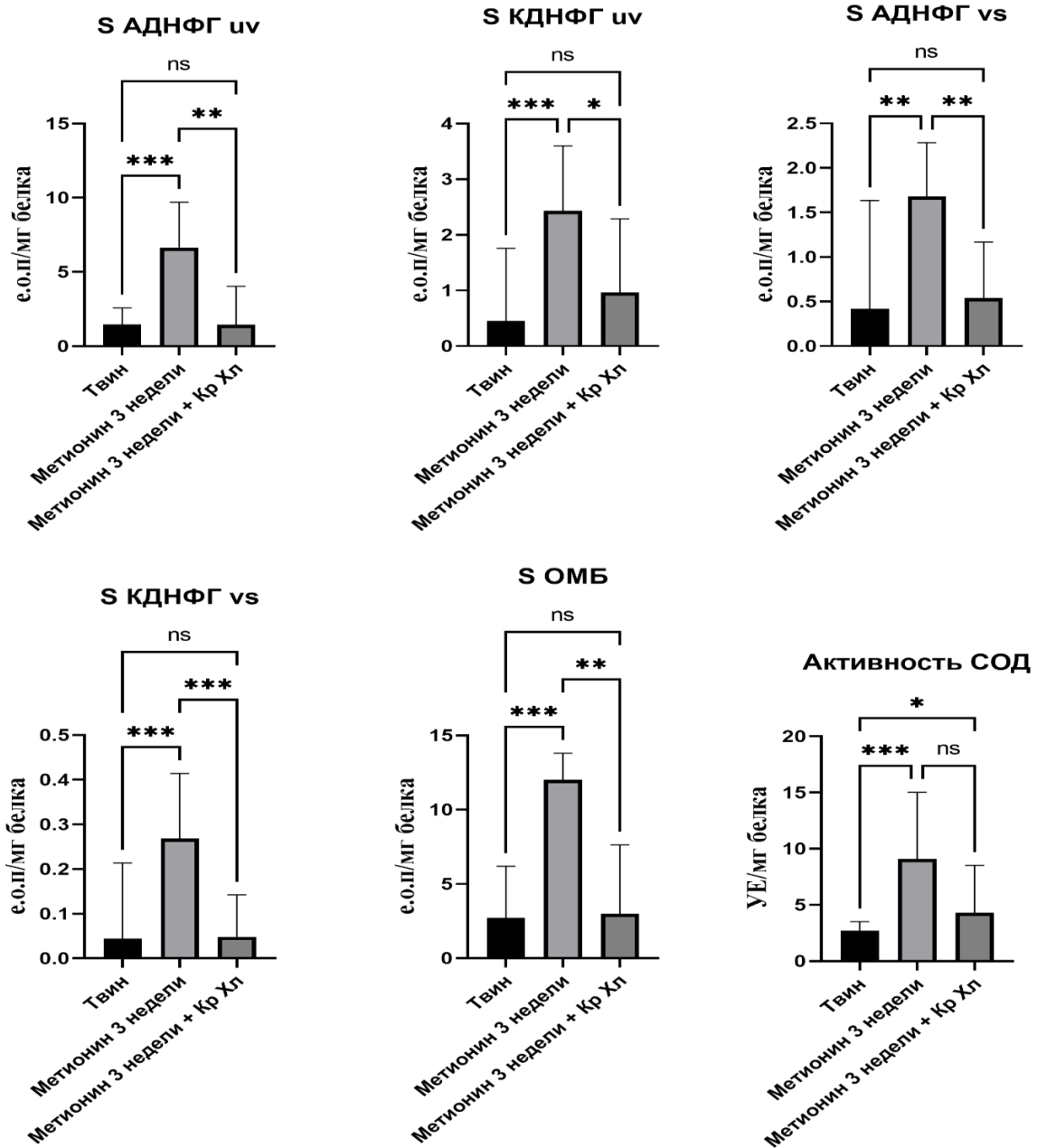


Рисунок 65 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на биохимические показатели -

маркеры окислительного стресса митохондрий хвоста эпидидимиса

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

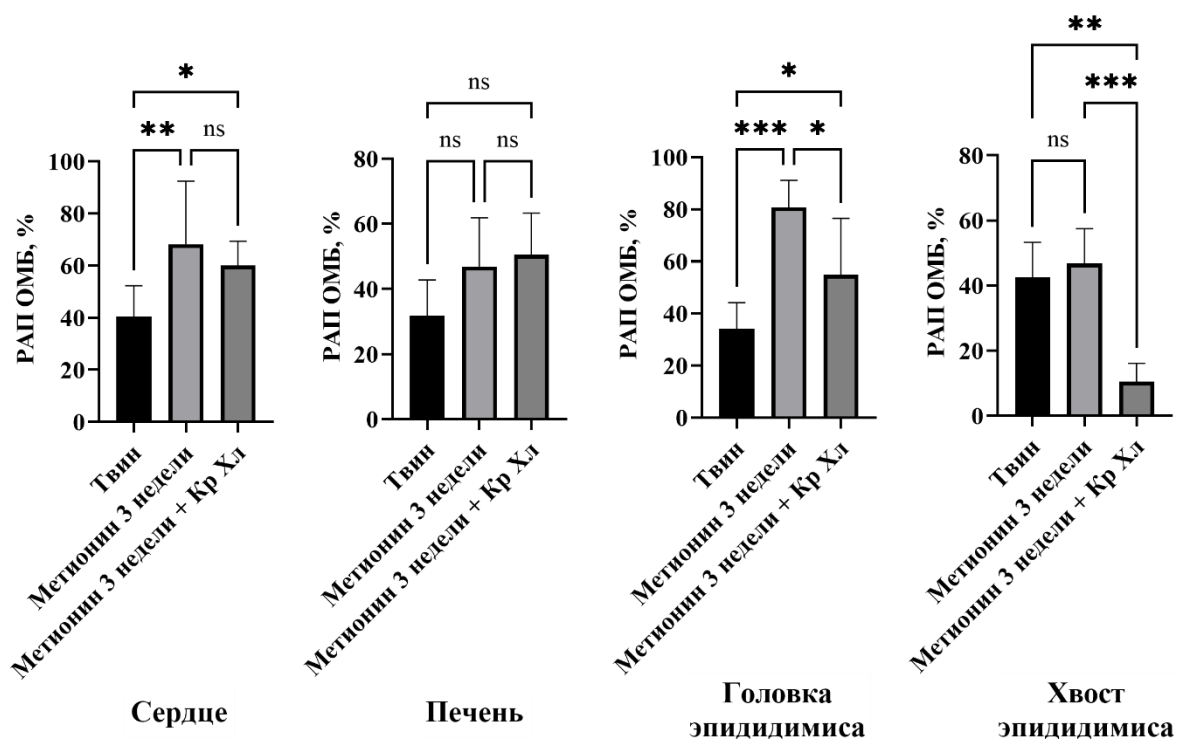


Рисунок 66 – Влияние карнитина хлорида на биохимические показатели резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков в митохондриях исследуемых органов при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

3.3. Сравнительная оценка функциональной активности митохондрий при экспериментальном дефиците NO и гипергомоцистеинемии

Анализ полученных данных показывает, что гипергомоцистеинемия приводила к статистически значимому снижению метаболитов NO в сыворотке крови и субклеточных фракций исследуемых органов, за исключением хвоста придатка яичка, поэтому было важно сравнить паттерн изменений, исследуемых биохимических показателей митохондрий, возникающий при снижении уровня NO_x в условиях гипергомоцистеинемии и экспериментального дефицита NO, опосредованного введением неселективного ингибитора NO-синтаз - L-NAME.

Дальнейшие исследования показали, что назначение L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывало статистически значимое снижение NO_x в сыворотке крови (Рисунок 67), цитоплазме клеток головки эпидидимиса (Таблица 34) и митохондриях сердца, головки и хвоста придатка яичка (Рисунок 68).

При использовании L-NAME в дозе 200 мг/кг эффект ингибирования NO-синтаз был выражен сильнее и сопровождался падением уровня NO_x в субклеточных фракциях сердца, печени, головки эпидидимиса. При тяжелой форме гипергомоцистеинемии снижение NO_x отмечалось также во всех субклеточных фракциях, кроме хвоста эпидидимиса.

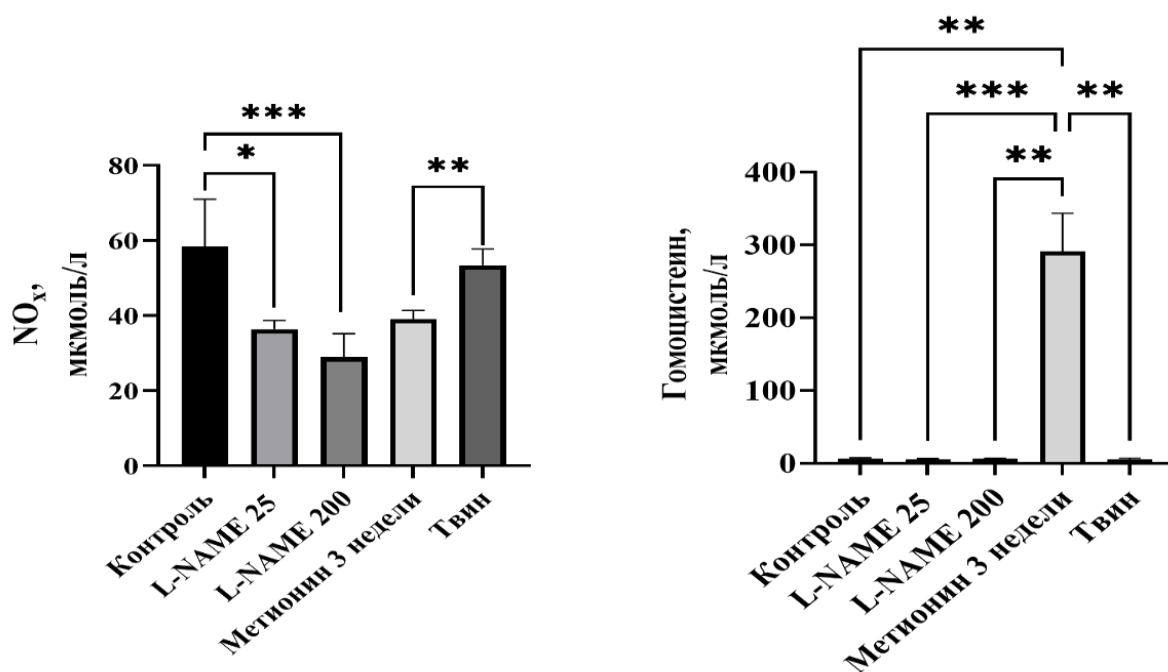


Рисунок 67 – Сравнительная оценка изменения уровня NO_x и гомоцистеина при L-NAME-опосредованном дефиците NO и гипергомоцистеинемии в сыворотке крови, Me [Q₁; Q₃]

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** отмечены различия групп при $p < 0,01$, символом *** отмечены различия групп при $p < 0,001$. Значения представлены как Me[Q₁;Q₃]

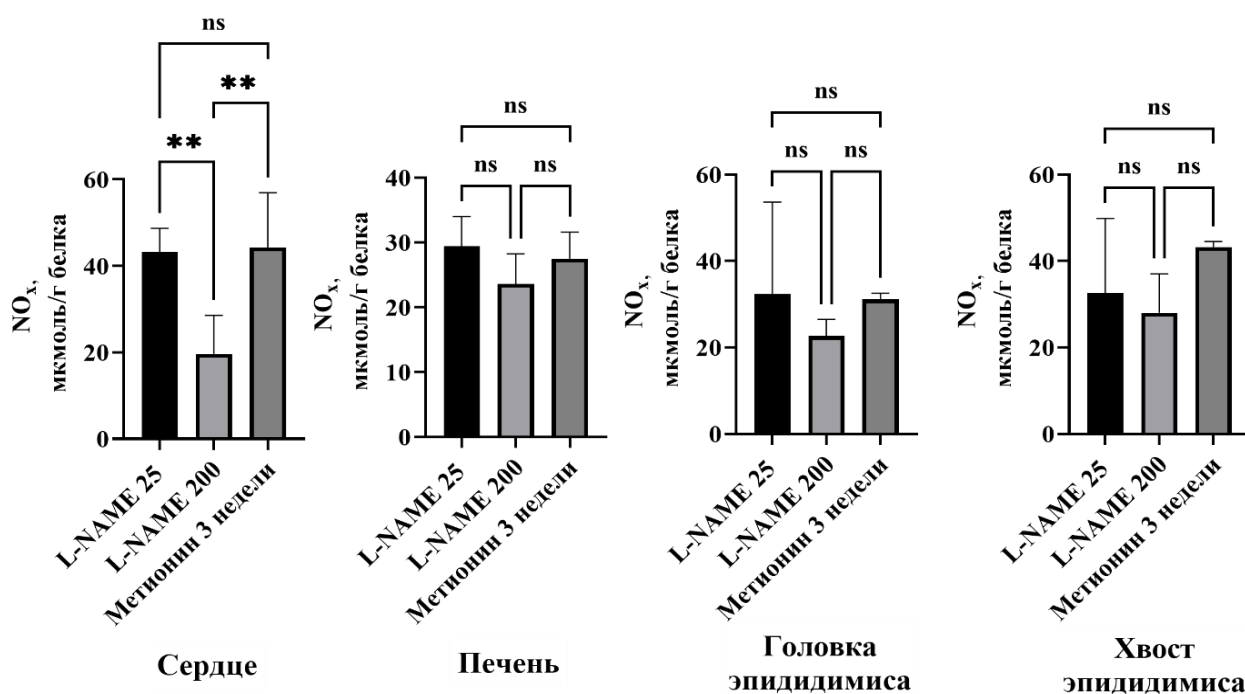


Рисунок 68 – Сравнительная оценка изменения уровня NO_x в митохондриальной фракции печени и сердца при L-NAME-опосредованном дефиците NO и гипергомоцистеинемии

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** отмечены различия групп при $p < 0,01$, символом *** отмечены различия групп при $p < 0,001$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Таблица 34 – Сравнительная оценка изменения уровня NO_x в цитоплазме клеток исследуемых органов при введении L-NAME и гипергомоцистеинемии, мкмоль/г белка: Me [Q₁; Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Цитоплазма				
Контроль 1 ТВИН (1)	45,53 [34,0; 53,1]	76,99 [70,04;82,29]	46,19 [36,25; 48,61]	59,84 [57,29;75,57]
Метионин 3 недели (ГГЦ)	28,85 [23,95;34,34]* p=0,01008	29,41 [26,94;32,66]* p=0,00094	32,14 [27,25; 34,09]* p=0,00276	59,97 [52,35;66,56] p=0,6365

Продолжение Таблицы 34

Физиологический раствор (контроль2)	31,81 [29,23;41,87]	24,13 [20,34;32,0]	45,98 [41,1; 49,13]	58,20 [52,13; 69,2]
L-NAME 25 мг/кг 7 суток	24,27 [21,74;30,13] p=0,05203	20,51 [18,12;23,83] p=0,1278	34,65 [29,68; 40,17]* p=0,001008	54,58 [46,33;62,22] p=0,3708
L-NAME 200 мг/кг 7 суток	22,87 [17,87;25,32]* p=0,00530	18,21 [15,36;19,11]* p=0,00277	28,13 [24,49; 33,6]* p=0,00094	50,09 [44,42;56,54] p=0,05203

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы при $p < 0,05$: ГГЦ - контроль1; L-NAME 25 и 200 мг/кг - контроль 2

Дефицит NO_x при назначении L-NAME опосредуется неконкурентным ингибированием NO-синтаз, обнаруженное же снижение содержания NO_x в условиях повышенного уровня гомоцистеина, возможно, за счет следующих механизмов. Из литературных данных, известно, что в присутствии ионов металлов переменной валентности гомоцистеин путем медленного аутоокисления способен генерировать супероксидный анион, который может вызывать окисление тетрагидробиоптерина – кофермента NO-синтазы [317]. Нсу также способен увеличивать утечку супероксида из дыхательной цепи [147]. Дисбаланс в электронтранспортной цепи может увеличить концентрацию АФК в митохондриях и вызывать окислительный стресс вблизи мест их образования, тем самым усиливая дисфункцию цепи и приводя к порочному циклу образования АФК. Увеличение карбонилирования белков при экспериментальной гипергомоцистеинемии подтверждает факт повышения генерации АФК в митохондриях исследуемых органов.

Кроме того, известно, что гомоцистеин может ингибировать фермент - диметиларгининдиметиламиногидролазу (DDAH 1,2), участвующий в деградации АДМА, ингибитора NO-синтаз [148]. Имеются данные, что повышенные концентрации гомоцистеина могут вызывать нарушение транспорта через мембраны аргинина - субстрата NO-синтаз [149]. Также следует учитывать

возможность превращения NO в пероксинитрит при формировании окислительного стресса, вызванного избытком гомоцистеина.

Таким образом, представленные данные говорят о возможной немаловажной роли гомоцистеина в нарушении метаболизма оксида азота (II).

При сравнении площадей под кривой абсорбции света в митохондриях сердца выявлено, что у животных с тяжелой формой гипергомоцистеинемии, отмечалось повышение общего количества карбонильных производных белков в 2 раза ($p=0,0136$) относительно контрольной группы, преимущественно за счёт АДНФГ нейтрального и основного характера, а также КДНФГ нейтральных аминокислот (Рисунок 69). У крыс же, которым вводился L-NAME, отмечалось аналогичное увеличение общего количества карбонильных производных в 1,68 раза ($p=0,0100$; $p=0,0136$) при обеих используемых дозах ингибитора относительно группы контроля с введением физраствора, при дозе L-NAME 25 мг/кг, в основном за счёт АДНФГ и КДНФГ нейтрального характера, при дозе 200 мг/кг повышаются АДНФГ нейтрального и основного характера. Но, в целом анализируя площадь под кривой адсорбции света, мы можем наблюдать, что L-NAME - опосредованный дефицит NO приводит к более выраженному окислительному повреждению белков митохондрий сердца.

Истощение РАП относительно контрольных групп наблюдалось в обеих экспериментальных сравниваемых сериях, что свидетельствует о сниженной способности митохондрий адаптироваться в условиях окислительного стресса.

Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в митохондриях печени (Рисунок 70) увеличивалось при использовании ингибитора NO – L-NAME в дозе 25 мг/кг преимущественно за счет повреждения нейтральных аминокислот. При увеличении дозы ингибитора до 200 мг/кг происходило неизбирательное разрушение как нейтральных, так и основных аминокислот, как за счет АДНФГ, так и за счет КДНФГ. Подобные, вызванные L-NAME в дозе 200 мг/кг, изменения наблюдались и при тяжелой форме гипергомоцистеинемии.

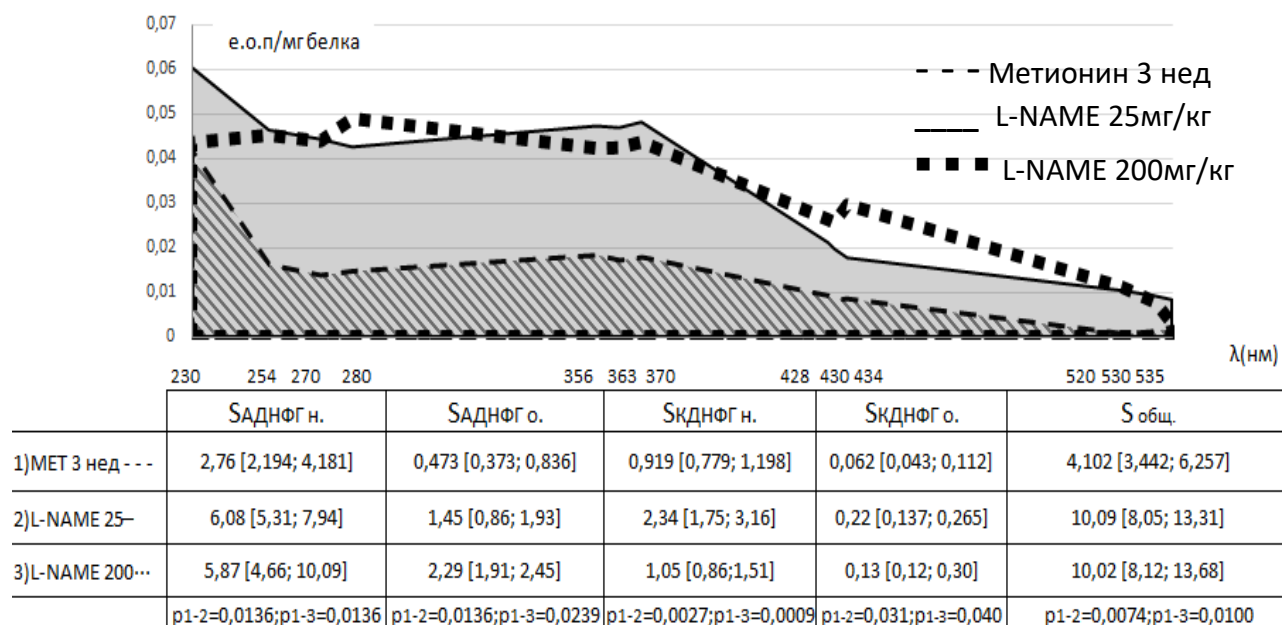


Рисунок 69 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в митохондриях кардиомиоцитов под действием L-NAME и гипергомоцистеинемии (е.о.п/мг белка, Me[Q₁;Q₃])

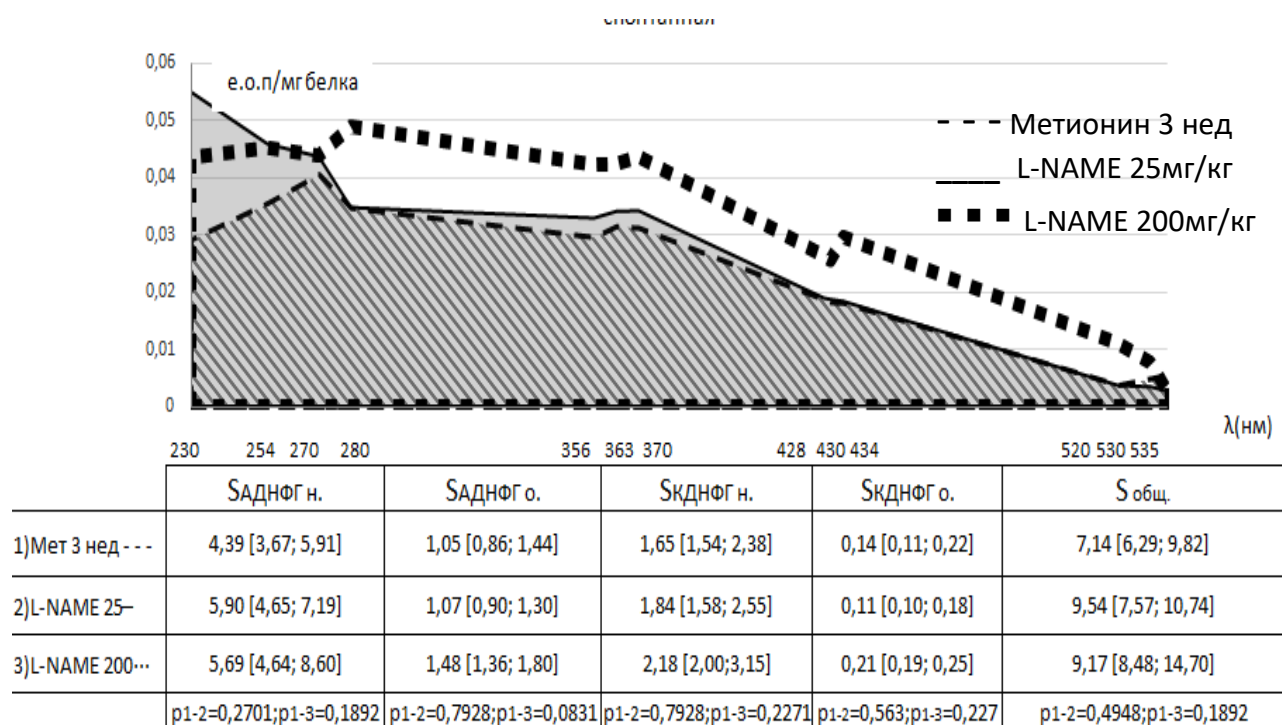


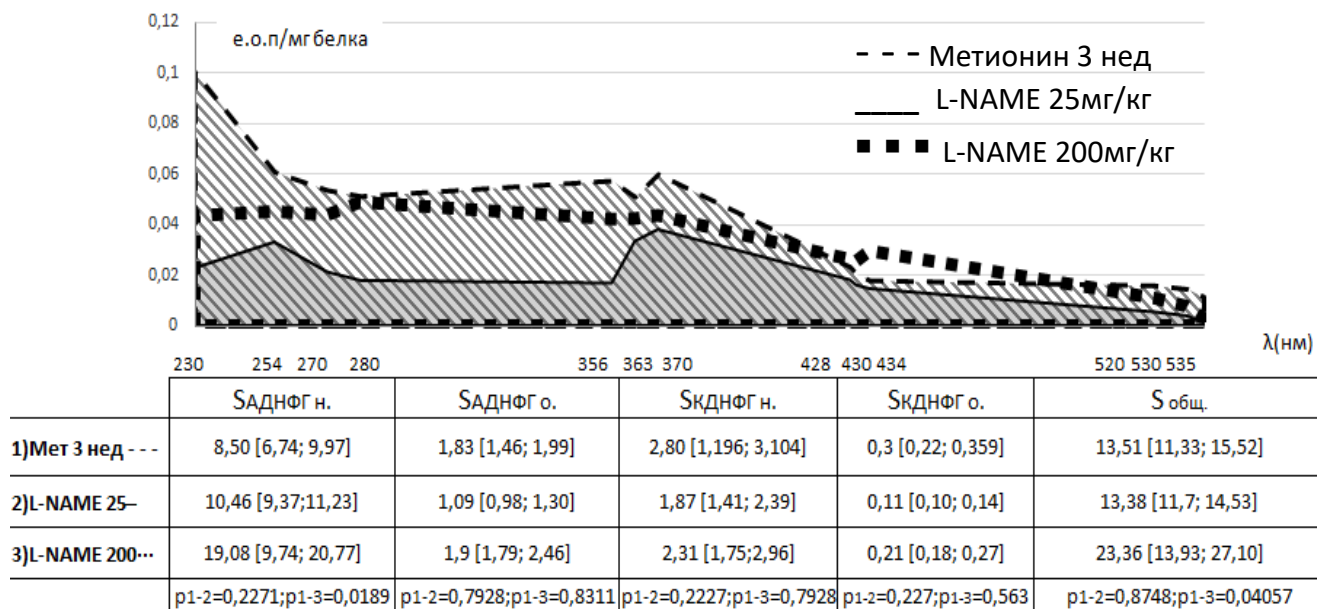
Рисунок 70 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в митохондриях печени крыс под действием L-NAME и гипергомоцистеинемии (е.о.п/мг белка, Me[Q₁;Q₃])

Интересен тот факт, что, хотя отмечалась интенсификация процессов окислительной модификации белков в митохондриях печени, резервно-адаптационный потенциал исследуемого органа статистически значимо не изменялся при гипергомоцистеинемии, но снижался при использовании L-NAME в дозе 200 мг/кг. Активность СОД увеличивалась в ответ на действие ингибитора NO-синтаз в дозе 25 мг/кг, что может свидетельствовать о высоких адаптационных возможностях данного органа даже в условиях окислительного стресса.

Площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ митохондрий эпидидимиса как при гипергомоцистеинемии, так и при L-NAME-индуцированном дефиците NO статистически значимо возрастала, наблюдался прирост количества карбонильных производных аминокислот нейтрального и основного характера как за счёт АДНФГ, так и за счёт КДНФГ относительно соответствующих контрольных групп (Рисунок 71). Однако, в условиях метиониновой нагрузки общая площадь под кривой адсорбции света спонтанной ОМБ возрастала в головке придатка яичка в 3,78 раза ($p=0,0009$), в его каудальной части - в 4,4 раза ($p=0,0009$); при использовании ингибитора NOS в дозе 25 мг/кг: в головке - в 1,8 ($p=0,0009$), в хвосте в 1,3 раза ($p=0,0009$), при увеличении дозы ингибитора до 200 мг/кг: в головке в 3,2 ($p=0,0009$) и хвосте - 1,5 раза ($p=0,0136$).

Таким образом, степень окислительного повреждения белков головки эпидидимиса при гипергомоцистеинемии соотносится с L-NAME-индуцированным дефицитом NO в дозе 200 мг/кг, хвостовой отдел придатка яичка в условиях ингибирования NO-синтаз оказался более устойчив к окислительной деструкции протеинов.

А



В

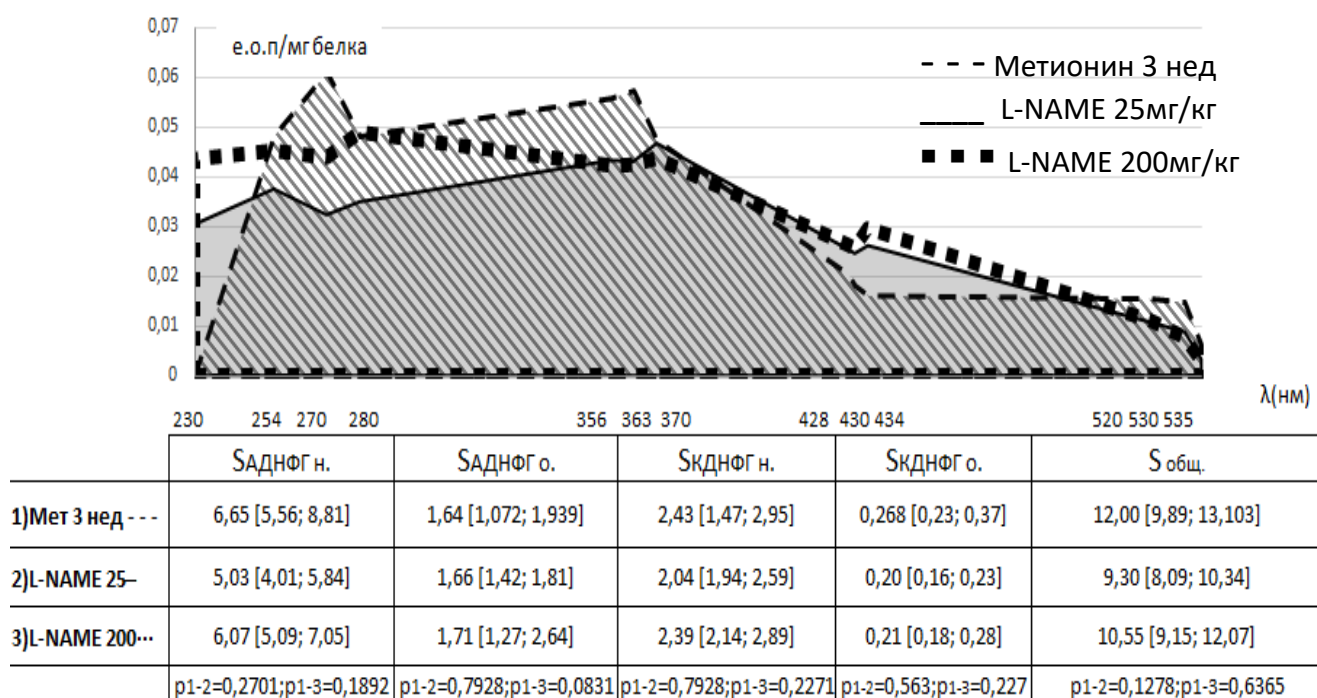


Рисунок 71 – Сравнительный анализ спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ и их компонентов в митохондриях
 А) головки эпидидимиса В) хвоста эпидидимиса крыс под действием L-NAME и гипергомоцистеинемии (е.о.п/мг белка, Me[Q₁;Q₃])

Истощение РАП в митохондриях головки эпидидимиса при гипергомоцистеинемии сходно с L-NAME-индуцированным дефицитом NO и было выше в 2,37 раз ($p=0,0010$) относительно уровня контрольных животных при гипергомоцистеинемии и в 2,44 ($p=0,0019$) и 2,31 ($p=0,0013$) раз при использовании L-NAME в дозе 25 и 200 мг, соответственно, при этом в хвосте придатка яичка в условиях метиониновой нагрузки РАП оставался на уровне контрольных значений (Рисунок 73), а при назначении L-NAME, повышался в 1,56 ($p=0,0074$) и 1,92 ($p=0,0013$) раза соответственно. Наблюдаемое истощение резервно-адаптационного потенциала митохондрий эпидидимиса свидетельствует об их сниженной способности адаптироваться в условиях окислительного стресса, при этом каудальный отдел эпидидимиса оказывается более устойчивым к окислительному повреждению в условиях метиониновой нагрузки.

При экспериментальной гипергомоцистеинемии активность СОД повышалась, что создавало условия для компенсации окислительного стресса, при этом уровень митохондриальной СОД в условиях воздействия L-NAME как в дозе 25, так и в 200 мг/кг дозе снижался. Таким образом, L-NAME-индуцированный окислительный стресс являлся не только следствием повышенной продукции АФК, но и следствием нарушения защитных антиоксидантных механизмов.

Определенное сходство изменения показателей биоэнергетического обмена наблюдалось в митохондриях эпидидимиса в условиях гипергомоцистеинемии и L-NAME-индуцированного дефицита NO (II) [363]. И введение метионина, и назначение L-NAME вызывали снижение активности СДГ, H^+ -АТФазы (Рисунок 73) относительно соответствующего контроля.

В митохондриях же кардиомиоцитов зафиксирована несколько иная тенденция: в условиях гипергомоцистеинемии отмечалось снижение активности СДГ и увеличение ЛДГ с сопутствующим повышением концентрации лактата (Рисунок 72). При экспериментальном дефиците NO, активность СДГ и H^+ АТФазы уменьшалась только при назначении высокой дозы ингибитора, содержание лактата при этом статистически значимо не изменялось.

И совсем противоположная реакция отмечалась в митохондриях ткани печени, где повышение концентрации гомоцистеина приводило к увеличению активности всех исследуемых ферментов, вовлеченных в биоэнергетические процессы (Рисунок 72). В условиях же NO - дефицитного состояния, вызванного L-NAME, активность определяемых ферментов и концентрация лактата не изменялась относительно контроля.

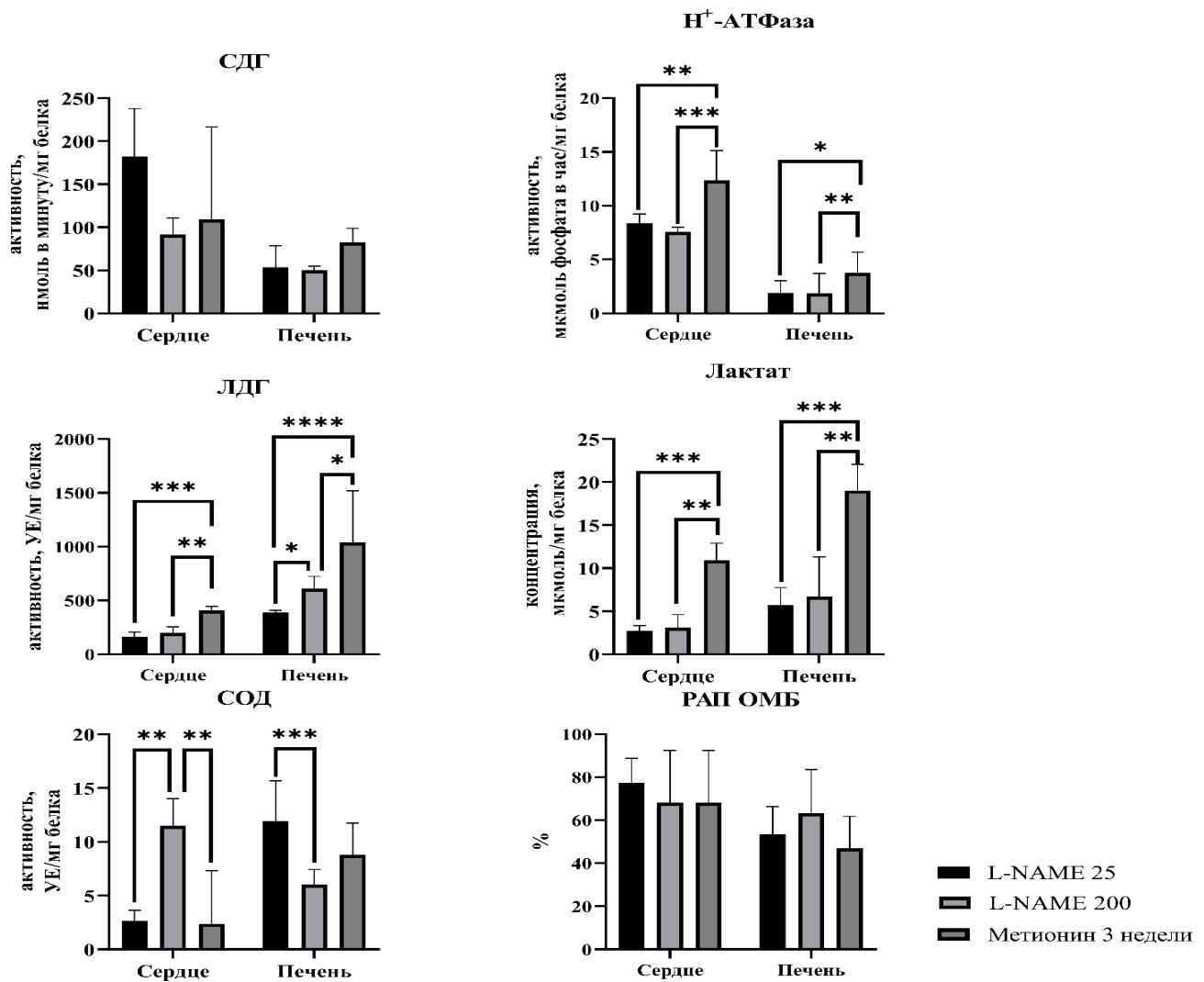


Рисунок 72 – Сравнение активности исследуемых ферментов, концентрации лактата и РАП белков митохондрий сердца и печени при введении L-NAME и гипергомоцистеинемии

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом **** - различия групп при $p < 0,0001$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

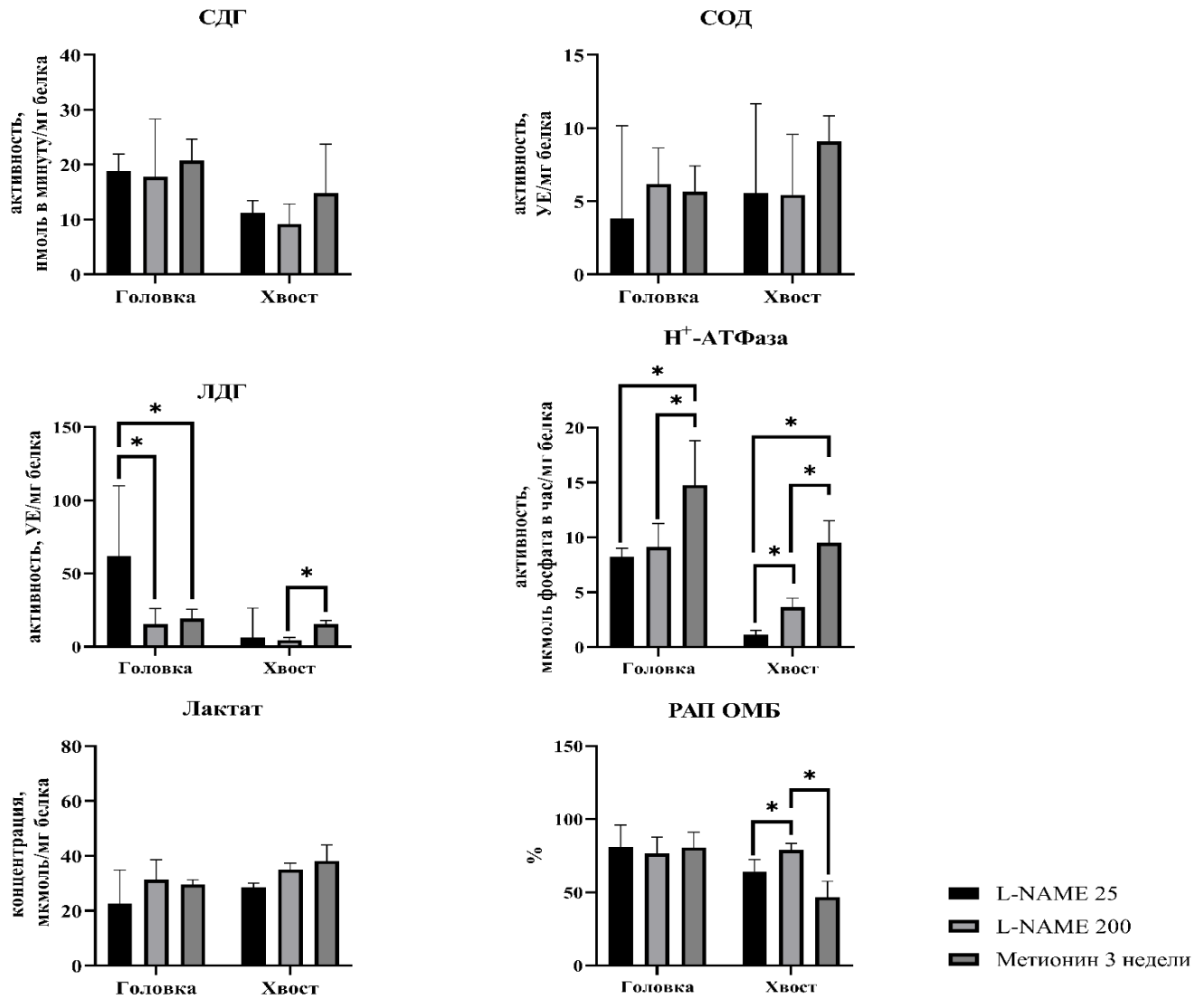


Рисунок 73 – Сравнение активности исследуемых ферментов, концентрации лактата и РАП ОМБ митохондрий эпидидимиса при введении L-NAME и гипергомоцистеинемии

Примечание: символом * отмечены статистически значимые отличия между исследуемыми группами при $p < 0,0167$. Результаты представлены в виде Me [Q1;Q3]

Таким образом, при, казалось бы, похожей тенденции изменения биохимических показателей окислительного стресса, биоэнергетических процессов в условиях окислительного стресса, связанного с дефицитом NO, мы наблюдаем различные механизмы формирования этих эффектов и, самое главное, сильно отличающиеся адаптационные возможности исследуемых тканей и органов. Так, в митохондриях головки эпидидимиса наблюдались явления,

ассоциированные с изменением биоэнергетических процессов - увеличение уровня лактата в митохондриях, при одновременном уменьшении активности лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и H^+ -АТФазы митохондрий. В тканях хвоста эпидидимиса отмечались сдвиги, которые носили в большей степени защитный характер, направленный на поддержку его функциональной активности в условиях окислительного стресса. Митохондрии ткани печени показали наибольшую устойчивость к оксидативному повреждению, при этом концентрация метаболитов NO статистически значимо снижалась в них только под воздействием высокой дозы ингибитора, что возможно, объясняется наличием высокого потока субстратов, проходящего через катаплеротические и анаплеротические пути, в том числе и содержания эндогенного аргинина, являющегося субстратом NO-синтазы.

3.4. Взаимосвязь между уровнем карнитина и метаболитов оксида азота в исследуемых тканях, а также содержанием гомоцистеина в сыворотке крови при изученных патологических состояниях

Между фракциями карнитина и уровнем метаболитов NO_x в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток исследуемых органов была определена корреляционная связь при использовании ингибитора NO-синтаз - L-NAME в дозах 25 мг/кг и 200 мг/кг (Таблица 35). Результаты этого исследования показали наличие сильной положительной корреляционной зависимости между NO_x и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови; между NO_x и уровнем свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме головки эпидидимиса. Умеренная положительная взаимосвязь - между NO_x и содержанием общего и свободного карнитина выявлена в цитоплазме клеток и митохондриях сердца, цитоплазме клеток печени; в митохондриях головки эпидидимиса - между NO_x и содержанием общего карнитина.

Таблица 35 - Корреляционная взаимосвязь между фракциями карнитина и NO_x в сыворотке крови и исследуемых органах

Исследуемые параметры	Коэффициент корреляции Спирмена	р	Коэффициент корреляции Спирмена	р
Физ.раствор – L-NAME 25 – L-NAME 200			Твин - ГГЦ	
Сыворотка крови				
NO _x – Карнитин общий	0,76	0,000015	0,31	0,2390
NO _x – Карнитин свободный	0,68	0,00024	0,39	0,1284
NO _x – Карнитин связанный	0,78	0,000005	0,45	0,0834
Цитоплазматическая фракция сердца				
NO _x – Карнитин общий	0,56	0,00428	0,68	0,00339
NO _x – Карнитин свободный	0,59	0,0023	0,60	0,01342
NO _x – Карнитин связанный	-0,14	0,4906	0,61	0,0178
Митохондриальная фракция сердца				
NO _x – Карнитин общий	0,60	0,001727	0,81	0,000109
NO _x – Карнитин свободный	0,71	0,000077	0,74	0,000948
NO _x – Карнитин связанный	0,17	0,4019	0,76	0,00056
Цитоплазматическая фракция печени				
NO _x – Карнитин общий	0,58	0,00252	0,67	0,00471
NO _x – Карнитин свободный	0,62	0,00125	0,61	0,01127
NO _x – Карнитин связанный	-0,37	0,07045	0,68	0,00780
Митохондриальная фракция печени				
NO _x – Карнитин общий	0,47	0,01906	0,75	0,000761
NO _x – Карнитин свободный	0,41	0,0453	0,77	0,000477
NO _x – Карнитин связанный	0,48	0,01646	0,705	0,002246
Цитоплазматическая фракция головки эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,60	0,00179	0,68	0,00358
NO _x – Карнитин свободный	0,73	0,000037	0,66	0,00496
NO _x – Карнитин связанный	-0,27	0,1982	0,70	0,00238

Митохондриальная фракция головки эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,66	0,00039	0,38	0,1415
NO _x – Карнитин свободный	0,4	0,8369	0,44	0,0834
NO _x – Карнитин связанный	0,56	0,00400	0,45	0,0778
Цитоплазматическая фракция хвоста эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,32	0,1263	0,32	0,2171
NO _x – Карнитин свободный	0,40	0,05203	0,19	0,4644
NO _x – Карнитин связанный	-0,22	0,2957	0,37	0,1506
Митохондриальная фракция хвоста эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,40	0,8306	0,13	0,6251
NO _x – Карнитин свободный	0,40	0,0498	0,12	0,6328
NO _x – Карнитин связанный	-0,62	0,00120	0,11	0,6802

Между уровнем NO_x и общего карнитина в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии в сыворотке крови не обнаруживается статистически значимых корреляционных взаимосвязей. При этом в митохондриях сердца и печени выявлены сильные положительные взаимодействия, а в цитоплазме клеток сердца, печени и головки эпидидимиса - умеренные корреляционные связи, что говорит о системном характере взаимосвязи изучаемых показателей.

На следующем этапе было проанализировано влияние экзогенно введенного L-карнитина на уровень метаболитов NO в митохондриях и цитоплазме клеток исследуемых органов в условиях экспериментальных моделей (Рисунок 74,75).

Назначение карнитина хлорида при L-NAME-опосредованном дефиците NO в дозе ингибитора 25 мг/кг приводило к статистически значимому повышению уровня NO_x в цитоплазме клеток обоих отделов эпидидимиса, при увеличении дозы L-NAME до 200 мг/кг, содержание NO_x повышалось только в цитоплазме клеток сердца. В митохондриях всех исследуемых органов карнитина хлорид способствовал повышению содержания NO_x при совместном введении с L-NAME

в дозе 200 м/кг и обоих отделах эпидидимиса - при дозе ингибитора 25 мг/кг, в митохондриях сердца в этих условиях содержание NO_x снижалось.

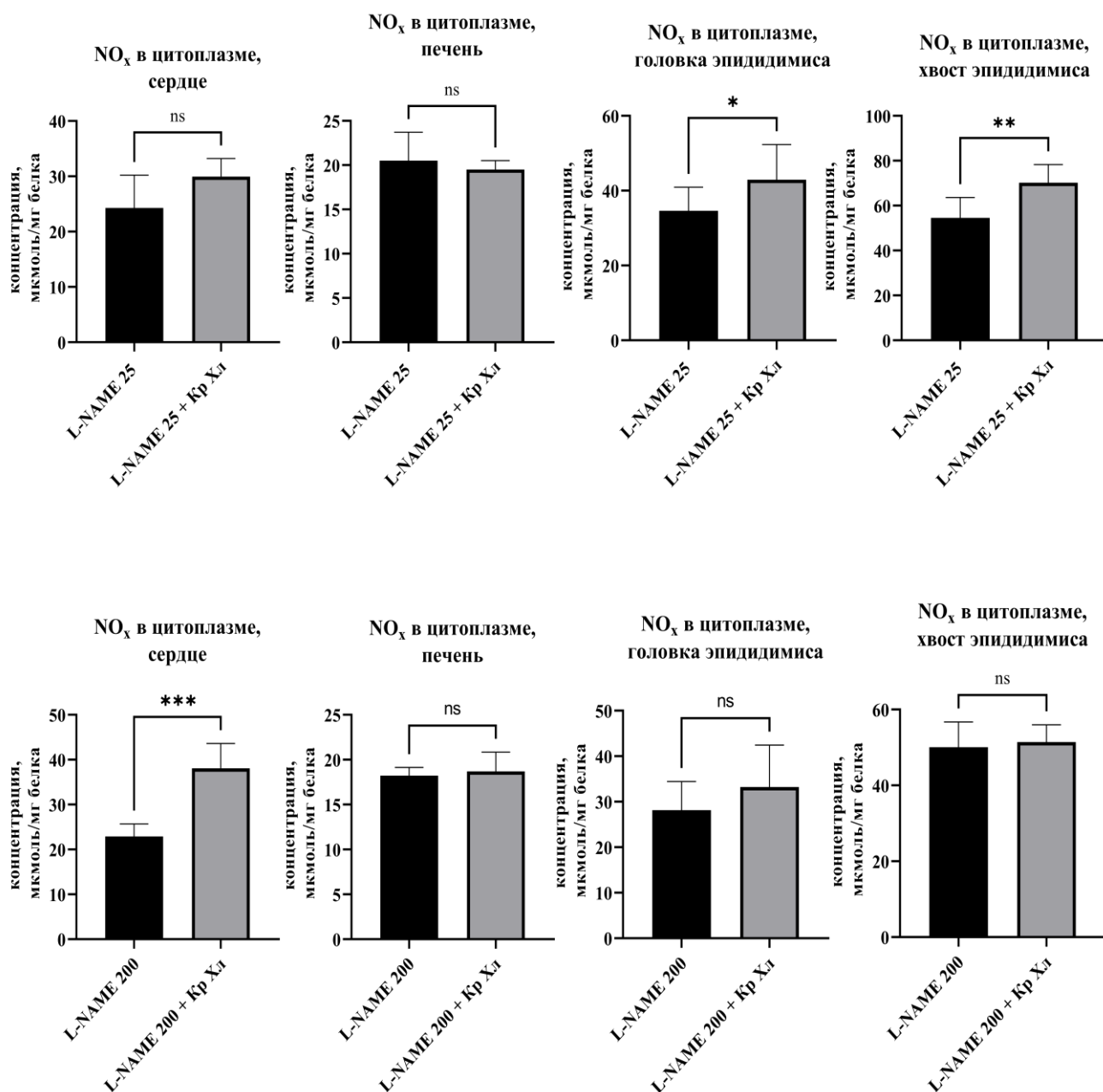


Рисунок 74 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень NO_x в цитоплазме клеток исследуемых органов при введении L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$).

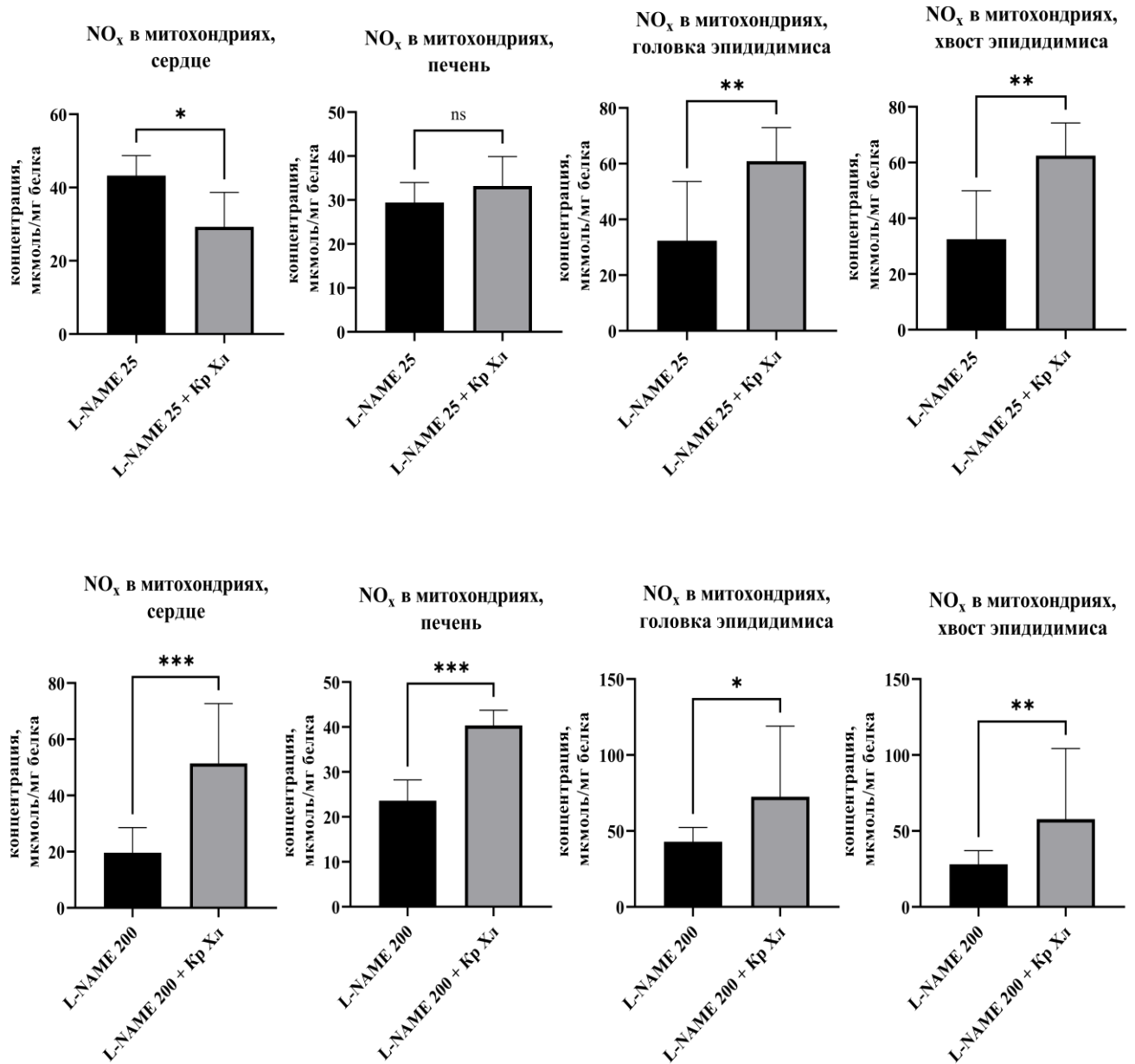


Рисунок 75 – Влияние карнитина хлорида на уровень метаболитов NO в митохондриях исследуемых органов при введении L-NAME

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически не значимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

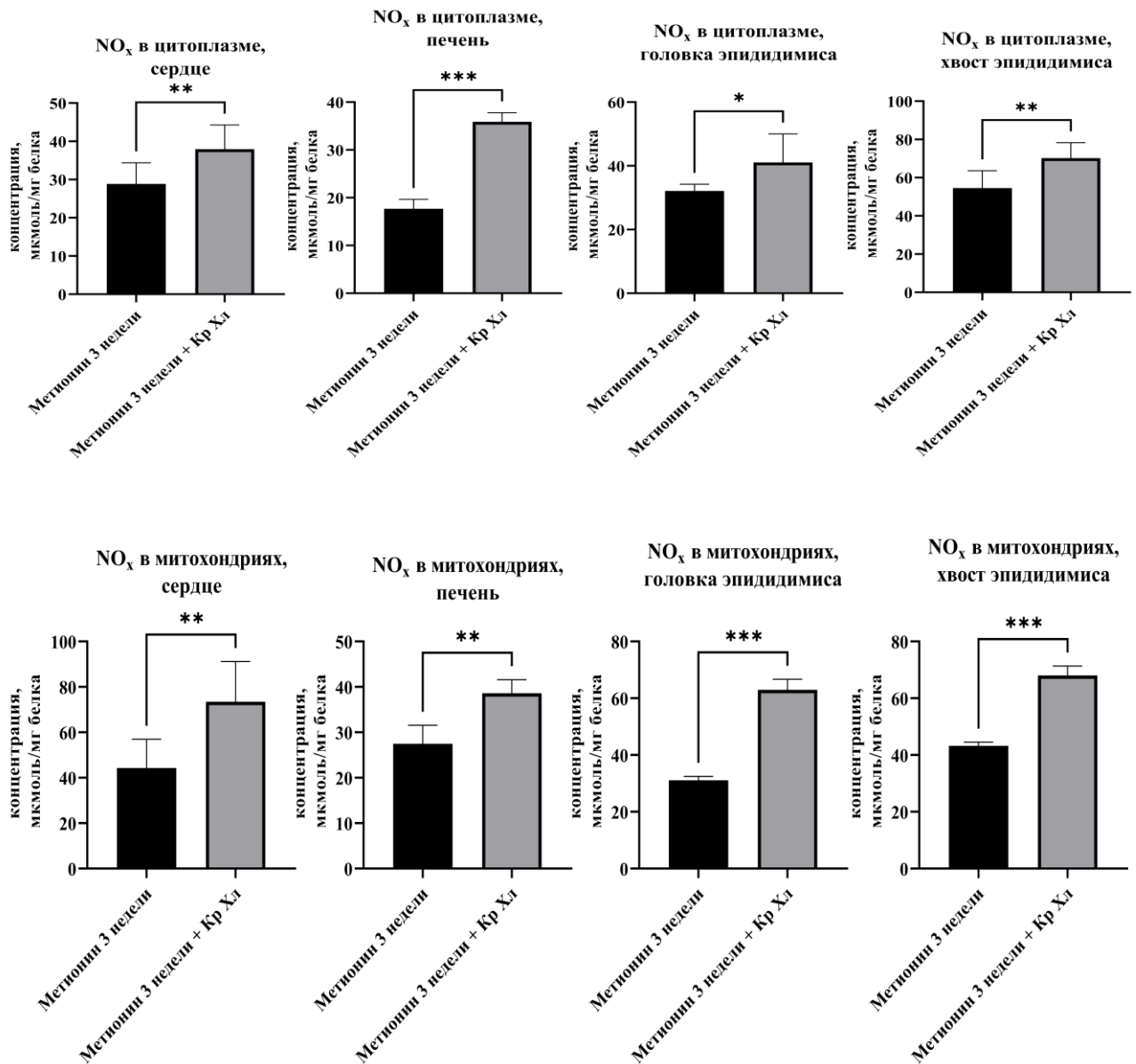


Рисунок 76 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень NO_x в субклеточных фракциях исследуемых органов при гипергомоцистеинемии

Примечание: символом * отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$, символом ns - non significant - статистически незначимые результаты ($p \geq 0,05$). Значения представлены как Me[Q1;Q3]

Назначение карнитина хлорида при тяжелой форме гипергомоцистеинемии, способствовало статистически значимому повышению уровня NO_x во всех субклеточных фракциях всех исследуемых органов (Рисунок 76).

Таким образом, продемонстрированная ранее на модели первичной легочной гипертензии [187] связь между нарушением гомеостаза карнитина,

дисфункцией митохондрий и нарушением генерации NO, имеет место и в выполненном исследовании. Данное направление является актуальным и требует дополнительного изучения.

Между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови также обнаружена сильная отрицательная связь (Рисунок 77).

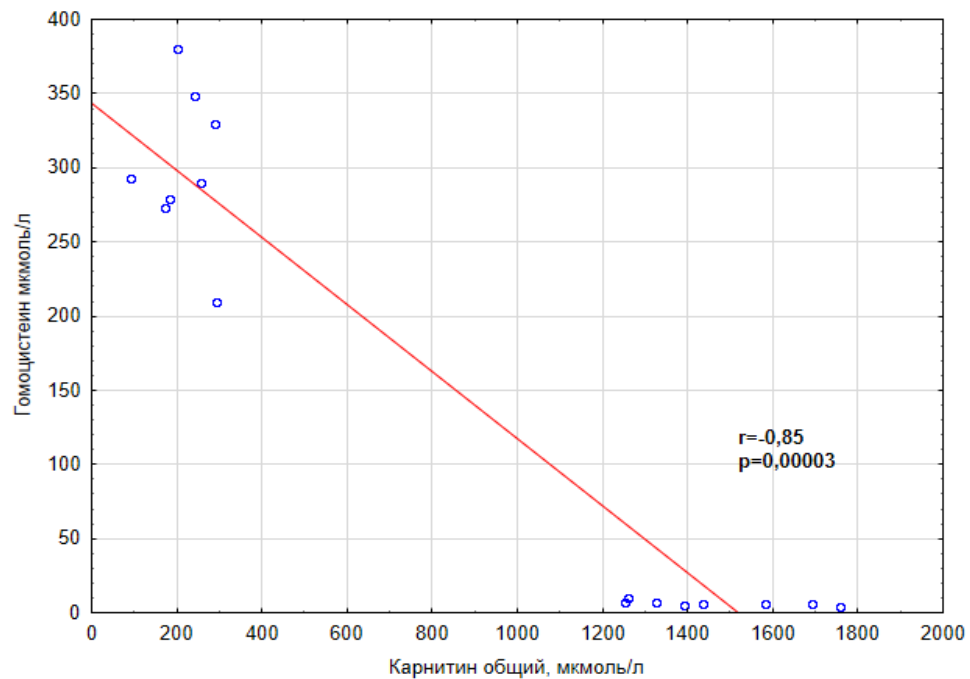


Рисунок 77 – Зависимость содержания общего карнитина и гомоцистеина в сыворотке крови

В митохондриях исследуемых органов выявлены статистически значимые отрицательные корреляционные связи между содержанием общего карнитина и уровнем гомоцистеина в сыворотке крови :

сердца $r = -0,72$, $p = 0,001436$; печени $r = -0,69$, $p = 0,003204$;

головки эпидидимиса $r = -0,74$, $p = 0,001006$; хвоста эпидидимиса $r = -0,61$, $p = 0,01178$.

Таким образом, можно предполагать наличие защитного эффекта карнитина, проявляющегося в предупреждении повышения гомоцистеина в условиях длительной метиониновой нагрузки [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Митохондрии играют жизненно важную роль в энергетическом гомеостазе клетки. В настоящее время происходит активное накопление данных об участии этих органелл в различных регуляторных механизмах. При определенных обстоятельствах возможно нарушение связанных с митохондриями сигнальных путей. Изучение таких нарушений и возможности их коррекции представляется весьма актуальным направлением.

L-карнитин имеет важное значение для поддержания нормального функционирования митохондрий и участвует в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма к неблагоприятным воздействиям. Наиболее изученной является его функция, связанная с участием в транспорте длинноцепочечных ацилов жирных кислот через митохондриальную мембрану и поддержания пула кофермента А.

Также активно исследуется антиоксидантный эффект карнитина. Накопившиеся научные данные свидетельствуют о том, что активность митохондрий может модулироваться как АФК, так и оксидом азота (NO). При окислительном же или нитрозативном стрессе уровни АФК и активных форм азота выходят за пределы физиологического диапазона, что приводит к нарушению редокс-сигнализации и изменению основных функций как митохондрий, так и клетки в целом. Основываясь на изучении литературных данных, имеются основания полагать, что окислительно-восстановительный статус клеток может быть охарактеризован содержанием окислительно-модифицированных белков, детекция которых рассматривается в качестве наиболее стабильных и ранних показателей выраженности окислительного стресса, поэтому оценка уровня ОМБ и РАП ОМБ важна с точки зрения углубленного понимания механизмов адаптивных и патологических процессов, ассоциированных с окислительным стрессом.

L-карнитин играет также важную роль в удалении потенциально токсичных метаболитов, в том числе короткоцепочечных остатков жирных кислот, образующихся в ходе процессов β -окисления. Накопление этих соединений способно привести к повреждению митохондриальной мембраны, запуску каскадных процессов, опосредующих апоптоз и воспаление. По этой причине их конъюгация с L-карнитином необходима для предупреждения развития митохондриальной дисфункции.

Концептуальный интерес представляет и ряд работ, посвященных моделированию легочной гипертензии на животных, продемонстрировавших связь между нарушением NO-сигнализации и развитием митохондриальной дисфункции в условиях изменения гомеостаза карнитина.

Обнаруженные взаимосвязи между снижением активности ферментов гомеостаза карнитина и сопутствующим падением генерации NO стали предпосылками для исследования роли карнитина в функционировании митохондрий и перспектив целенаправленного использования карнитина в фармакотерапии заболеваний, в частности, при сердечно-сосудистой патологии, метаболически ассоциированной жировой болезни печени и нарушениях фертильности в рамках данного исследования.

Данные вопросы являются перспективным направлением в получении новых дополнительных знаний о роли карнитина в функционировании митохондрий.

Первый этап исследований включал в себя экспериментальное моделирование дефицита NO. Для этой цели были выбраны модели:

- 1) введение ингибитора NO-синтаз - L-NAME в умеренной дозе 25 мг/кг;
- 2) введение L-NAME в высокой дозе 200 мг/кг.

Использование L-аргинина, как субстрата для NO-синтазы позволяло оценить функционирование митохондрий в условиях, способствующих повышению уровня оксида азота.

Модель дефицита синтеза NO (II) была подтверждена как в сыворотке крови, так и в митохондриях тканей крыс. При увеличении дозы L-NAME до 200 мг/кг эффект ингибирования NO-синтазы был выражен сильнее, при этом удалось выявить, что наиболее чувствительными к воздействию L-NAME оказались ткани головки эпидидимиса.

Наряду с ингибированием синтеза NO (II), назначение L-NAME вызывало торможение процессов аэробного окисления и окислительного фосфорилирования, о чем свидетельствовало снижение активности СДГ, H⁺-АТФазы при дозе L-NAME 25 мг/кг в гомогенате ткани эпидидимиса, при увеличении дозы L-NAME до 200 мг/кг активность вышеназванных ферментов угнеталась также и в тканях сердца.

В ходе работы было обнаружено, что экспериментальное снижение генерации NO сопровождалось развитием окислительного стресса, что подтверждалось увеличением уровня спонтанно окислительно-модифицированных белков в митохондриях всех исследуемых тканей. В митохондриях головки и хвоста эпидидимиса выявлены и нарушения механизмов антиоксидантной защиты, связанные с митохондриальной СОД.

Введение L-аргинина самцам крыс на фоне моделирования экспериментального дефицита генерации NO позволило выявить ряд значимых эффектов: фиксировалась частичная компенсация дефицита NO в цитоплазме клеток и митохондриях сердца и головки эпидидимиса в обеих дозах L-NAME, в сыворотке крови и печени только в дозе L-NAME 200 мг/кг. L-аргинин также способствовал более высокой активности окислительного фосфорилирования во всех исследуемых органах, за исключением головки эпидидимиса. Сочетанное применение L-аргинина и L-NAME позволило подтвердить антиоксидантный эффект, проявившийся в уменьшении уровня карбонилирования белков, в большей степени в митохондриях кардиомиоцитов и гепатоцитов и в меньшей - в митохондриях эпидидимиса.

Таким образом, дефицит синтеза NO в модели L-NAME связан с развитием окислительного стресса и появлением признаков митохондриальной дисфункции. При этом введение L-аргинина, как субстрата синтеза NO, сопровождалось уменьшением дефицита NO, что, в свою очередь, ассоциировалось с меньшей выраженностью нарушений показателей функций митохондрий и развитием окислительного стресса.

Общее содержание карнитина в организме млекопитающих находится в довольно динамичном состоянии. Перераспределение между пулами карнитина и ацилкарнитина можно наблюдать в пораженных тканях после любых метаболических нарушений, причем изменения могут возникать в гомеостазе карнитина определенных тканей без одновременного заметного его содержания в других.

В связи с этим, для определения роли карнитина в моделируемых патологиях было важно оценить уровень общего карнитина и его фракций не только в сыворотке крови, но и во всех исследуемых тканях.

Важно подчеркнуть, что на фоне L-NAME-опосредованного дефицита NO было обнаружено снижение общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов. При этом в митохондриях подобные изменения были зафиксированы только в головке эпидидимиса. Модуляция генерации уровня NO с помощью L-аргинина на фоне L-NAME препятствовала снижению эндогенного уровня общего карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях всех исследуемых органов, что было более выражено на фоне применения L-NAME в дозе 200 мг/кг.

Обобщая вышесказанное, было продемонстрировано, что L-NAME модель дефицита синтеза NO приводит к органоспецифичному снижению фракций карнитина в митохондриях и цитоплазме клеток исследуемых тканей. При этом введение L-аргинина, как субстрата синтеза NO, ассоциировано с более высоким уровнем фракций карнитина, что носило также органоспецифичный характер.

Поскольку выявленное снижение продукции NO на фоне L-NAME сопровождалось также снижением уровня эндогенного карнитина, была поставлена задача оценить показатели функционирования митохондрий при использовании экзогенного карнитина хлорида. Оказалось, что его введение ассоциировано с большим уровнем NO_x в митохондриях исследуемых тканей. Наличие взаимосвязи между содержанием общего и свободного карнитина и уровнем метаболитов NO (II) в данной модели подтверждено обнаружением прямых корреляций между изучаемыми показателями.

Важным результатом можно считать тот факт, что назначение карнитина хлорида при моделировании экспериментального дефицита синтеза NO приводило к снижению уровня молочной кислоты в цитоплазме клеток печени, головки эпидидимиса, а при дозе L-NAME 200 мг/кг также и в сердце с одновременным повышением ее в митохондриях органов, причем доза L-NAME 25 мг/кг сопровождается одновременным повышением активности ЛДГ, при дозе 200 мг/кг активность данного фермента не изменяется. Этот феномен можно рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на использование лактата в качестве энергосубстрата, в условиях ограниченного использования жирных кислот либо подключения других пусковых механизмов метаболической гибкости митохондрий.

Назначение экзогенного карнитина хлорида при L-NAME индуцированном снижении NO предупреждало истощение РАП окислительной модификации белков митохондрий сердца, головки и хвоста эпидидимиса относительно групп, принимавших только ингибитор NO-синтаз, однако значимо не влияло на суммарное изменение количества карбонильных производных.

Таким образом, показано, что экзогенный карнитин способен уменьшать выраженность дефицита синтеза NO в модели L-NAME, что сопровождается меньшей выраженностью отклонений показателей функционирования митохондрий. Установлено, что в этих условиях экзогенный карнитин оказывает антиоксидантный эффект и способствует увеличению концентрации лактата в

митохондриях, что, возможно, связано с процессами метаболического репрограммирования для адаптации к стрессовым условиям.

Для митохондрий эндотелия среди факторов, нарушающих генерацию NO, а вместе с этим и опосредуемый им сигналинг, в настоящее время придается большое значение роли гомоцистеина. При этом системные эффекты, связанные с гомоцистеин - индуцированной митохондриальной дисфункцией в других типах клеток и тканях, остаются малоизученными. Поэтому на следующем этапе исследования для изучения влияния гомоцистеина на выработку NO в митохондриях исследуемых тканей была выбрана и исследована модель тяжелой формы гипергомоцистеинемии путем метиониновой нагрузки в течение 21 дня в дозе 3 г/кг.

Первоначально нами был получен положительный ответ на вопрос влияния гипергомоцистеинемии на уровень метаболитов NO: их содержание снижалось в сыворотке крови, субклеточных фракциях сердца, печени, головке эпидидимиса. Было установлено, что гипергомоцистеинемия способствует развитию окислительного стресса в митохондриях, выражающегося в увеличении количества карбонильных производных аминокислотных остатков в белках митохондрий сердца, печени и эпидидимиса крыс. При этом на фоне усиления окислительного повреждения белков наблюдалось повышение антиоксидантной защиты, о чем свидетельствует увеличение общей активности СОД в митохондриях всех исследуемых органов.

Следует отметить, что при анализе зависимости показателей содержания продуктов ОМБ в головке и хвосте придатка яичка от концентрации гомоцистеина в сыворотке крови, были выявлены статистически значимые прямые корреляционные связи. Это данные позволили предположить более высокую уязвимость митохондрий эпидидимиса к прооксидантными свойствам гомоцистеина. Полученные результаты согласуются с представлениями о роли повышенных концентраций гомоцистеина как факторе риска многих заболеваний, в том числе нарушении фертильности, и расширяют понимание механизмов токсического действия гомоцистеина.

При нарушении редокс-регуляции в условиях окислительного дистресса было продемонстрировано снижение активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки: СДГ - в сердце и эпидидимисе, а также H^+ -АТФазы - в головке и хвосте эпидидимиса, причем в преобладающей степени митохондриальная дисфункция выражена в митохондриях сердца и головке придатка яичка, в то же время наибольшие адаптационные возможности наблюдались в печени и хвосте эпидидимиса.

Выявленные ранее положительные эффекты L-аргинина послужили основанием для изучения его возможного протективного действия на изучаемые процессы и при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Было установлено, что L-аргинин уменьшает степень выраженности гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина в высокой дозе, вероятно, за счет ингибирования транспорта метионина в клетки, с сопутствующим увеличением концентрации метаболитов оксида азота. Также L-аргинин проявляет выраженные антиоксидантные свойства, препятствуя развитию окислительного стресса, ассоциированного с гиперпродукцией гомоцистеина.

Таким образом, было продемонстрировано, что моделирование тяжелой формы гипергомоцистеинемии связано как со снижением уровня метаболитов NO, так и с проявлением признаков митохондриальной дисфункции: прироста маркеров окислительного стресса, нарушения активности изучаемых ферментов митохондрий. При этом введение L-аргинина позволяет уменьшить выраженность гипергомоцистеинемии на фоне метиониновой нагрузки, а также связано с антиоксидантным эффектом, большим уровнем метаболитов NO и активности исследуемых ферментов в митохондриях.

При тяжелой форме гипергомоцистеинемии, при которой, как отмечалось ранее, наблюдалось значимое снижение продукции NO (II), также выражено уменьшение уровня всех фракций карнитина как в сыворотке крови, так и во всех исследуемых фракциях и органах. И хотя введение L-аргинина совместно с

метионином приводило к повышению отдельных фракций карнитина, в целом его уровень оставался ниже значений контрольной группы.

Предположение о положительном влиянии карнитина хлорида на генерацию NO нашло свое подтверждение и в условиях моделируемой гипергомоцистеинемии: содержание метаболитов NO повышалось во всех субклеточных фракциях исследуемых органов, за исключением каудального отдела эпидидимиса.

Важно отметить, что назначение карнитина хлорида на фоне моделирования гипергомоцистеинемии сопровождалось снижением уровня гомоцистеина сыворотки крови в 4 раза, однако, его уровень по-прежнему был выше значений контрольной группы животных, что также может оказаться частью его протективного эффекта.

Экспериментально было установлено, что карнитина хлорид способен стимулировать процесс генерации NO как непосредственным путем, влияя на уровень NOS в изучаемых отделах эпидидимиса, так и опосредованно, уменьшая содержание гомоцистеина.

Еще одним важным аспектом является тот факт, что в головке эпидидимиса на модели тяжелой гипергомоцистеинемии была выявлена схожая тенденция к повышению уровня лактата в митохондриальной фракции под действием карнитина хлорида при сопутствующем увеличении активности ЛДГ, что позволяет предположить наличие системного характера сдвига к увеличению концентрации митохондриального лактата при использовании карнитина хлорида в условиях как модели L-NAME опосредованного дефицита NO, так и в условиях гипергомоцистеинемии. Полученные результаты создает предпосылки для изменения принципиальных взглядов о «тупиковом» пути метаболизма молочной кислоты.

Таким образом, воспроизведена закономерность стимуляции прироста уровня метаболитов NO экзогенным карнитином на фоне экспериментальной модели, ассоциированной со снижением выработки NO. Продемонстрировано, что карнитин способен уменьшать выраженность гипергомоцистеинемии,

вызванной метиониновой нагрузкой. Установлено, что, как и в модели L-NAME, в модели гипергомоцистеинемии карнитина хлорид снижает выраженность проявлений митохондриальной дисфункции, стимулирует накопление лактата в митохондриях.

Сопоставленные изменения изучаемых показателей в митохондриях тканей сердца, печени и эпидидимиса, происходящие при экспериментальном ингибировании NO-синтаз и гипергомоцистеинемии, позволили выявить сходства моделей во влиянии на уровень метаболитов NO, окислительно модифицированных белков и содержание карнитина в митохондриях, а также обнаружить тканеспецифические особенности сдвигов исследуемых биохимических показателей.

Так в митохондриях головки эпидидимиса отмечены процессы, связанные с изменением биоэнергетических процессов - увеличение уровня лактата в митохондриях, при одновременном уменьшении активности ЛДГ, СДГ и H⁺-АТФазы митохондрий. В тканях хвоста имели место изменения, направленные на поддержку его функциональной активности в условиях окислительного стресса. Митохондрии ткани печени показали наибольшую устойчивость к экспериментальным воздействиям, при этом концентрация метаболитов NO статистически значимо снижалась в них только под воздействием высокой дозы ингибитора.

На заключительном этапе на основе полученных результатов была проанализирована взаимосвязь между уровнем карнитина и метаболитов оксида азота, а также содержанием гомоцистеина в сыворотке крови в исследуемых экспериментальных моделях.

Были продемонстрированы положительные корреляционные взаимосвязи между уровнем карнитина и NO в сыворотке крови, цитоплазме клеток и митохондриях исследуемых органов на фоне применения ингибитора NO-синтаз - L-NAME в дозе 25 мг/кг и 200 мг/кг. Так были обнаружены: сильная положительная зависимость между NO_x и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, между NO_x и уровнем свободного карнитина в

митохондриях сердца и цитоплазме клеток головки эпидидимиса. Выявлена умеренная положительная взаимосвязь - между NO_x и содержанием общего и свободного карнитина в цитоплазме и митохондриях клеток сердца, цитоплазме клеток печени; в митохондриях головки эпидидимиса - между NO_x и содержанием общего карнитина.

Между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови обнаружена сильная отрицательная связь. В митохондриях исследуемых органов также выявлены статистически значимые отрицательные корреляционные связи между уровнем гомоцистеина и содержанием общего карнитина.

Комплекс проведенных исследований позволил предположить наличие протективного эффекта L-карнитина, заключающегося в выведении токсичных интермедиатов метаболизма метионина и неселективного ингибитора NO-синтазы L-N^ω-нитроаргинина метилового эфира (L-NAME). Это косвенно подтверждено меньшей выраженностью дефицита NO и гипергомоцистеинемии в условиях исследуемых экспериментальных моделей на фоне введения L-карнитина. Зафиксированное увеличение активности супероксиддисмутазы митохондрий и уменьшение соотношения спонтанных карбонилированных белков к металл-индуцированным позволило подтвердить наличие антиоксидантного эффекта L-карнитина как при L-NAME опосредованном дефиците синтеза NO, так и в модели тяжелой гипергомоцистеинемии. Предполагаемые механизмы протективного эффекта L-карнитина в исследуемых экспериментальных моделях схематично обобщены на Рисунке 78.

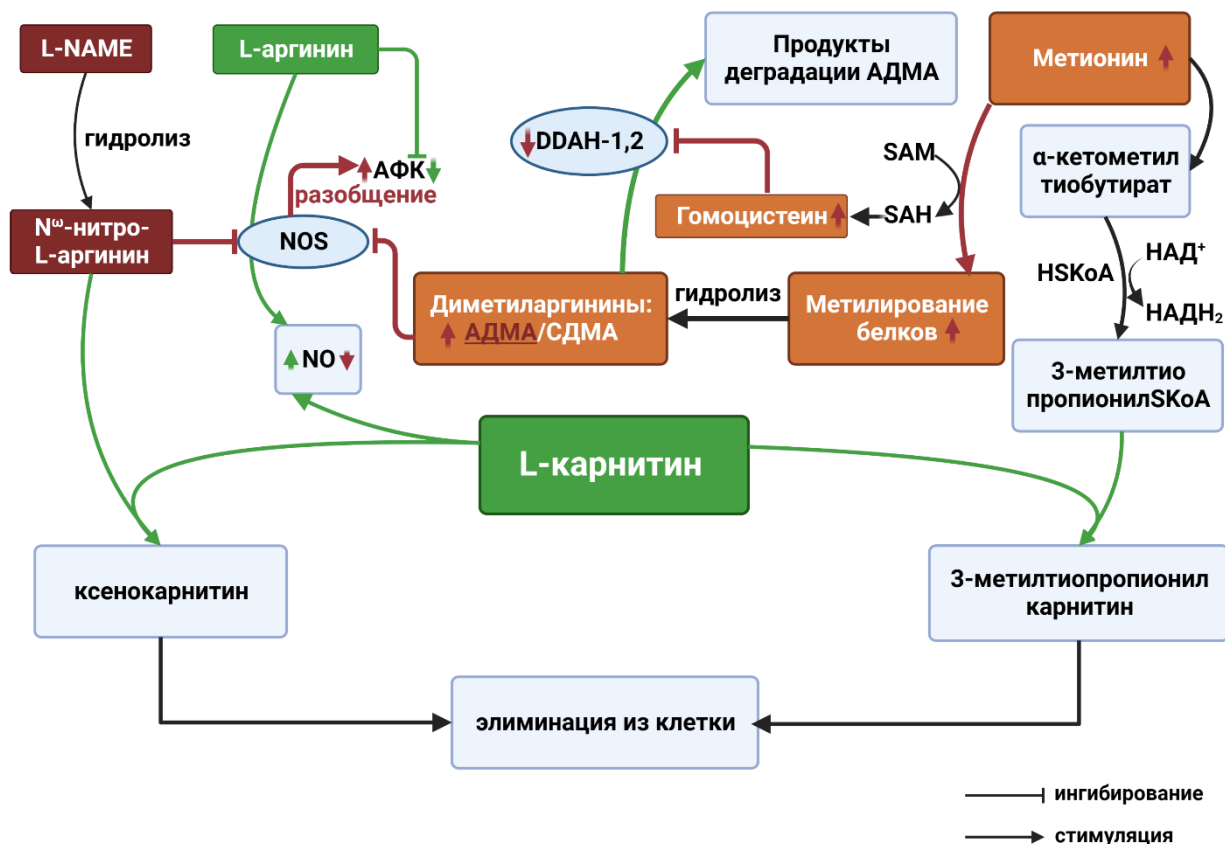


Рисунок 78 – Возможные механизмы протективного эффекта L-карнитина при введении L-NAME и гипергомоцистеинемии

Примечание: SAM – S- аденозилметионин, SAH - S-аденозилгомоцистеин, DDAH-1,2 – N^G,N^G диметиларгининдиметиламиногидролазы-1,2, NOS - NO-синтазы. Рисунок выполнен с помощью BioRender.com. (Лицензионное соглашение KG25GW2NXE)

Таким образом, обобщая вышеприведенные результаты исследования, можно утверждать о роли L-карнитина как протективного фактора для функционирования митохондрий, способствующего как поддержанию уровня NO, так и снижению содержания гомоцистеина при экспериментальных моделях L-NAME-индуцированного дефицита NO и гипергомоцистеинемии, вызванной метиониновой нагрузкой.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ДАЛЬНЕЙШАЯ РАЗРАБОТКА ТЕМЫ

В данном диссертационном исследовании проведено комплексное изучение влияния L-карнитина на процессы коррекции митохондриальной дисфункции, вызванной нарушением редокс регуляции и сопровождающейся изменением NO сигнализации. Обнаружены и ранее неизвестные их свойства, одновременно с этим появились вопросы и предположения, требующие дальнейших подтверждений. Разработка этих вопросов может стать основой будущих научных исследований данной темы.

1. Проверка гипотезы о возможности снижения L-карнитином степени выраженности гипергомоцистеинемии, вызванной избыточным потреблением метионина, на модели животных с введением непосредственно гомоцистеина позволит внести вклад в определение биологического значения L-карнитина для функционирования организма животных и человека.

2. Обнаружение феномена повышения уровня лактата под влиянием карнитина хлорида внутри митохондрий в изучаемых патологических ситуациях может иметь важное значение для биохимии и клинической медицины, но требуется дальнейшее подтверждение системности этого эффекта в других органах, других патологических моделях и оценка биологической значимости данного явления.

3. Продемонстрированное в диссертационной работе повышение уровня метаболитов NO (II) под воздействием карнитина хлорида подтверждает наличие взаимосвязи между NO-сигнализацией и карнитиновым гомеостазом, дальнейшие исследования с включением в них определения активности ферментов транспорта карнитина внесет вклад в развитие исследований в этой области.

4. Выявленная способность L-аргинина снижать содержание гомоцистеина и увеличивать концентрацию экзогенного уровня карнитина в условиях L-NAME-индуцированного снижения уровня оксида азота требует целого комплекса исследований для подтверждения предполагаемых механизмов.

5. Результаты данной работы позволят углубить представления о терапевтическом потенциале L-карнитина и стать основой для дальнейших исследований его применения с целью коррекции процессов, ассоциированных с нарушением редокс-регуляции, сопровождающейся изменением NO-опосредованной регуляции митохондрий и способностью выводить токсические метаболиты.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальный дефицит NO, индуцированный введением метилового эфира L-N^o-нитроаргинина (L-NAME), в митохондриях сердца, головки и хвоста эпидидимиса крыс приводит к снижению активности ферментов, участвующих в тканевом дыхании и окислительном фосфорилировании - СДГ и H⁺-АТФазы. Данный эффект более выражен при использовании высокой дозы L-NAME (200 мг/кг). Также в этих условиях развивается окислительный стресс и уменьшается активность супероксиддисмутазы (СОД) митохондрий эпидидимиса.

2. Использование субстрата NO-синтаз L-аргинина совместно с L-NAME в дозе 200 мг/кг уменьшает степень окислительной модификации белков в митохондриях кардиомиоцитов, гепатоцитов и головке эпидидимиса, предотвращает снижение как активности СОД в обоих отделах эпидидимиса, так и активности ферментов, участвующих в тканевом дыхании и окислительном фосфорилировании в митохондриях сердца, печени и головке эпидидимиса.

3. Экспериментальный дефицит NO сопровождается снижением общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов, в митохондриях подобные изменения зафиксированы только в головке эпидидимиса. Введение L-аргинина совместно с L-NAME предупреждает снижение эндогенного уровня общего карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях в клетках исследуемых органов, что было более выражено на фоне применения L-NAME в дозе 200 мг/кг.

4. Экзогенный L-карнитин уменьшает дефицит синтеза NO на фоне введения L-NAME. При его применении происходит снижение уровня молочной кислоты в цитоплазме клеток печени, головки эпидидимиса, при дозе L-NAME 200 мг/кг в сердце, при этом содержание лактата возрастает в митохондриях сердца и печени. L-карнитин предотвращает истощение резервно-адаптационного потенциала в митохондриях сердца и хвоста эпидидимиса, однако значительно не влияет на суммарное изменение количества карбонильных производных.

5. Тяжелая форма гипергомоцистеинемии сопровождается снижением уровня метаболитов NO в сыворотке крови, цитоплазме клеток и митохондриях сердца, печени и головки эпидидимиса и способствует развитию окислительного стресса, повышению активности СОД в митохондриях всех исследуемых тканей. Отмечается снижение активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки: СДГ - в сердце и H^+ -АТФазы - в головке и хвосте эпидидимиса.

6. Введение L-аргинина на фоне гипергомоцистеинемии приводит к увеличению концентрации метаболитов NO, уменьшению степени выраженности гипергомоцистеинемии и окислительной модификации белков.

7. При тяжелой форме гипергомоцистеинемии происходит значительное уменьшение уровня общего, свободного и связанного карнитина во всех субклеточных фракциях исследуемых органов. Применение L-аргинина на фоне сниженной генерации NO при экспериментальной гипергомоцистеинемии вызывает повышение уровня эндогенного общего карнитина в сыворотке крови и митохондриальной фракции изучаемых органов.

8. Применение L-карнитина в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии предупреждает повышение уровня гомоцистеина в сыворотке крови и увеличивает содержание метаболитов NO в изучаемых тканях. В митохондриях головки эпидидимиса обнаружен схожий с моделью L-NAME характер изменений в виде повышения уровня лактата под действием L-карнитина при сопутствующем увеличении активности ЛДГ.

9. Экспериментальные модели дефицита NO и гипергомоцистеинемии ассоциируются с развитием окислительного стресса, выражающегося в усилении окислительной модификации белков митохондрий изучаемых тканей, снижением уровня метаболитов оксида азота и уменьшением содержания общего и свободного карнитина.

10. Между уровнем метаболитов NO и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, содержанием метаболитов NO и концентрацией свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме клеток головки эпидидимиса существует сильная положительная корреляционная взаимосвязь.

Между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови, митохондриях сердца и головки эпидидимиса обнаружена сильная, а в печени и хвосте эпидидимиса умеренная отрицательная корреляционная связь.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленный в работе дефицит NO, опосредованный введением L-NAME в дозах 25 и 200 мг/кг, сопровождался накоплением окислительно модифицированных белков и снижением содержания L-карнитина в митохондриях тканей головки и хвоста эпидидимиса, что указывает на важную роль NO для митохондрий придатка яичка и позволяет рекомендовать данную экспериментальную модель для исследования значения NO при нарушениях фертильности.

2. Разработанная модель метиониновой нагрузки у крыс может быть предложена для изучения токсических эффектов повышенного уровня гомоцистеина и возможностей их коррекции.

3. Обнаруженное снижение уровня эндогенного L-карнитина в изучаемых экспериментальных моделях позволяет рекомендовать оценку уровня общего L-карнитина сыворотки крови для выявления и коррекции его дефицита при патологических состояниях и заболеваниях, сопровождающихся дефицитом выработки NO.

4. Выявленная в работе сильная положительная связь между содержанием общего карнитина и метаболитов NO в митохондриях гомогенатов сердца, печени и головки эпидидимиса позволяет рассматривать карнитина хлорид в качестве потенциального терапевтического средства, улучшающего функциональный статус митохондрий при состояниях, связанных с нарушением генерации NO.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АДМА – асимметричный диметиларгинин
- АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны
- АФА – активные формы азота
- АФК – активные формы кислорода
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- КАТ – карнитинацетилКоАтрансфераза
- КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны
- КПТ – карнитинпальмитоилтрансфераза
- ЛДГ - лактатдегидрогеназа
- НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид
- Н⁺-АТФаза – протонтранспортирующая двухсекторная АТФаза (АТФ-синтаза)
- ОМБ – окислительная модификация белков
- СДГ – сукцинатдегидрогеназа
- СОД – супероксиддисмутаза
- ФАД – флавинадениндинуклеотид
- ФМН – флавинмононуклеотид
- цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
- AGXT-2 – аланинглиоксилатаминотрансфераза 2
- АМРК – активируемая АМФ протеинкиназа
- сАМР – циклический аденозинмонофосфат
- САТ – Na⁺-независимый транспортер основных аминокислот
- DDAH – диметиларгининдиметиламиногидролаза
- GPX – глутатионпероксидаза
- GSH – глутатион
- HCAR-1 – рецептор гидроксикарбоновой кислоты
- HDAC – ингибитор деацетилазы
- HIF1 α – гипоксией индуцируемый фактор 1 альфа

ISR – интегративная реакция на стресс

Keap1 – Кельч-подобный ECH-ассоциированный белок 1

L-NAME – метиловый эфир L-N^ω-нитроаргинина

MCT1 – монокарбоксилатный переносчик лактата

mLOC – митохондриальный лактат окисляющий комплекс

NF-κB – ядерный фактор каппа В

NO – оксид азота (II)

NOS – NO-синтаза

Nrf1 и Nrf2 – ядерные респираторные факторы 1 и 2

OSTN – транспортные белки карнитина, принадлежащие к семейству переносчиков органических катионов

OXPPOS – окислительное фосфорилирование

PGC-1α - PPAR – коактиватор 1α

PND – пролилгидроксилаза

PKC – протеинкиназа C

PPAR – семейство коактиваторов рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом

PRMT – аргининметилтрансфераза

PRX – пероксиредоксины

RET – обратный транспорт электронов

SAH - S-аденозилгомоцистеин

SAM – S-аденозилметионин

Sirt (sirtuine) – НАД⁺-зависимая деацетилаза

TFAM – Mitochondrial transcription factor A, митохондриальный транскрипционный фактор А

UPRmt – mitochondrial unfolded protein response, ответ митохондриального неструктурированного белка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – С. 90-92. – Текст (визуальный): непосредственный.
2. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учебное пособие / под ред. В.Ю. Сереброва, Г.А. Сухановой. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет. – 2008. – С. 79-82.– ISBN 978-5-98591-031-5. – Текст (визуальный): непосредственный.
3. Быков, И.Л. Влияние L-карнитина на метаболические нарушения при экспериментальной недостаточности ацил-КоА дегидрогеназ / И.Л. Быков. – Текст (визуальный): непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т.67, № 6. – С.48-52.
4. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как основа для создания лекарств разнообразного терапевтического действия: физико-химическое и биологическое обоснование этого направления / А.Ф. Ванин. – Текст (визуальный): непосредственный // Биофизика. – 2017. – Т.62, вып.4. – С. 629-656.
5. Влияние пероксиредоксина 6 на уровень транскрипционного фактора p53 / М. Г. Шарапов, Р. Г. Гончаров, С. Б. Парфенюк [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимия. – 2022. – Т. 87, № 7. – С. 962-974. – doi 10.31857/S0320972522070107. – EDN AWAZNN.
6. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии / В.И. Звягина, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. – №1. – С.78-81.– doi: 10.14300/mnnc.2018.13022.
7. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа / К.Б. Шумаев, О.В. Космачевская, Д.И. Грачев [и др.]. –

Текст (визуальный): непосредственный // Биомедицинская химия.– 2021.– Т. 67, № 2. – С. 162-168. – doi: 10.18097/PBMC20216702162.

8. Вторичная митохондриальная дисфункция при остром коронарном синдроме / Ю.А. Васюк, К.Г. Куликов, О.Н. Кудряков [и др.] – Текст (визуальный): непосредственный // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2007. – №1. – С. 41-47.

9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: учебное пособие / С. Гланц. – Москва: Практика, 1988. – 459 с. – ISBN 5-89816-009-4. – Текст (визуальный): непосредственный.

10. Горрен, А.К.Ф. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота / А.К.Ф. Горрен, Б. Майер. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 7. – С. 870 - 88.

11. ГОСТ Р ИСО 5479-2002. Статистические методы. Проверка отклонения распределения вероятностей от нормального распределения = Statistical methods. Tests for departure of the probability distribution from the normal distribution: национальный стандарт РФ: издание официальное: утвержден и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 22 января 2002 г.: введен впервые: 01.07.2002 / разработан АО "Научно-исследовательский центр контроля и диагностики технических систем". (АО "НИЦ КД"). – Москва, 2002. – 34с. – Текст (визуальный): непосредственный.

12. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств: монография / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. – Москва: Вузовская книга, 2015. – 360 с. – ISBN 978-5-89522-276-8. – Текст (визуальный): непосредственный.

13. Дорохина, Л.В. Значение L-аргинин-NO системы в механизмах развития гипотермии / Л.В. Дорохина, В.В. Зинчук. – Текст (визуальный): непосредственный // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2004. – № 1 (5). – С. 6-9.

14. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты: монография / Е.Е. Дубинина. – Санкт-

Петербург : Изд-во «Медицинская пресса», 2006. – 397 с. – ISBN 5-85474-072-9. – Текст (визуальный): непосредственный.

15. Енгальчева, М.Г. Оценка окислительной модификации белков плазмы крови и лейкоцитов при болезни Альцгеймера / М.Г. Енгальчева, М.А. Фомина, Д.С. Петров. – Текст (визуальный): непосредственный // Молекулярная медицина. – 2020. – Т. 18, №5. – С. 41-45.

16. Ланкин, В.З. Окислительный и карбонильный стресс в этиологии и патогенезе сахарного диабета / В.З. Ланкин, А.К.Тихазе. – Текст (визуальный): непосредственный // Кардиологический вестник. – 2020. – Т.15, № 5. – С. 10.

17. Лебедева, А.Ю. Гипергомоцистеинемия: современный взгляд на проблему / А.Ю. Лебедева, К.В. Михайлова – Текст (визуальный): непосредственный // Рос. Кардиол. Журн. – 2006. – Внеочередной выпуск. – С.149.

18. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии: монография / Л.Д. Лукьянова. – Москва: РАН, 2019. – 215 с. – ISBN 978-5-907036-45-1. – Текст (визуальный): непосредственный.

19. Медведев, Д.В. Значение оксида азота в развитии вторичной митохондриальной дисфункции при экспериментальной гипергомоцистеинемии : дис... канд. биол. наук: специальность 03.00.04 «Биохимия» / Д.В. Медведев; Рязанский государственный медицинский университет им. Акад. И.П.Павлова. – Рязань, 2017. – 163 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

20. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И.Звягина, М.А. Фомина. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2014. – №4.– С. 42-46.

21. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова. – Текст (визуальный): непосредственный // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – №6. – С. 15- 18.

22. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие / под ред. М.И. Прохоровой. - Л.: Издательство

Ленинградского университета, 1982. – 327 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

23. Мещерякова, О.В. Митохондриальный лактат-окисляющий комплекс и его значение для поддержания энергетического гомеостаза клеток / О.В. Мещерякова, М.В. Чурова, Н.Н. Немова. – Текст (визуальный): непосредственный // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: сборник научных статей / Российская академия наук, Отделение биол. наук РАН и др.; редкол.: Н.Н. Немова [и др.]. – Петрозаводск, 2010. – С. 163-171.

24. Патент №2414755 РФ, МПК ¹¹ G09B23/28. Способ моделирования гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции : №2009138639/14 : заявл. 19.10.2009 : опубл. 20.03.2011 / С.Г. Емельянов [и др.]; патентообладатель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Юго-Западный государственный университет» (ЮЗГУ) (RU). – Бюл. 8. – Текст (визуальный): непосредственный.

25. Патент №2121001 РФ, МКИ C12Q 1/34, C12Q 1/48, C12Q 1/66, G01N 33/53, G01N 33/58, G01N 33/68, G01N 33/543, G01N 33/577, C07H 15/14, C07H 15/26, C07H 19/16. Способ определения гомоцистеина в пробе и набор для его осуществления : №94038061/13: заявл. 22.01.1993: опубл. 27.10.1998 / Э. Сундрехаген; патентообладатель: Эксис Биокемикалс АС (Норвегия). – Бюл.11. – Текст (визуальный): непосредственный.

26. Патент №2524667 РФ, МКИ G01N33/52. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях : заявл. 2013102618/15, 21.01.2013: опубл. 27.07.2014 / Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В. [и др.]. – Бюл. № 21. – 9 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

27. Покровский, А.А. Лизосомы: научное издание / А. А. Покровский, В. А. Тутельян; под ред. С. Е. Северина; АН СССР, Науч. совета по пробл. биохимии животных и человека. – Москва: Наука, 1976. – Текст (визуальный): непосредственный.

28. Покровский, М.В. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская. – Текст (визуальный): непосредственный // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 10 (91). – С. 72–77.

29. Протективные эффекты L-аргинина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой / В. И. Звягина, К. Б. Шумаев, Э. С. Бельских [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2022. – №4. – С. 457-470. – doi: 10.17816/PAVLOVJ109410

30. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA: учебное пособие / О.Ю. Реброва. – Москва: Медиа Сфера, 2003. – 312 с. – ISBN 5-89084-013-4. – Текст (визуальный): непосредственный.

31. Слияние и деление митохондрий / М.В. Патрушев, И.О. Мазунин, Е.Н. Виноградова [и др.]. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 11. – С. 1673 – 1682.

32. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т. 8, №3. – С. 20-27.

33. Фомина, М.А. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота: монография / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 192 с. – ISBN 978-5-9704-4372-9. – Текст (визуальный): непосредственный.

34. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.И. Кочкаров [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т.71, №2. – С.29–31.

35. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the «arginine paradox» / K.K. McDonald, S. Zharikov, J. Block [et al.]. – Text: visual // *Biol. Chem.* – 1997. – Vol.272. – P. 31213–31216. – doi: 10.1074/jbc.272.50.31213.
36. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis / P. Puigserver, Z. Wu, C.W. Park [et al.]. – Text: visual // *Cell.* – 1998. – Vol.92. – P.829–839. – doi: 10.1016/s0092-8674(00)81410-5.
37. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells / Q. Zhao, J. Wang, I.V. Levichkin [et al.]. – Text: visual // *EMBO J.* – 2002. – Vol.21, №17. – P. 4411-9. – doi: 10.1093/emboj/cdf445.
38. A novel epididymal quiescence factor inhibits sperm motility by modulating NOS activity and intracellular NO-cGMP pathway / P. Ghosh, S. Mukherjee, A. Bhoumik [et al.]. – Text: visual // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol.233, №5. – P.4345-4359. – doi: 10.1002/jcp.26275.
39. A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation / G. Sutendra, A. Kinnaird, P. Dromparis [et al.]. – Text: visual // *Cell.* – 2014. – Vol. 158. – P.84–97. – doi: 10.1016/j.cell.2014.04.046.
40. Abukhodair, A.W. The Effects of L-Arginine in Hypertensive Patients / A.W. Abukhodair, W. Abukhudair, M.S. Alqarni. – Text: visual // *Cureus.* – 2021. – Vol.13, №12. – P. 20485. – doi: 10.7759/cureus.20485.
41. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis / E.L. Mills, K.A. Pierce, M.P. Jedrychowski [et al.]. – Text: visual // *Nature.* – 2018. – Vol.560. – P.102–106. – doi: 10.1038/s41586-018-0353-2.
42. Acyl-CoA synthetases: fatty acid uptake and metabolic channeling / M. Digel, R. Ehehalt, W. Stremmel [et al.]. – Text: visual // *Mol Cell Biochem.* – 2009. – Vol.326, №1-2. – P.23-28. – doi: 10.1007/s11010-008-0003-3.
43. ADMA as a possible marker of endothelial damage. A study in young asymptomatic patients with cerebral small vessel disease / F. Janes, A. Cifu, M.E. Pessa [et al.]. – Text: visual // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol.9. – P. 14207. – doi: 10.1038/s41598-019-50778-w

44. AGXT2: An unnegligible aminotransferase in cardiovascular and urinary systems / X.L. Hu, M.P. Li, P.Y. Song [et al.]. – Text: visual // *J Mol Cell Cardiol.* – 2017. – Vol.113. – P.33-38. – doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.09.010.
45. Akagawa, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches / M. Akagawa. – Text: visual // *Free Radic Res.* – 2021. – Vol.55, №4. – P.307-320. – doi: 10.1080/10715762.2020.1851027.
46. Albina, J.E. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis / J.E. Albina, J.S. Reichner. – Text: visual // *Cancer Metastasis Rev.* – 1998. – Vol.17, №1. – P.39-53. – doi: 10.1023/a:1005904704618.
47. Ambrożewicz, E. Karbonylacja białek – przyczyny, skutki i sposoby oceny [Protein carbonylation - reasons, effects and determination] / E. Ambrożewicz, K. Bielawska. – Text: visual // *Postepy Biochem.* – 2016. – Vol. 62, №4. – P.495-505.
48. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase / Z.P. Chen, K.I. Mitchelhill, B.J. Michell [et al.]. – Text: visual // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol.443. – P. 285 – 289.
49. An energetic view of stress: Focus on mitochondria / M. Picard, B.S. McEwen, E.S. Epel [et al.]. – Text: visual // *Front Neuroendocrinol.* –2018. – Vol.49. – P.72-85. – doi: 10.1016/j.yfrne.2018.01.001.
50. Andreux, P.A. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function / P.A. Andreux, R.H. Houtkooper, J.Auwerx. – Text: visual // *Nat Rev Drug Discov.*– 2013. – Vol.12, №6. – P.465-83. – doi: 10.1038/nrd4023.
51. Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress / S. Ng, I. De Clercq, O. Van Aken [et al.]. – Text: visual // *Mol Plant.* – 2014. – Vol .7, №7. – P.1075-93.– doi: 10.1093/mp/ssu037.
52. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage / L.A. Calò, E. Pagnin, P.A. Davis [et al.]. – Text: visual // *Int J Cardiol.* – 2006. – Vol.107, №1. – P.54-60. – doi: 10.1016/j.ijcard.2005.02.053.

53. Antioxidant treatment prevents serum deprivation- and TNF- α -induced endothelial dysfunction through the inhibition of NADPH oxidase 4 and the restoration of β -oxidation / M.G. Scioli, A. Bielli, S. Agostinelli [et al.]. – Text: visual // *J Vasc Res.* – 2014. – Vol.51, №5. – P.327-37. – doi: 10.1159/000365926.
54. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species / L. He, T. He, S. Farrar [et al.]. – Text: visual // *Cell Physiol Biochem.* – 2017. – Vol.44, №2. – P.532-553. – doi: 10.1159/000485089.
55. Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: The possible role of iron chelation / A.Z. Reznick, V.E. Kagan, R. Ramsey [et al.]. – Text: visual // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1992. – Vol.296. – P.394–401. – doi: 10.1016/0003-9861(92)90589-O.
56. Antonenkov, V.D. Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane / V.D. Antonenkov, J.K. Hiltunen. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – Vol.1822, №9. – P.1374-86. – doi: 10.1016/j.bbadis.2011.12.011.
57. Arginine and Endothelial Function / J. Gambardella, W. Khondkar, M.B. Morelli [et al.]. – Text: visual // *Biomedicines.* – 2020. – Vol.8, N8. – P.277.– doi: 10.3390/biomedicines8080277.
58. Arginine supplementation improves rats' antioxidant system and exercise performance / E.P. Jr. Silva, L.S. Borges, C. Mendes-da-Silva [et al.]. – Text: visual // *Free Radic Res.* – 2017. – Vol.51, №3. – P.281-293. – doi: 10.1080/10715762.2017.1301664.
59. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges / J. Vítěček, A. Lojek, G.Valacchi [et al.]. – Text: visual // *Mediators Inflamm.* – 2012. – Vol.2012. – P. 318087. – doi: 10.1155/2012/318087.
60. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA) Concentrations in Patients with Obesity and the Risk of Obstructive Sleep Apnea (OSA) / Y. Arlouskaya, A. Sawicka, M. Glowala [et al.]. – Text: visual // *J. Clin. Med.* – 2019. – Vol.8. – P.897. – doi: 10.3390/jcm8060897.
61. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia / R.H. Böger, S.M. Bode-Böger, A. Szuba

[et al.]. – Text: visual // *Circulation*. – 1998. – Vol.98, – P.1842–1847. – doi: 10.1161/01.cir.98.18.1842.

62. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A promising biomarker for cardiovascular disease? / G. Bouras, S. Deftereos, D. Tousoulis [et al.]. – Text: visual // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2013. – Vol.13 – P.180–200.

63. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes / K. Krzyzanowska, F. Mittermayer, M. Wolzt [et al.]. – Text: visual // *Diabetes Care*. – 2007. – Vol.30. – P.1834–1839. – doi: 10.2337/dc07-0019.

64. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: High plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality / R.J. Nijveldt, T. Teerlink, B. Van Der Hoven [et al.]. – Text: visual // *Clin. Nutr.* – 2003. – Vol.22. – P.23–30. – doi: 10.1054/clnu.2002.0613.

65. Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients / S. Abedini, A. Meinitzer, I. Holme [et al.]. – Text: visual // *Kidney Int.* – 2010. – Vol.77. – P.44–50. – doi: 10.1054/clnu.2002.0613.

66. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation / K.E. Wellen, G. Hatzivassiliou, U.M. Sachdeva [et al.]. – Text: visual // *Science*. – 2009. – Vol.324, №5930. – P.1076-80. – doi: 10.1126/science.1164097.

67. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine / K.H. Kim, Y.T. Jeong, H. Oh [et al.] – Text: visual // *Nat Med.* – 2013. – Vol.19, №1. – P.83-92. – doi: 10.1038/nm.3014.

68. Banihani, S.A. L-carnitine is a calcium chelator: a reason for its useful and toxic effects in biological systems / S.A. Banihani, M. Bayachou, K. Alzoubi. – Text: visual // *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* – 2015. – Vol.26. – P.141–145.– doi: 10.1515/jbcpp-2014-0016.

69. Barreiro, E. Protein carbonylation and muscle function in COPD and other conditions / E. Barreiro. – Text: visual // *Mass Spectrom Rev.* – 2014. – Vol.33, №3. – P.219-36. – doi: 10.1002/mas.21394.

70. Benefits of L-alanine or L-arginine supplementation against adiposity and glucose intolerance in monosodium glutamate-induced obesity / T.R. Araujo, I.N. Freitas, J.F. Vettorazzi [et al.]. – Text: visual // *Eur J Nutr.* – 2017. – Vol.56, №6. – P.2069–2080. – doi: 10.1007/s00394-016-1245-6
71. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology / T.A. Heinrich, R.S. da Silva, K.M. Miranda [et al.]. – Text: visual // *Br J Pharmacol.* – 2013. – Vol.169, №7. – P.1417-1429. – doi: 10.1111/bph.12217.
72. Bleier, L. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences / L. Bleier, S. Dröse. – Text: visual // *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenergy.* – 2013. – Vol.1827. – P.1320–1331.– doi: 10.1016/j.bbabi.2012.12.002.
73. Brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c: role in CNS fatty acid metabolism, food intake, and body weight / M.J. Wolfgang, S.H. Cha, D.S. Millington [et al.]. – Text: visual // *J Neurochem.* – 2008. – Vol.105. – P.1550-1559. – doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05255.x.
74. Brand, M.D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells / M.D. Brand, D.G. Nicholls. – Text: visual // *Biochemical Journal.* – 2011. – Vol. 435, №2. – P. 297-312. – doi: 10.1042/BJ20110162
75. Brand, M.D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling / M.D. Brand. – Text: visual // *Free Radic. Biol. Med.* – 2016. – Vol.100 – P.14–31. – doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
76. Brand, M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production / M.D. Brand. – Text: visual // *Exp Gerontol.* – 2010. – Vol.45. – P. 466–472. – doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003.
77. Brass, E.P. Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man / E.P. Brass. – Text: visual // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – Vol.54. – P.589–598. – doi: 10.1124/pr.54.4.589.

78. Bredt, D.S. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme / D.S. Bredt, S.H. Snyder. – Text: visual // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87. – P.682–685. – doi: 10.1073/pnas.87.2.682.
79. Bröer, S. The solute carrier 6 family of transporters / S. Bröer, U. Gether. – Text: visual // Br. J Pharmacol. – 2012. – Vol.167. – P.256-278. – doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01975.x.
80. Brookes, P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase / P.S. Brookes. – Text: visual // Mitochondrion. – 2004. – Vol.3. – P. 187-204. – doi: 10.1016/j.mito.2003.10.001.
81. Brooks, D.E. Turnover of carnitine by rat tissues / D.E. Brooks, J.E. McIntosh. – Text: visual // Biochem J. – 1975. – Vol.148, №3. – P.439-445. – doi: 10.1042/bj1480439.
82. Brooks, G. A. Lactate as a fulcrum of metabolism / G. A. Brooks. – Text: visual // Redox Biol. – 2020. – Vol.35. – P.101454. – doi: 10.1016/j.redox.2020.101454.
83. Brooks, G.A. Energy Flux, Lactate Shuttling, Mitochondrial Dynamics, and Hypoxia / G.A. Brooks. – Text: visual // Adv Exp Med Biol. – 2016. – Vol.903. – P.439-455. – doi: 10.1007/978-1-4899-7678-9_29.
84. Brooks, G.A. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory / G.A. Brooks. – Text: visual // Cell Metab. – 2018. – Vol.27,№4. – P.757-785.– doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.008.
85. Bunik, V. I. Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species / V.I. Bunik, C. Sievers. – Text: visual // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269. – P. 5004–5015. – doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03204.x.
86. Cadenas, S. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease / S. Cadenas, J. Aragones, M.O. Landazuri. – Text: visual // Cardiovasc. Res. – 2010. – Vol. 88. – P. 219-228. – doi: 10.1093/cvr/cvq256.
87. Cai, Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.J. Yan. – Text: visual // J Biochem Pharmacol Res. – 2013. – Vol.1, №1. – P.15-26.

88. Caplin, B. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the biology of disease: markers, mediators and regulators? / B. Caplin, J. Leiper. – Text: visual // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32, №6. – P. 1343-1353. – doi: 10.1161/ATVBAHA.112.247726.
89. Carbonylated plasma proteins as potential biomarkers of obesity induced type 2 diabetes mellitus / R.C. Bollineni, M. Fedorova, M. Bluher [et al.]. – Text: visual // *J Proteome Res.* – 2014. – Vol.13. – P.5081–5093. – doi: 10.1021/pr500324y.
90. Carnitine in Alcohol Use Disorders: A Scoping Review / A.B. Bota, J.G. Simmons, A. DiBattista [et al.] – Text: visual // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2021. – Vol. 45, №4. – P.666-674. – doi: 10.1111/acer.14568.
91. Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet function, and oxidative stress / P. Pignatelli, L. Lenti, V. Sanguigni [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol.* – 2003. – Vol.284, №1. – P.41-48. – doi: 10.1152/ajpheart.00249.2002.
92. Carnitine Palmitoyltransferase System: A New Target for Anti-Inflammatory and Anticancer Therapy? / M.Wang, K.Wang, X. Liao [et al.]. – Text: visual // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol.12. – P.760581. – doi: 10.3389/fphar.2021.760581.
93. Carnitine Traffic in Cells. Link With Cancer / L. Console, M. Scalise, T. Mazza [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2020. – Vol. 8. – P. 583850. – doi:10.3389/fcell.2020.583850.
94. Carnitine/acylcarnitine translocase and carnitine palmitoyltransferase 2 form a complex in the inner mitochondrial membrane / L. Console, N. Giangregorio, C. Indiveri [et al.]. – Text: visual // *Mol Cell Biochem.* – 2014. – Vol.394. – P.307-314. – doi: 10.1007/s11010-014-2098-z.
95. Carter, A.L. Biosynthesis and metabolism of carnitine / A.L. Carter, T.O. Abney, D.F. Lapp. – Text: visual // *J Child Neurol.* – 1995. – Vol.10 (Suppl 2). – P.3–7.
96. Cationic amino acid transporters and *Salmonella Typhimurium* ArgT collectively regulate arginine availability towards intracellular *Salmonella* growth / P. Das, A. Lahiri, M. Sen [et al.]. – Text: visual // *PLoS One.* – 2010. – Vol.5. – P.15466. – doi: 10.1371/journal.pone.0015466.

97. Cecchini, G. Respiratory complex II: role in cellular physiology and disease / G. Cecchini. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – Vol.1827, №5. – P.541-542. – doi: 10.1016/j.bbabi.2013.02.010.

98. Chatterji, A. Stability of S-nitrosothiols and S-nitrosylated proteins: A struggle for cellular existence! / A. Chatterji, R.J. Sengupta. – Text: visual // *Cell Biochem*. 2021. – Vol.122, №11. – P.1579-1593. – doi: 10.1002/jcb.30139.

99. Chinnery, P.F. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders / P.F. Chinnery, D.M. Turnbull // *Am. J. Med. Genet. (Semin. Med. Genet.)*. – 2001. – Vol.106, №1. – P. 94-101. – doi: 10.1002/ajmg.1426

100.Christian, B.E. Mechanism of Protein Biosynthesis in Mammalian Mitochondria / B.E. Christian, L.L. Spremulli. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1819, №9-10. – P. 1035-1054.– doi:10.1016/j.bbagrm.2011.11.009.

101.Control of respiration by nitric oxide in Keilin-Hartree particles, mitochondria and SH-SY5Y neuroblastoma cells / D. Mastronicola, M.L. Genova, M. Arese [et al.]. – Text: visual // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 2003. – Vol. 60, №8. – P. 1752-1759. – doi: 10.1007/s00018-003-3127-3.

102.Control of the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway under pathological and physiological conditions / S. Shiva, V.M. Darley-Usmar, J.Y. Oh [et al.]. – Text: visual // *IUBMB Life*. – 2003. – Vol.55, №10-11. – P.585-90. – doi: 10.1080/152165430310001640489.

103.Costa-Mattioli, M. The integrated stress response: From mechanism to disease / M. Costa-Mattioli, P. Walter. – Text: visual // *Science*. – 2020. – 368. (6489). – P. eaat5314. – doi: 10.1126/science.aat5314.

104.Dedkova, E.N. Modulation of mitochondrial Ca²⁺ by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells / E.N. Dedkova, L.A. Blatter. – Text: visual // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2005. – Vol.289. – P.836 – 845.– doi: 10.1152/ajpcell.00011.2005.

105.Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A / E. Lopez-Vinas, A. Bentebibel, C. Gurunathan [et

al.]. – Text: visual // J Biol Chem. – 2007. – Vol.282. – P.18212-18224. – doi: 10.1074/jbc.M700885200.

106.Denninger, J.W. Guanylate cyclase and the NO/ cGMP signaling pathway / J.W. Denninger, M.A. Marletta. – Text: visual // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – Bioenergetics. – 1999. – Vol.1411, №2. – P.334-350.– doi: 10.1016/s0005-2728(99)00024-9.

107.Dietary supplementation with acetyl-l-carnitine counteracts age-related alterations of mitochondrial biogenesis, dynamics and antioxidant defenses in brain of old rats / L. Nicassio, F. Fracasso, G. Sirago [et al.]. – Text: visual // Exp Gerontol. – 2017. – Vol.98. – P.99-109. – doi: 10.1016/j.exger.2017.08.017.

108.Dikalov, S.I. Physiological Levels of Nitric Oxide Diminish Mitochondrial Superoxide. Potential Role of Mitochondrial Dinitrosyl Iron Complexes and Nitrosothiols / S.I. Dikalov, V.I. Mayorov, A.V. Panov. – Text: visual // Front Physiol. – 2017. – Vol.8. – P.907. – doi: 10.3389/fphys.2017.00907.

109.Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria / K.B. Shumaev, A.L. Dudylyna, M.V. Ivanova [et al.]. – Text: visual // Biofactors. – 2018. – Vol.44, №3. – P.237-244. – doi: 10.1002/biof.1418.

110.Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide / C.A. Bosworth, J.C.Jr. Toledo, J.W. Zmijewski [et al.]. – Text:visual // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106. – P. 4671–4676. – doi: 10.1073/pnas.0710416106 doi: 10.12688/f1000research.19998.1.

111.Discovering common combinatorial histone modification patterns in the human genome / C. Linghu, H. Zheng, L. Zhang [et al.]. – Text: visual // Gene. – 2013. – Vol.518, №1. – P.171-178. – doi: 10.1016/j.gene.2012.11.038.

112.Distinct mitochondrial defects trigger the integrated stress response depending on the metabolic state of the cell / E. Mick, D.V. Titov, O.S. Skinner [et al.]. – Text: visual // eLife. – 2020. – Vol.9. – P. e49178. – doi: 10.7554/eLife.49178.

113.Doulias, PT. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism / P.T. Doulias, M. Tenopoulou – Text: visual // F1000Res. – 2020. – Vol.9. – F1000 Faculty Rev-1190.– doi: 10.12688/f1000research.19998.

114.Dröse, S. Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain / S. Dröse, U. Brandt. – Text: visual // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Vol. 748. – P. 145–169.

115.Du, Q. Cross-Regulation Between iNOS/NO and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathways / Q. Du, D.A. Geller. – Text: visual // *Nitric Oxide* / editors: L. J. Ignarro, B. A. Freeman. – Third Edition. – Academic Press, 2017. – Chapter 7. – P. 97–105. – doi:10.1016/B978-0-12-804273-1.00007.

116.Dual modulation of both lipid oxidation and synthesis by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in cultured myotubes / D.O. Espinoza, L.G. Boros, S. Crunkhorn [et al.]. – Text: visual // *FASEB J*. – 2010. – Vol. 24 – P. 1003–1014. – doi: 10.1096/fj.09-133728.

117.Dual role of arginine metabolism in establishing pathogenesis / M. Gogoi, A. Datey, K.T. Wilson [et al.]. – Text: visual // *Curr Opin Microbiol*. – 2016. – Vol. 9. – P. 43-48. – doi: 10.1016/j.mib.2015.10.005.

118.Durieux, J. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity / J. Durieux, S. Wolff, A. Dillin. – Text: visual // *Cell*. – 2011. – Vol.144, №1. – P.79-91. – doi: 10.1016/j.cell.2010.12.016.

119.Effect of acetyl-L-carnitine on lipid peroxidation and xanthine oxidase activity in rat skeletal muscle / C. Di Giacomo, F. Latteri, C. Fichera [et al.]. – Text: visual // *Neurochem Res*. – 1993. – Vol.18, №11. – P.1157-62. – doi: 10.1007/BF00978367.

120.Effect of homocysteine on the L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in human platelets / J. Li, Y. Zhang, X. Yao [et al.]. – Text: visual // *Heart Vessels*. – 2002. – Vol.16, №2. – P.46-50. – doi: 10.1007/s380-002-8316-y.

121.Effect of L-Arginine on spermatogenesis of the diabetic rat / A.S. Jarad, R.M. Eyhab, AL-Samawy [et al.]. – Text: visual // *Basrah Journal of Veterinary Research*. – 2011. – Vol. 10, Iss2. – P. 19-32.

122.Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax / R.Vardiyan, D. Ezati, M. Anvari [et al.]. – Text: visual // *Clin Exp Reprod Med*. – 2020. – Vol. 47, №3. – P.155-160. – doi: 10.5653/cerm.2019.03440.

123.Effects of acute L-carnitine supplementation on nitric oxide production and oxidative stress after exhaustive exercise in young soccer players / G.N. Atalay O. G. Erikoglu, B. F. Sezen [et al.]. – Text: visual // *J Sports Med Phys Fitness*. – 2015. – Vol.55, №1-2. – P.9-15.

124.Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha / J.L. Li, Q.Y.Wang, H.Y. Luan [et al.]. – Text: visual // *J. Biomed. Sci.* – 2012. – Vol.19. – P.32. – doi: 10.1186/1423-0127-19-32.

125.Effects of mild hyperhomocysteinemia on electron transport chain complexes, oxidative stress, and protein expression in rat cardiac mitochondria / V. Timkova, Z.Tatarkova, J. Lehotsky [et al.]. – Text: visual // *Mol. Cell. Biochem.* – 2016. –Vol. 411, №1-2. – P. 261-270. – doi: 10.1007/s11010-015-2588-7.

126.Epididymal markers in human infertility / T.G. Cooper, C.H. Yeung, D. Nashan [et al.]. – Text: visual // *J Androl.* – 1988. – Vol.9, №2. – P.91-101.– doi: 10.1002/j.1939-4640.1988.tb01016.x.

127.Evans, A.M. Pharmacokinetics of L-carnitine / A.M. Evans, G. Fornasini. – Text: visual // *Clin Pharmacokinet.* – 2003. – Vol.42, №11. – P.941-67. – doi: 10.2165/00003088-200342110-00002.

128.Fedorova, M. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies / M. Fedorova, R.C. Bollineni, R. Hoffmann. – Text: visual // *Mass Spectrom Rev.* – 2014. – Vol.33, №2. – P.79-97. – doi: 10.1002/mas.21381.

129.Fernandez-Marcos, P. J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis / P. J. Fernandez-Marcos, J. Auwerx. – Text: visual // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2011. – Vol.93. – P.884S–890S. – doi: 10.3945/ajcn.110.001917.

130.FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study / S. Pihko, H. Darin, N. Öunap [et al.]. – Text: visual // *Lancet Neurol.* – 2011. – Vol.10, №9. – P. 806-818. – doi: 10.1016/S1474-4422(11)70155-7.

131. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway / M.D. Chau, J. Gao, Q. Yang [et al.]. – Text: visual // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol.107, №28. – P.12553-12558. – doi: 10.1073/pnas.1006962107.

132. Finkel, T. From sulfenylation to sulfhydration: what a thiolate needs to tolerate / T. Finkel. – Text: visual // Sci Signal. 2012. – Vol.5. – P.e10. – doi: 10.1126/scisignal.2002943.

133. Finkelstein, J.D. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess / J.D. Finkelstein, J. J. Martin. – Text: visual // The journal of biological chemistry. – 1986. – Vol. 261. – № 4. – P. 1582-1587.

134. Frohnert, B.I. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance / B.I. Frohnert, D.A. Bernlohr. – Text: visual // Adv Nutr. – 2013. – Vol.4, №2. – P.157-63. – doi: 10.3945/an.112.003319.

135. Functional proteomic analysis of a three-tier PKC ϵ – Akt – eNOS signaling module in cardiac protection / J. Zhang, C.P. Baines, C. Zong [et al.]. – Text: visual // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2005. – Vol.288. – P.954 – 961. doi: 10.1152/ajpheart.00756.2004.

136. Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood- brain barrier / Y. Kido, I.Tamai, A. Ohnari [et al.]. – Text: visual // J Neurochem. – 2001. – Vol.79. – P.959-969. – doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00621.x.

137. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases / Y. Fujita, M. Ito, T. Kojima [et al.]. – Text: visual // Mitochondrion. – 2015. – Vol. 20. – P.34-42. – doi: 10.1016/j.mito.2014.10.006.

138. Goldenthal, M.J. Mitochondrial signaling pathways: a receiver / integrator organelle / M.J. Goldenthal, J. Marín-García. – Text: visual // Mol Cell Biochem. – 2004. – Vol.262, №1-2. – P.1-16. – doi: 10.1023/b:mcbi.0000038228.85494.3b.

139. Gülçin, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine / I. Gülçin. – Text: visual // Life Sciences. – 2006. – Vol.78, №8. – P. 803-811. – doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.103.

140.Gustafsson, C.M. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA / C.M. Gustafsson, M. Falkenberg, N.G. Larsson. – Text: visual // *Annu Rev Biochem.* – 2016.– Vol. 85.– P.133-160.– doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014402.

141.H₂O₂-Activated Mitochondrial Phospholipase iPLA₂γ Prevents Lipotoxic Oxidative Stress in Synergy with UCP2, Amplifies Signaling via G-Protein–Coupled Receptor GPR40, and Regulates Insulin Secretion in Pancreatic β-Cells / J. Ježek, A. Dlasková, J. Zelenka [et al.]. – Text: visual // *Nature. Antioxid. Redox Signal.* – 2015. – Vol.23. – P.958–972. – doi: 10.1089/ars.2014.6195.

142.Handschin, C. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism / C. Handschin, B. M. Spiegelman. – Text: visual // *Endocr. Rev.* – 2006. – Vol.27. – P.728–735. – doi: 10.1210/er.2006-0037.

143.Hansen, K.G. Transport of Proteins into Mitochondria / K.G. Hansen, J.M. Herrmann. – Text: visual // *Protein J.* – 2019. – Vol.38, №3. – P.330-342. – doi: 10.1007/s10930-019-09819-6.

144.Hao, N. Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression / N. Hao, E.K. O'Shea. – Text: visual // *Nat Struct Mol Biol.* – 2011. – Vol.19,№1. – P.31-39. – doi: 10.1038/nsmb.2192.

145.Hecker, M. Role of protein carbonylation in diabetes / M. Hecker, A.H. Wagner. – Text: visual // *J Inherit Metab Dis.* – 2018. – Vol.41, №1. – P.29-38.– doi: 10.1007/s10545-017-0104-9

146.Held, N.M. Mitochondrial quality control pathways as determinants of metabolic health / N.M. Held, R.H. Houtkooper. – Text: visual // *Bioessays.* – 2015. – Vol.37, №8. – P.867-76. – doi: 10.1002/bies.201500013.

147.Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems / P. Kaplan, Z. Tatarkova, M.K. Sivonova [et al.]. – Text: visual // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol.21,№20. – P.7698. – doi: 10.3390/ijms21207698.

148.Homocysteine Impairs the Nitric Oxide Synthase Pathway. Role of Asymmetric Dimethylarginine / M.C. Stühlinger, P.S.Tsao, Her Jeng-Horng [et al.]. –

Text: visual // *Circulation*. – 2001. – Vol. 104. – P. 2569-2575. – doi: 10.1161/hc4601.098514.

149. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport / L. Jin, R.B. Caldwell, T. Li-Masters [et al.]. – Text: visual // *Journal of physiology and pharmacology*. – 2007. – Vol. 58, № 2. – P. 191-206.

150. Houten, S.M. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation / S.M. Houten, R.J. Wanders. – Text: visual // *J Inherit Metab Dis*. – 2010. – Vol. 33. – P. 469–477. – doi: 10.1007/s10545-010-9061-2.

151. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation / S.G. Rhee, Y.S. Bae, S.R. Lee [et al.]. – Text: visual // *Sci STKE*. – 2000. – Vol. 2000 (53). – P. pe1. – doi: 10.1126/stke.2000.53.pe1.

152. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection / A.J. Kanai, L.L. Pearce, P.R. Clemens [et al.]. – Text: visual // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2001. – Vol. 98. – P. 14126-14131. – doi: 10.1073/pnas.241380298.

153. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 3: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase / G. Schumann, R. Bonora, F. Ceriotti [et al.]. – Text: visual // *Clin Chem Lab Med*. – 2002. – Vol. 40, №6. – P. 643-648. – doi: 10.1515/CCLM.2002.111.

154. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver / T.E. Bates, A. Loesch, G. Burnstock [et al.]. – Text: visual // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1995. – Vol. 213. – P. 896-900. – doi: 10.1006/bbrc.1995.2213.

155. Implications of Oxidative and Nitrosative Post-Translational Modifications in Therapeutic Strategies against Reperfusion Damage / M. Buelna-Chontal, W.R. García-Niño, A. Silva-Palacios [et al.]. – Text: visual // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, №5. – P. 749. – doi: 10.3390/antiox10050749.

156. Increased plasma homocysteine in liver cirrhosis / A. Bosy-Westphal, S. Petersen, H. Hinrichsen [et al.]. – Text: visual // *Hepatol Res.* – 2001. – Vol.20, №1. – P.28-38. – doi: 10.1016/s1386-6346(00)00119-4.

157. Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein / S. Pugazhenti, E. Miller, C. Sable [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274, №39. – P.27529-35. – doi: 10.1074/jbc.274.39.27529.

158. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B / E.I. Closs, F.Z. Basha, A. Habermeier [et al.]. – Text: visual // *Nitric Oxide.* – 1997. – Vol.1. – P.65–73. – doi: 10.1006/niox.1996.0106.

159. Interplay between oxidant species and energy metabolism / C. Quijano, M. Trujillo, L. Castro [et al.]. – Text: visual // *Redox Biol.* – 2016. – Vol.8 – P.28-42. – doi: 10.1016/j.redox.2015.11.010.

160. Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function / R.J. Aitken, H.M. Flanagan H. Connaughton [et al.]. – Text: visual // *Andrology.* – 2016. – Vol.4, №2. – P.345-360. – doi: 10.1111/andr.12157.

161. Involvement of L-carnitine in cellular metabolism: beyond Acyl-CoA transport / S.P. Chapela, N. Krieger, E.H. Fernández [et al.]. – Text: visual // *Mini Rev Med Chem.* – 2009. – Vol.9, №13. – P.1518-26. – doi: 10.2174/138955709790361502.

162. Is Mitochondrial Dysfunction a Common Root of Noncommunicable Chronic Diseases? / A. Diaz-Vegas, P. Sanchez-Aguilera, J.R. Krycer [et al.]. – Text: visual // *Endocr Rev.* – 2020. – Vol.41, №3. – P. bnaa005. – doi: 10.1210/endrev/bnaa005.

163. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude [et al.]. – Text: visual // *Nature.* – 2014. – Vol.515. – P.431–435.– doi: 10.1038/nature13909.

164. Jakubowski, H. Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease / H. Jakubowski. – Text: visual // *Physiol Rev.* – 2019. – Vol. 99. – P.555– 604. – doi:10.1152/physrev.00003.2018.

165.Jazwinski, S.M. The yeast retrograde response as a model of intracellular signaling of mitochondrial dysfunction / S.M. Jazwinski, A. Kriete. – Text: visual // *Front Physiol.* – 2012. – Vol.3. – P.139. – doi: 10.3389/fphys.2012.00139.

166.Ježek, P. Redox Signaling from Mitochondria: Signal Propagation and Its Targets / P. Ježek, B. Holendová, L. Plecítá-Hlavatá. – Text: visual // *Biomolecules.* – 2020. – Vol.10, №1. – P.93. – doi: 10.3390/biom10010093.

167.Jogl, G. Structure and Function of Carnitine Acyltransferases / G. Jogl, Y.-S. Hsiao, L. Tong. – Text: visual // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2004. – Vol.1033, №1. – P.17–29. – doi:10.1196/annals.1320.002.

168.Jones, S.M. Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex / S.M. Jones, S.J.Yeaman. – Text: visual // *Biochem J.* – 1987. – Vol. 242, №3. – P. 935. – doi: 10.1042/bj2370621.

169.Kaelin, W.G Jr. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway / W.G. Jr. Kaelin, P.J. Ratcliffe. – Text: visual // *Mol Cell.* – 2008. – Vol.30. – P.393–402. – doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.

170.Kar, S. Impact of SOD in eNOS uncoupling: a two-edged sword between hydrogen peroxide and peroxynitrite / S. Kar, B. Bhandar, M. Kavdia. – Text: visual // *Free Radic Res.* – 2012.– Vol.46,№12. – P.1496-513. – doi: 10.3109/10715762.2012.731052.

171.Kerner, J. Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management / J. Kerner, C. Hoppel. – Text: visual // *Annu. Rev. Nutr.* – 1998. – Vol.18. – P.179–206. – doi: 10.1146/annurev.nutr.18.1.179.

172.Kim-Shapiro, D.B. Mechanisms of nitrite bioactivation / D.B. Kim-Shapiro, M.T. Gladwin. – Text: visual // *Nitric Oxide.* – 2014. – Vol.38. – P. 58-68. – doi: 10.1016/j.niox.2013.11.002.

173.Klose, R.J. Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation / R.J. Klose, Y. Zhang. – Text: visual // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – Vol.8, №4. – P.307-318. – doi: 10.1038/nrm2143.

174.Koepsell, H. Organic cation transporters in health and disease / H. Koepsell. – Text: visual // *Pharmacol. Rev.* – 2020. – Vol.72. – P.253–319. – doi: 10.1124/pr.118.015578.

175.Koepsell, H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions / H. Koepsell. – Text: visual // *Mol. Aspects Med.* – 2013. – Vol.34. – P.413–435. – doi: 10.1016/j.mam.2012. 10.010.

176.Kopincová, J. L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? / J. Kopincová, A. Púžserová, I. Bernátová. – Text: visual // *Pharmacol Reports.* – 2012. – Vol.64. – P. 511–520. – doi: 10.1016/s1734-1140(12)70846-0.

177.L -propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector / A.Vanella, A. Russo, R. Acquaviva [et al.]. – Text: visual // *Cell Biol Toxicol.* – 2000. – Vol.16, №2. – P.99-104. – doi: 10.1023/a:1007638025856.

178.Lactate in contemporary biology: a phoenix risen / G.A. Brooks, J.A. Arevalo, A.D. Osmond [et al.]. – Text: visual // *J Physiol.* – 2022. – Vol. 600, №5. – P.1229-1251. – doi: 10.1113/JP280955

179.Lactate, a Product of Glycolytic Metabolism, Inhibits Histone Deacetylase Activity and Promotes Changes in Gene Expression / T. Latham, L. Mackay, D. Sproul [et al.]. – Text: visual // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol.40. – P.4794–4803. – doi:10.1093/nar/gks066

180.Lactate-Mediated Epigenetic Reprogramming Regulates Formation of Human Pancreatic Cancer-Associated Fibroblasts / T.D. Bhagat, D.Von Ahrens, M.Dawlaty [et al.]. – Text: visual // *Elife.* – 2019. – Vol.8 –P.e50663.– doi:10.7554/eLife.50663

181.Lactylation, a Novel Metabolic Reprogramming Code: Current Status and Prospects / A.N. Chen, Y. Luo, Y.H. Yang [et al.]. – Text: visual // *Front Immunol.* – 2021. – Vol.12. – P.688910. – doi: 10.3389 /fimmu.2021.688910.

182.Lancaster, J.J. Nitric oxide: a brief overview of chemical and physical properties relevant to therapeutic applications / J. J. Lancaster. – Text: visual // *Future Sci OA.* – 2015. – Vol.1, №1. – P. FSO59. – doi: 10.4155/fso.15.59.

183.L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway / M. Liang, Z. Wang, H. Li [et al.]. – Text: visual // *Food Chem Toxicol.* – 2018. – Vol.115. – P.315-328. – doi: 10.1016/j.fct.2018.03.029.

184.L-Carnitine and heart disease / Z.Y. Wang, Y.Y. Liu, G.H. Liu [et al.]. – Text: visual // *Life Sci.* – 2018. – Vol.194. – P.88-97. – doi: 10.1016/j.lfs.2017.12.015.

185.L-carnitine exerts a nutrigenomic effect via direct modulation of nuclear receptor signaling in adipocytes, hepatocytes and SKMC, demonstrating its nutritional impact / L. Förster, D. Indra, K. Rosenberger [et al.]. – Text: visual // *Nutr Res.* – 2021. – Vol.85. – P.84-98. – doi: 10.1016/j.nutres.2020.11.003.

186.L-Carnitine in Drosophila: A Review / M.R. Carillo, C. Bertapelle, F. Scialò [et al.]. – Text: visual // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – Vol.9, №12. – P.1310. – doi: 10.3390/antiox9121310.

187.L-carnitine preserves endothelial function in a lamb model of increased pulmonary blood flow / S. Sharma, A. Aramburo, R. Rafikov [et al.]. – Text: visual // *Pediatr Res.* – 2013. – Vol.74, №1. – P.39-47. – doi: 10.1038/pr.2013.71.

188.L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation / N. Andrieu-Abadie, J.P. Jaffrezou, S. Hatem [et al.]. – Text: visual // *FASEB J.* – 1999. – Vol.13, №12. – P.1501-10. – doi: 10.1096/fasebj.13.12.1501.

189.L-carnitine protects human hepatocytes from oxidative stress-induced toxicity through Akt-mediated activation of Nrf2 signaling pathway / J. Li, Y. Zhang, H. Luan [et al.]. – Text: visual // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2016. – Vol.94. – P.517–525. – doi: 10.1139/cjpp-2015-0305.

190.L-carnitine treatment of insulin resistance: A systematic review and meta-analysis / Y.Xu, W. Jiang, G.Chen [et al.] – Text: visual // *Adv Clin Exp Med.* – 2017. – Vol. 26, №2. – P.333-338. – doi: 10.17219/acem/61609.

191.Lee, K. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex / K. Lee, J. Kerner, C.L. Hoppel. – Text:

visual // J Biol Chem. – 2011. – Vol.286. – P.25655-25662.–
doi: 10.1074/jbc.M111.228692.

192.Lee, M.S. Role of mitochondrial function in cell death and body metabolism / M.S. Lee. – Text: visual // Front Biosci (Landmark Ed). – 2016. – Vol.21, №6. – P.1233-1244. – doi: 10.2741/4453.

193.Levine, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease / R.L. Levine. – Text: visual // Free Radic Biol Med. – 2002. – Vol. 32, №9. – P.790-796. – doi: 10.1016/s0891-5849(02)00765-7.

194.Li, N. Role of Carnitine in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Other Related Diseases: An Update / N. Li, H. Zhao. – Text: visual // Front Med (Lausanne). – 2021. – Vol.8. – P.689042. – doi: 10.3389/fmed.2021.689042.

195.Li, S. Dietary L-arginine supplementation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) alters the microbial population and activates intestinal fatty acid oxidation / S. Li, C. Wang, Z. Wu. – Text: visual // Amino Acids. – 2022. – Vol.54, №3. – P.339-351. – doi: 10.1007/s00726-021-03018-3.

196.Lin, J. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators / J. Lin, C.Handschi, B.M. Spiegelman. – Text: visual // Cell Metab. – 2005. – Vol.1. – P. 361–370. – doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.004.

197.Lohninger, A. L-Carnitine: New Aspects of a Known Compound – A Brief Survey / A. Lohninger, G. Pittner, F. Pittner. – Text: visual // Monatsh. Chem. – 2005. – Vol.136. – P.1255–1268. – doi: 10.1007/s00706-005-0339-2.

198.Longo, N. Carnitine transport and fatty acid oxidation / N. Longo, M. Frigeni, M. Pasquali. – Text: visual // Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol.1863, №10. – P.2422-35. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.023. 249

199.Lundberg, J.O. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin. – Text: visual // Nature Reviews Drug Discovery. – 2008. – № 7. – P. 156-167.

200.Lysine succinylation and lysine malonylation in histones / Z. Xie, J. Dai, L. Dai [et al.]. – Text: visual // Mol Cell Proteomics. – 2012. – Vol.11. – P.100–107. – doi: 10.1074/mcp.M111.015875.

201. Magoulas, P. L. Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management / P. L. Magoulas, A. W. El-Hattab. – Text: visual // Orphanet. J. Rare Dis. – 2012. – Vol.7. – P.68. – doi: 10.1186/1750-1172-7-68.

202. Mailloux, R.J. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production / R.J. Mailloux. – Text: visual // Antioxidants (Basel). – 2020. – Vol. 9, №6. – P.472. – doi: 10.3390/antiox9060472.

203. Marrocco, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans / I. Marrocco, F. Altieri, I. Peluso. – Text: visual // Oxid Med Cell Longev. – 2017. – Vol. 2017. – P.6501046. – doi: 10.1155/2017/6501046.

204. Martínez-Ruiz, A. Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms / A. Martínez-Ruiz, S. Cadenas, S. Lamas. – Text: visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2011. – Vol.51, №1. – P.17–29. – doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.010.

205. Matilainen, O. Mitochondria and Epigenetics - Crosstalk in Homeostasis and Stress / O. Matilainen, P.M. Quirós, J. Auwerx. – Text: visual // Trends Cell Biol. – 2017. – Vol.27, №6. – P.453-463. – doi: 10.1016/j.tcb.2017.02.004.

206. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide / D.A. Wink, K.M. Miranda, M.G. Espey [et al.]. – Text: visual // Antioxid. Redox Signal. – 2001. – Vol.3. – P. 203–213. – doi: 10.1089/152308601300185179.

207. Metabolic roles of PGC-1 α and its implications for type 2 diabetes / A. Besseiche, J.P. Riveline, J.F. Gautier [et al.]. – Text: visual // Diabetes Metab. – 2015. – Vol. 41. – P. 347–357. – doi: 10.1016/j.diabet.2015.02.002.

208. Methionine Metabolism by Rat Muscle and Other Tissues - Occurrence of a New Carnitine Intermediate / P.W. Scislowski, B.M. Hokland, W. I. Davis-van Thienen [et al.]. – Text: visual // Biochemical Journal. – 1987. – Vol. 247, №1. – P. 35–40. – doi: 10.1042/bj2470035.

209. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health / T.R. Figueira, M.H. Barros, A.A. Camargo [et

al.]. – Text: visual // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – Vol.18, №16. – P.2029-2074. – doi: 10.1089/ars.2012.4729.

210.Mitochondria as key components of the stress response / I. Manoli, Salvatore Alesci, M.R. Blackman [et al.]. – Text: visual // *Trends Endocrinol Metab.* – 2007. – Vol.18, №5. – P.190-198. – doi: 10.1016/j.tem.2007.04.004.

211.Mitochondria-hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks / A.J.Anderson, T.D. Jackson, D.A. Stroud [et al.]. – Text: visual // *Open Biol.* – 2019. – Vol.9, №8. – P.190126. – doi: 10.1098/rsob.190126.

212.Mitochondrial biology. Replication-transcription switch in human mitochondria / K. Agaronyan, Y.I. Morozov, M. Anikin [et al.]. . – Vol.– Text: visual // *Science.* – 2015. – Vol. 347(6221). – P.548-551.– doi: 10.1126/science.aaa0986.

213.Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells / E.N. Dedkova, X. Ji, S.L. Lipsius [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2004. – Vol.286. – P.406–415. – doi: 10.1152/ajpcell.00155.2003.

214.Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes / P.R. Castello, P.S. David, T. McClure [et al.]. – Text: visual // *Cell Metabolism.* – 2006. – № 3. – P. 277-287. – doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.011.

215.Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease / J.N. Peoples, A. Saraf, N. Ghazal [et al.]. – Text: visual // *Exp Mol Med.* – 2019. – Vol.51, №12. – P.1-13. – doi: 10.1038/s12276-019-0355-7.

216.Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) / R.Z. Zhao, S.Jiang, L. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Int J Mol Med.* – 2019. – Vol.44, №1. – P.3-15. – doi: 10.3892/ijmm.2019.4188.

217.Mitochondrial lactate metabolism: history and implications for exercise and disease / B. Glancy, D.A. Kane, A.N. Kavazis [et al.]. – Text: visual // *J Physiol.* – 2021. – Vol.599, №3. – P.863-888. – doi: 10.1113/JP278930.

218.Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist? / Z. Lacza, E. Pankotai, A. Csordás [et al.]. – Text: visual // Nitric Oxide. 2006. – Vol.14, №2. – P.162-168. – doi: 10.1016/j.niox.2005.05.011.

219.Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later / A.Y. Andreyev, Y.E. Kushnareva, A.N. Murphy [et al.]. – Text: visual // Biochemistry (Mosc). – 2015. – Vol.80, №5. – P.517-531. – doi: 10.1134/S0006297915050028.

220.Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1 / E.T. Chouchani, L. Kazak, M.P. Jedrychowski [et al.]. – Text: visual // Nature. – 2016. – Vol.532. – P.112–116.– doi: 10.1038/nature17399.

221.Mitochondrial function in development and disease / M.P. Rossmann, S.M. Dubois, S. Agarwal [et al.]. – Text: visual // Dis Model Mech. – 2021. –Vol.14, №6. – P. dmm048912. – doi: 10.1242/dmm.048912.

222.Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target / J. Zhang, H.Xiang, J. Liu [et al.]. – Text: visual // Theranostics. – 2020. – Vol.10, №18. – P. 8315-8342.– doi: 10.7150/thno.45922.

223.Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch / F.R. Palma, C. He, J.M. Danes [et al.]. – Text: visual // Antioxid Redox Signal. – 2020. – Vol.32, №10. – P.701-714. – doi: 10.1089/ars.2019.7962.

224.Mitochondrial threshold effects / R. Rossignol, B. Faustin, C. Rocher [et al.]. – Text: visual // Biochem J. – 2003. – Vol. 370 (Pt 3). – P.751-762. – doi: 10.1042/BJ20021594.

225.Mitochondrial unfolded protein response: An emerging pathway in human diseases / L. Zhu, Q. Zhou, L. He [et al.]. – Text: visual // Free Radic Biol Med. – 2021. – Vol.163 – P.125-134. – doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.013.

226.Modanloo, M. Analyzing Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis: Potential Role of L-carnitine / M. Modanloo, M. Shokrzadeh. – Text: visual // Iran J Kidney Dis. – 2019. – Vol.13, №2. – P.74-86.

227.Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice / I. Tamai, R. Ohashi, J.I. Nezu [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol.275. – P.40064- 40072. – doi: 10.1074/jbc.M005340200.

228.Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle / C.K. Garcia, J.L. Goldstein, R.K. Pathak [et al.]. – Text: visual // *Cell.* – 1994. – Vol.76, №5. – P.865-873. – doi: 10.1016/0092-8674(94)90361-1.

229.Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p / C.W.van Roermund, E.H. Hetteema, M.van den Berg [et al.]. – Text: visual // *EMBO J.* – 1999. – Vol.18, №21. – P.5843-52. – doi: 10.1093/emboj/18.21.5843.

230.Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition / A. Enomoto, M.F. Wempe, H. Tsuchida [et al.] – Text: visual // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol.277. – P. 36262-36271. – doi: 10.1074/jbc.M203883200.

231.Monocarboxylate transporters 1 and 4: expression and regulation by PPAR α in ovine ruminal epithelial cells / F. Benesch, F. Dengler, F. Masur [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2014. – Vol.307, №2. – P.1428-1437. – doi: 10.1152/ajpregu.00408.2013.

232.Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy. – Text: visual // *Biochem J.* – 2009. – Vol. 417. – P.1–13. – doi: 10.1042/BJ20081386.

233.Na⁺- and Cl⁻-coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB (0,⁺) from mouse colon expressed in HRPE cells and *Xenopus* oocytes / T. Nakanishi, T. Hatanaka, W. Huang [et al.]. – Text: visual // *J Physiol.* – 2001. – Vol.532. – P.297-304. – doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0297f.x.

234.Napolitano, G. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species / G. Napolitano, G. Fasciolo, P. Venditti. – Text: visual // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – Vol.10, №11. – P.1824. – doi: 10.3390/antiox10111824.

235. Neurotoxic Effect of Fipronil in Male Wistar Rats: Ameliorative Effect of L-Arginine and L-Carnitine / Y.K. Mahmoud, A.A. Ali, H.M.A. Abdelrazek [et al.]. – Text: visual // *Biology* (Basel). – 2021. – Vol.10, №7. – P. 682. – doi: 10.3390/biology10070682.

236. Ng, M.Y.W. Quality control of the mitochondrion / M.Y.W. Ng, T. Wai, A. Simonsen. – Text: visual // *Dev Cell*. – 2021. – Vol.56, №7. – P.881-905. – doi: 10.1016/j.devcel.2021.02.009.

237. Niki, E. Oxidative stress and antioxidants: distress or eustress? / E. Niki. – Text: visual // *Arch Biochem Biophys*. – 2016. – Vol.595. – P.19-24. – doi: 10.1016/j.abb.2015.11.017

238. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome / L. Litvinova, D.N. Atochin, N. Fattakhov [et al.]. – Text: visual // *Front. Physiol*. – 2015. – Vol. 6. – P. 20. – doi: 10.3389/fphys.2015.00020.

239. Nitric oxide and peroxynitrite cause irreversible increases in the K_m for oxygen of mitochondrial cytochrome oxidase: in vitro and in vivo studies / C.E. Cooper, N.A. Davies, M. Psychoulis [et al.]. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2003. – Vol. 1607, №1. – P. 27-34. – doi: 10.1016/j.bbabi.2003.08.003.

240. Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase / H. Li, H. Cui, T.K. Kundu [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem*. – 2008. – Vol.283, №26. – P. 17855–63.

241. Nitric oxide scavenging modulates mitochondrial dysfunction induced by hypoxia/reoxygenation / E. Robin, A. Derichard, B. Vallet [et al.]. – Text: visual // *Pharmacol Rep*. – 2011. – Vol. 63, №5. – P.1189-94. – doi: 10.1016/s1734-1140(11)70638-7.

242. Nitric oxide synthase-2 regulates mitochondrial Hsp60 chaperone function during bacterial peritonitis in mice / H.B. Suliman, A. Babiker, C.M. Withers [et al.]. – Text: visual // *Free Radic Biol Med*. – 2010. – Vol.48. – P.736-746. – doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.019.

243. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation / K. Cosby, K.S. Partovi, J.H. Crawford [et al.]. – Text: visual // *Nat Med.* – 2003. – Vol. 9, №12. – P.1498–505.– doi: 10.1038/nm954

244. Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling / V. Fernando, X. Zheng, Y. Walia [et al.]. – Text:visual // *Antioxidants (Basel)*. – 2019. – Vol.8, №9. – P.404. – doi: 10.3390/antiox8090404.

245. Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway / S. Shiva, J.Y. Oh, A.L. Landar [et al.]. – Text: visual // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38. – P. 297-306.– doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.037.

246. Niyazov, D.M. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment / D.M. Niyazov, S.G. Kahler, R.E. Frye. – Text: visual // *Mol Syndromol.* – 2016. – Vol.7, №3. – P.122-37. – doi: 10.1159/000446586.

247. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress / I. Bellezza, I. Giambanco, A. Minelli [et al.]. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2018. – Vol.1865, №5. – P.721-733.– doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.

248. OCTN: a small transporter subfamily with great relevance to human pathophysiology, drug discovery, and diagnostics / L. Pochini, M. Galluccio, M. Scalise [et al.]. – Text: visual // *SLAS Discov.* – 2019. – Vol.24. – P.89–110. – doi: 10.1177/2472555218812821.

249. Overexpression of PGC-1alpha increases peroxisomal activity and mitochondrial fatty acid oxidation in human primary myotubes / T.Y. Huang, D. Zheng, J.A. Houmard [et al.]. – Text: visual // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2017. – Vol. 312. – P.253–263. – doi: 10.1152/ajpendo.00331.2016.

250. Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for protection of mitochondria against nitrosative damage / F. Schöpfer, N. Riobó, M.C. Carreras [et al.]. – Text: visual // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 349 (Pt 1). – P.35-42. – doi: 10.1042/0264-6021:3490035.

251. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases / E. Dubois-Deruy, V. Peugnet, A. Turkieh [et al.]. – Text: visual // *Antioxidants* (Basel). – 2020. – Vol.9, №9. – P.864. – doi: 10.3390/antiox9090864.

252. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet. – Text: visual // *Physiol Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 1. – 315-424. – doi: 10.1152/physrev.00029.2006.

253. Paradoxical effects of increased expression of PGC-1alpha on muscle mitochondrial function and insulin-stimulated muscle glucose metabolism / C.S. Choi, D.E. Befroy, R. Codella [et al.]. – Text: visual // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105. – P.19926–19931. – doi: 10.1073/pnas.0810339105.

254. Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription / A.B. Al-Mehdi, V.M. Pastukh, B.M. Swiger [et al.]. – Text: visual // *Sci Signal.* – 2012. – Vol.5, №231. – P.47. – doi: 10.1126/scisignal.2002712.

255. Perła-Kaján, J. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans / J. Perła-Kaján, T. Twardowski, H. Jakubowski. – Text: visual // *Amino Acids.* – 2007. – Vol.32, №4. – P.561-572. – doi: 10.1007/s00726-006-0432-9.

256. Perła-Kaján, J. Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia / J. Perła-Kaján, H. Jakubowski. – Text: visual // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol.20. – P.3140. – doi: 10.3390/ijms20133140.

257. Peroxisomal beta-oxidation – a metabolic pathway with multiple functions / Y. Poirier, V.D. Antonenkov, T. Glumoff [et al.]. – Text: visual // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol.1763. – P.1413-1426. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.034.

258. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis / J.J. Lehman, P.M. Barger, A. Kovacs [et al.]. – Text: visual // *J. Clin. Investig.* – 2000. – Vol.106. – P. 847–856. – doi: 10.1172/JCI10268.

259. Philp, A. Lactate - a signal coordinating cell and systemic function / A. Philp, A.L. Macdonald, P.W. Watt. – Text: visual // *J Exp Biol.* – 2005. – Vol.208 (Pt 24). – P.4561-4575. – doi: 10.1242/jeb.01961.

260. Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel / A.P. Wojtovich, C.O. Smith, C.M. Haynes [et al.]. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – Vol.1827, №5. – P.598-611.– doi: 10.1016/j.bbabi.2012.12.007.

261. *Piper sarmentosum* Promotes Endothelial Nitric Oxide Production by Reducing Asymmetric Dimethylarginine in Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells / U.M. Sundar, A.Ugusman, H.K.Chua [et al.]. – Text: visual // *Front. Pharmacol.* – 2019. – Vol.10. – P.1033. – doi: 10.3389/fphar.2019.01033.

262. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus / F. Abbasi, T. Asagmi, J.P. Cooke [et al.]. – Text: visual // *Am. J. Cardiol.* – 2001. – Vol.88. – P.1201–1203. – doi: 10.1016/s0002-9149(01)02063-x.

263. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter / J. Nezu, I. Tamai, A. Oku [et al.]. – Text: visual // *Nat. Genet.* – 1999. – Vol.21. – P.91–94. – doi: 10.1038/5030.

264. Propionyl-L-carnitine improves postischemic blood flow recovery and arteriogenic revascularization and reduces endothelial NADPH-oxidase 4-mediated superoxide production / M.A. Stasi, M.G. Scioli, G. Arcuri [et al.]. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2010. – Vol.30, №3. – P.426-35. – doi: 10.1161/ATVBAHA.109.201533.

265. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes Bound with Hemoglobin on Oxidative Modification by Peroxynitrite / O.V. Kosmachevskaya, E.I. Nasybullina, K.B. Shumaev [et al.]. – Text: visual // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol.22. – P.3649. – doi: 10.3390/ijms222413649.

266. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide / H. Erbas, N. Aydogdu, U. Usta [et al.]. – Text: visual // *Cell biology international.* – 2007. – Vol.31, №11. – P.1414-1419. – doi: 10.1016/j.cellbi.2007.06.007.

267. Protein acetylation in metabolism—metabolites and cofactors / K.J. Menzies, H. Zhang, E. Katsyuba [et al.]. – Text: visual // *Nat Rev Endocrinol.* – 2016. – Vol. 12. – P.43–60. – doi: 10.1038/nrendo.2015.181.

268. Protein carbonylation and metabolic control systems / J.M. Curtis, W.S. Hahn, E.K. Long [et al.]. – Text: visual // *Trends Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol.23, №8. – P.399-406. – doi: 10.1016/j.tem.2012.05.008.

269. Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases / R. Kehm, T. Baldensperger, J. Raupbach [et al.]. – Text: visual // *Redox Biol.* – 2021. – Vol. 42. – P.101901. – doi: 10.1016/j.redox.2021.101901.

270. Pryde, K.R. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: A single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer / K.R. Pryde, J. Hirst. – Text: visual // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P.18056–18065. – doi: 10.1074/jbc.M110.186841.

271. Puigserver, P. Peroxisome proliferator-activated receptor - gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator / P. Puigserver, B.M. Spiegelman. – Text: visual // *Endocr. Rev.* – 2003. – Vol. 24. – P.78–90. – doi: 10.1210/er.2002-0012.

272. Quirós, P.M. Mitonuclear communication in homeostasis and stress / P.M. Quirós, A. Mottis, J. Auwerx. – Text: visual // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2016. – Vol.17, №4. – P.213-26. – doi: 10.1038/nrm.2016.23.

273. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine / R. Radi. – Text: visual // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2018. – Vol. 115, №23. – P.5839-5848.

274. Rajasekar, P. Increase in nitric oxide and reductions in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat / P. Rajasekar, N. Palanisamy, C.V. Anuradha. – Text: visual // *Clin Exp Hypertens.* – 2007. – Vol.29, №8. – P.517-530. – doi: 10.1080/10641960701743998.

275. Rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 forms an oligomeric complex within the outer mitochondrial membrane / A. Faye, C. Esnous, N.T. Price [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282 – P. 26908-26916. – doi: 10.1074/jbc.M705418200.

276. Rebouche, C. J. Carnitine function and requirements during the life cycle / C. J. Rebouche. – Text: visual // *FASEB J.* – 1992. – Vol.6. – P.3379-3386.

277. Rebouche, C. J. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L - carnitine and acetyl - L - carnitine metabolism / C.J. Rebouche. – Text: visual // *Ann NY Acad Sci.* – 2004. – Vol.1033. – P.30 – 41. – doi: 10.1196/annals.1320.003.

278. Rebouche, C.J. Synthesis of carnitine precursors and related compounds / C.J. Rebouche. – Text: visual // *Methods Enzymol.* – 1986. – Vol.123. – P.290–297.– doi: 10.1016/s0076-6879(86)23033-5.

279. Redox regulation of insulin sensitivity due to enhanced fatty acid utilization in the mitochondria / P.M. Rindler, C.L. Crewe, J. Fernandes [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2013. – Vol. 305, №5. – P.634-643. – doi: 10.1152/ajpheart.00799.2012.

280. Reductive Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Cardiomyopathy / W.X. Ma, C.Y. Li, R.Tao [et al.]. – Text: visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol.2020. – P. 5136957. – doi: 10.1155/2020/5136957.

281. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells / H.P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Mol Cell.* – 2000. – Vol.6, №5. – P.1099-1108. – doi: 10.1016/s1097-2765(00)00108-8.

282. Regulation of PGC-1alpha Isoform Expression in Skeletal Muscles / D.V. Popov, E.A. Lysenko, I.V. Kuzmin [et al.]. – Text: visual // *Acta Nat.* – 2015. – Vol. 7. – P.48–59.

283. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine / M.C. Mutomba, H. Yuan, M. Konyavko [et al.]. – Text: visual // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol.478, №1-2. – P.19-25. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01817-2.

284. Regulatory Functions of L-Carnitine, Acetyl, and Propionyl L-Carnitine in a PCOS Mouse Model: Focus on Antioxidant/Antiglycative Molecular Pathways in the

Ovarian Microenvironment / G. Di Emidio, F. Rea, M. Placidi [et al.]. – Text: visual // Antioxidants (Basel). – 2020. – Vol 9, №9. – P. 867.– doi: 10.3390/antiox9090867.

285.Reuter, S. E. Carnitine and Acylcarnitines / S. E. Reuter, A. M. Evans. – Text: visual // Clinical Pharmacokinetic. – 2012. – Vol.51, №9. – P.553–572. – doi:10.1007/bf03261931

286.Rhee, S.G. The Role of Peroxiredoxins in the Transduction of H₂O₂ Signals / S.G. Rhee, H.A. Woo, D. Kang. – Text: visual // Antioxid Redox Signal. – 2018. – Vol.28, №7. – P.537-557. – doi: 10.1089/ars.2017.7167.

287.Robb, G.W. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats / G.W. Robb, R.P. Amann, G.J. Killian. – Text: visual // J Reprod Fert. – 1978. – Vol. 54. – P. 103-107.

288.Robinson, J.W. A survey of the effect of other amino-acids on the absorption of L-arginine and L-lysine by the rat intestine / J.W. Robinson, J.P. Felber. – Text: visual // Gastroenterologia. – 1964. – Vol.101. – P.330-338. – doi: 10.1159/000202330.

289.Robinson, J.W. Interactions between neutral and dibasic amino acids for uptake by the rat intestine / J.W. Robinson. – Text: visual // Eur J. Biochem. – 1968. – Vol. 7, №1. – P.78-89. – doi: 10.1111/j.1432-1033.1968.tb19577.x.

290.Role of carnitine in disease / J.L. Flanagan, P.A. Simmons, J. Vehige [et al.]. – Text: visual // Nutr Metab (Lond). – 2010. – Vol.7. – P.30. – doi: 10.1186/1743-7075-7-30.

291.Role of mitochondria in liver metabolic health and diseases / B. Morio, B. Panthu, A. Bassot [et al.]. – Text: visual // Cell Calcium. – 2021. – Vol. 94. – P.102336. – doi:10.1016/j.ceca.2020.102336.

292.Ryan, M.T. Mitochondrial-nuclear Communications / M.T. Ryan, N.J. Hoogenraad. – Text: visual // Annu. Rev. Biochem. – 2007. – Vol. 76. – P.701-22. – doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720.

293.Salama, A. L-carnitine alleviated acute lung injuries induced by potassium dichromate in rats: involvement of Nrf2/HO-1 signaling pathway / A. Salama, H.M. Fayed, R. Elgohary. – Text: visual // Heliyon. – 2021. – Vol.7, №6. – P.07207. – doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07207.

294.Scala, G. Nitric oxide (NO) expression during annual reproductive activity in buffalo epididymis: A histochemical and immunocytochemical study / G. Scala, L. Maruccio. – Text: visual // *Theriogenology*. – 2012. – Vol.78, №1. – P.49–56. – doi:10.1016/j.theriogenology.

295.Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network / R.C. Scarpulla. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2011. – Vol.1813, №7. – P. 1269-78. – doi: 10.1016 / j.bbamcr. 2010.09.019.

296.Schefffler, I.E. Mitochondria: monograph / I.E. Schefffler. – Wiley-Liss, 1999. – 484 p. – ISBN-10 9780470040737, ISBN-13 978-0470040737. – Text: visual.

297.Schröder, K. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Dosis facit venenum / K. Schröder. – Text: visual // *Exp Physiol*. – 2019. – Vol.104, №4. – P.447-452. – doi: 10.1113/EP087125.

298.Semenza, G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza. – Text: visual // *Physiology (Bethesda)*. – 2009. – Vol. 24, №2. – P. 97-106. – doi: 10.1152/physiol.00045.2008.

299.Sena, L.A. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species / L.A. Sena, N.S. Chandel. – Text: visual // *Mol Cell*. – 2012. – Vol.48, №2. – P. 158-167. – doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025. PMC3484374.

300.Shapira, A.H.V. Mitochondrial diseases / A.H.V. Shapira. – Text: visual // *The Lancet*. – 2012. – Vol. 379, issue 9828. – P. 1825-1834. – doi: 10.1016/S0140-6736(11)61305-6.

301.Shaughnessy, D.T. Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress / D.T. Shaughnessy, K. McAllister, L. Worth. – Text: visual // *Environ Health Perspect*. – 2014. – Vol.122, №12. – P.1271-1278. – doi: 10.1289/ehp.1408418.

302.Shi, L. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences / L. Shi, B.P.Tu. – Text: visual // *Curr Opin Cell Biol*. – 2015. – Vol. 33. – P.125–131. – doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.003.

303. Shiva, S. Mitochondria and Nitric Oxide / S. Shiva, L. Castro, P.S. Brookes. – Text: visual // Nitric Oxide / eds.: L.J. Ignarro, B. A. Freeman. – Third Edition. – Academic Press, 2017. – Chapter 11. – P.137–156. – doi: 10.1242/jcs.03062
304. Sies, H. Oxidative Stress / H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones. – Text: visual // Annu Rev Biochem. – 2017. – Vol.86. – P.715-748. – doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
305. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress / H. Sies. – Text: visual // Redox Biol. – 2017. – Vol.11. – P.613–619. – doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035
306. Sies, H. Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis / H. Sies. – Text: visual // Redox Biol. – 2021. – Vol.41. – P.101867. – doi: 10.1016/j.redox.2021.101867.
307. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D.P. Jones. – Text: visual // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2020. – Vol.21. – P.363–383. – doi: 10.1038/s41580-020-0230-3
308. Significance of L-carnitine for human health / M.M. Adeva-Andany, I. Calvo-Castro, C. Fernández-Fernández [et al.]. – Text: visual // IUBMB Life. – 2017. – Vol.69. – P.578–594. – doi: 10.1002/iub.1646.
309. Single dose administration of L-carnitine improves antioxidant activities in healthy subjects / Y. Cao, H.J. Qu, P. Li [et al.]. – Text: visual // Tohoku J Exp Med. – 2011. – Vol. 224, №3. – P.209-213. – doi: 10.1620/tjem.224.209.
310. Site-directed mutagenesis and chemical modification of the six native cysteine residues of the rat mitochondrial carnitine carrier: implications for the role of cysteine-136 / C. Indiveri, N. Giangregorio, V. Iacobazzi [et al.]. – Text: visual // Biochemistry. – 2002. – Vol.41. – P.8649-8656. – doi: 10.1021/bi012183n.
311. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates / C.L. Quinlan, I.V. Perevoshchikova, M. Hey-Mogensen [et al.]. – Text: visual // Redox Biol. – 2013. – Vol.1, №1. – P.304-312. – doi: 10.1016/j.redox.2013.04.005

312.Sizova, Z.M. Significance of L-carnitine in internal medicine / Z.M. Sizova, E.V. Shikh, A.A. Makhova. – Text: visual // Ter Arkh. – 2019. – Vol.91, №1. – P.114-128. – doi: 10.26442/00403660.2019.01.000040.

313.Sloan, J.L. Cloning and functional expression of a human Na (+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(0+) / J.L. Sloan, S. Mager. – Text: visual // J Biol Chem. – 1999. – Vol.274. – P.23740-23745. – doi: 10.1074/jbc.274.34.23740.

314.S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling / V. Fernando, X. Zheng, Y. Walia [et al.]. – Text: visual // Antioxidants (Basel). – 2019. – Vol.8, №9. – P.404. – doi: 10.3390/antiox8090404.

315.Species and tissue specific relationships between mitochondrial permeabilitytransition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice / A. Panov, S. Dikalov, N. Shalbuyeva [et al.]. – Text: visual // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2007. – Vol.292, №2. – P.708-718.

316.Sperm protein carbonylation / S.A. Lone, T.K. Mohanty, R.K. Baithalu [et al.]. – Text: visual // Andrologia. – 2019. – Vol.51, №4. – P. e13233. – doi: 10.1111/and.13233.

317.Steed, M.M. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia / M.M. Steed, S.C. Tyagi. – Text: visual // Antioxidants and redox signaling. – 2011. – Vol. 15, №7. – P. 1927-1943. – doi: 10.1089/ars.2010.3721.

318.Structure-functional implications of longevity protein p66Shc in health and disease / H.A. Mir, R. Ali, U. Mushtaq [et al.]. – Text: visual // Ageing Res Rev. – 2020. – Vol. 63. – P. 101139. – doi: 10.1016/j.arr.2020.101139.

319.Suomalainen, A. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology / A. Suomalainen, B.J. Battersby. – Text: visual // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2018. – Vol.19, №2. – P.77-92. – doi: 10.1038/nrm.2017.66.

320.Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling / Y. Wang, R. Branicky, A. Noë [et al.]. – Text: visual // J Cell Biol. – 2018. – Vol.217, №6. – P.1915-1928. – doi: 10.1083/jcb.201708007.

321.Surai, P. F. Antioxidant Action of Carnitine: Molecular Mechanisms and Practical Applications / P. F. Surai. – Text: visual // EC Veterinary Science. – 2015. – Vol.2, №1. – P.66-84.

322.Surai, P.F. Antioxidant Defence Systems and Oxidative Stress in Poultry Biology: An Update / P.F. Surai, I.I. Kochish, V.I. Fisinin. – Text: visual // Antioxidants (Basel). – 2019. – Vol.8, №7. – P.235. – doi: 10.3390/antiox8070235.

323.Szlas, A. The Potential of L-Arginine in Prevention and Treatment of Disturbed Carbohydrate and Lipid Metabolism-A Review / A. Szlas, J.M. Kurek, Z. Krejpcio. – Text: visual // Nutrients. – 2022. – Vol.14, №5. – P.961.– doi: 10.3390/nu14050961.

324. Tain, Y.L. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA) / Y.L. Tain, C.N. Hsu. – Text: visual // Toxins (Basel). – 2017. – Vol.9, №3. – P.92. – doi: 10.3390/toxins9030092.

325.Tamai, I. Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine / organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21) / I. Tamai. – Text: visual // Biopharm Drug Dispos. – 2013. – Vol.34, №1. – P.29-44. – doi: 10.1002/bdd.1816.

326.Targetable Pathways for Alleviating Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration of Metabolic and Non-Metabolic Diseases / L.E. Millichap, E. Damiani, L.Tiano [et al.]. – Text: visual // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol.22, №21. – P.11444. – doi: 10.3390/ijms222111444.

327.TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions / I. Martínez-Reyes, L.P. Diebold, H. Kong [et al.]. – Text: visual // Mol Cell. – 2016. – Vol.61, №2. – P.199-209. – doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.002.

328.Tejero, J. Sources of vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and their regulation / J. Tejero, S. Shiva, M.T. Gladwin. – Text: visual // Physiol Rev. – 2019. – Vol. 99. – P. 311–379. – doi:10.1152/physrev.00036.2017.

329. Tenopoulou, M. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism / M. Tenopoulou, P.T. Doulias. – Text: visual // *F1000Res* (F1000 Faculty Rev). – 2020. – Vol.9. – P.1190. – doi: 10.12688/f1000research.19998.1.
330. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase / B.J. Michell, J.E. Griffiths, K.I. Mitchelhill [et al.]. – Text: visual // *Curr Biol*. – 1999. – Vol. 9. – P.845 – 848. – doi: 10.1016/s0960-9822(99)80371-6.
331. The alpha-amino group of L-arginine mediates its antioxidant effect / S. Wallner, A. Hermetter, B. Mayer [et al.]. – Text: visual // *Eur J Clin Invest*. – 2001. – Vol.31, №2. – P. 98-102. – doi: 10.1046/j.1365-2362.2001.00771.x.
332. The antioxidant properties of carnitine in vitro / K. Solarska, A. Lewińska, R. Karowicz-Bilińska [et al.]. – Text: visual // *ACell Mol Biol Lett*. – 2010. – Vol.15, №1. – P.90-97. – doi: 10.2478/s11658-009-0036-y.
333. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders / S.M.Houten, S. Violante, F.V. Ventura [et al.]. – Text: visual // *Annu. Rev. Physiol*. – 2016. – Vol.78. – P.23-44. – doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105045.
334. The carnitine system and cancer metabolic plasticity / M.A.B. Melone, A. Valentino, S. Margarucci [et al.]. – Text: visual // *Cell Death Dis*. – 2018. – Vol.9, №2. – P.228.– doi: 10.1038/s41419-018-0313-7.
335. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling / D.D. Thomas, L.A. Ridnour, J.S. Isenberg [et al.]. – Text: visual // *Free Radic Biol Med*. – 2008. – Vol.45, №1.–P.8-31.– doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020.
336. The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art / R. Esse, M. Barroso, I. Tavares de Almeida [et al.]. – Text: visual // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol.20, №4. – P.867. – doi: 10.3390/ijms20040867.
337. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling / C. Choudhary, B.T. Weinert, Y. Nishida [et al.]. – Text: visual // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2014. – Vol. 15. – P.536–550. – doi: 10.1038/nrm3841.

338.The Mitochondrial Carnitine Acyl-carnitine Carrier (SLC25A20): Molecular Mechanisms of Transport, Role in Redox Sensing and Interaction with Drugs / A. Tonazzi, N. Giangregorio, L. Console [et al.]. – Text: visual // *Biomolecules*. – 2021. – Vol.11, №4. – P.521. – doi:10.3390/biom11040521.

339.The renoprotective effect of l-carnitine in hypertensive rats is mediated by modulation of oxidative stress-related gene expression / S. Zambrano, A. J. Blanca, M. Ruiz-Armenta [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Nutrition*. – 2012. – Vol.52, №6. – P.1649–1659. – doi:10.1007/s00394-012-0.

340.The role of carnitine in the male reproductive system / C.M. Ng, M.R. Blackman, C.Wang [et al.]. – Text: visual // *Ann N Y Acad Sci*. – 2004. – Vol.1033. – P.177-188. – doi: 10.1196/annals.1320.017.

341.Therapeutic modification of the l-arginine – eNOS pathway in cardiovascular diseases / G. Goumas, C. Tentolouris, D. Tousoulis [et al.]. – Text: visual // *Atherosclerosis*. – 2001. – Vol.154.– P.255 – 267.

342.Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials / A.W. El-Hattab, A.M. Zarante, M. Almannai [et al.]. – Text: visual // *Mol Genet Metab*. – 2017. – Vol.122, №3. – P.1-9. – doi: 10.1016/j.ymgme.2017.09.009.

343.Tonelli, C. Transcriptional Regulation by Nrf2 / C. Tonelli, I.I.C. Chio, D.A. Tuveson. – Text: visual // *Antioxid Redox Signal*. – 2018. – Vol.29, №17. – P.1727-1745. – doi: 10.1089/ars.2017.7342.

344.Tonks, N.K. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling / N.K.Tonks. – Text: visual // *Cell*. – 2005.– Vol.121. – P.667–670.

345.Transport of asymmetric dimethylarginine (ADMA) by cationic amino acid transporter 2 (CAT2), organic cation transporter 2 (OCT2) and multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1) / J. Strobel, F. Muller, O. Zolk [et al.]. – Text: visual // *Amino Acids*. – 2013. – Vol.45. – P.989–1002. – doi: 10.1007/s00726-013-1556-3.

346.Transport of L-Arginine Related Cardiovascular Risk Markers / S. Banjarnahor, R.N. Rodionov, J. König [et al.]. – Text: visual // *J Clin Med*. – 2020. – Vol.9, №12. – P.3975. – doi: 10.3390/jcm9123975.

347. Treberg, J.R. Evidence for Two Sites of Superoxide Production by Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) / J.R. Treberg, C.L. Quinlan, M.D. Brand. – Text: visual // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol.286. – P. 27103–27110. – doi: 10.1074/jbc.M111.252502.

348. Tretter, L. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by α -ketoglutarate dehydrogenase / L. Tretter, V. Adam-Vizi. – Text: visual // *J. Neurosci.* – 2004 – Vol. 24. – P. 7771–7778. – doi: 10.1523/JNEUROSCI.1842-04.2004.

349. Utilization of dietary precursors for carnitine synthesis in human adults / C.J. Rebouche, E.P. Bosch, C.A. Chenard [et al.]. – Text: visual // *J. Nutr.* – 1989. – Vol.119. – P.1907–1913. – doi: 10.1093/jn/119.12.1907.

350. Valera-Alberni, M. Mitochondrial stress management: A dynamic journey / M. Valera-Alberni, C. Canto. – Text: visual // *Cell Stress.* – 2018. – Vol.2. – P.253–274. – doi: 10.15698/cst2018.10.158.

351. Vaz, F.M. Carnitine biosynthesis in mammals / F.M. Vaz, R.J.A. Wanders. – Text: visual // *Biochem J.* – 2002. – Vol.361. – P.417–429. – doi: 10.1042/0264-6021:3610417.

352. Virmani, M.A. The Role of L-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation / M.A. Virmani, M. Cirulli. – Text: visual // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, №5. – P.2717. – doi: 10.3390/ijms23052717.

353. Vitagenes, cellular stress response, and acetylcarnitine: relevance to hormesis / V. Calabrese, C. Cornelius, A.T. Dinkova - Kostova [et al.]. – Text: visual // *BioFactors.* – 2009. – Vol.35. – P.146–160. – doi: 10.1002/biof.22.

354. Walker, B.R. Nuclear-Mitochondrial Interactions / B.R. Walker, C.T. Moraes. – Text: visual // *Biomolecules.* – 2022. – Vol.12, №3. – P.427. – doi: 10.3390/biom12030427. PMID: 35327619; PMCID: PMC8946195.

355. Wallace, D.C. Mitochondrial genetic medicine / D.C. Wallace. – Text: visual // *Nat Genet.* – 2018. – Vol.50, №12. – P.1642-1649. – doi: 10.1038/s41588-018-0264-z.

356. Wan, L. Determination of free and total carnitine with a random-access chemistry analyzer / L. Wan, R.W. Hubbard. – Text: visual // *Clin Chem.* – 1998. – Vol.44, №4. – P.810-816.

357.Wang, Z.Y. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation / Z.Y. Wang, R. Hakanson. – Text: visual // *British Journal of Pharmacology*. – 1995. – Vol. 116. – P. 244–245. – doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15094.x.

358.West, A.P. Mitochondrial dysfunction as a trigger of innate immune responses and inflammation / A.P. West. – Text: visual // *Toxicology*. – 2017. – Vol. 391. – P.54-63. – doi: 10.1016/j.tox.2017.07.016.

359.Where does N (ϵ)-trimethyllysine for the carnitine biosynthesis in mammals come from? / L. Servillo, A. Giovane, D. Cautela [et al.]. – Text: visual // *PLoS One*. – 2014. – Vol.9, №1. – P.84589. – doi: 10.1371/journal.pone.0084589.

360.Woo, D.K. Mitochondrial stress signals revise an old aging theory / D.K. Woo, G.S. Shadel. – Text: visual // *Cell*. – 2011. – Vol.144, №1. – P.11-12.– doi: 10.1016/j.cell.2010.12.023.

361.Yang, J. Autophagy and Energy Metabolism / J. Yang, R. Zhou, Z. Ma. – Text: visual // *Adv Exp Med Biol*. – 2019. –Vol.1206. – P.329-357. – doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_16.

362.Zaobornyj, T. Heart mitochondrial nitric oxide synthase: a strategic enzyme in the regulation of cellular bioenergetics / T. Zaobornyj, L.B.Valdez. – Text: visual // *Vitam Horm*. – 2014. – Vol.96. – P.29-58. – doi: 10.1016/B978-0-12-800254-4.00003-9.

363.Zvyagina, V.I. Comparative assessment of the functional activity of rat epididymal mitochondria in oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia and L-NAME administration / V.I. Zvyagina, E.S. Belskikh. – Text: visual // *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*. – 2022. – Vol. 58, № 2. – P.126–140.– doi: 10.1134/S0022093022020065.

364.Zweier, J.L. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems / J.L. Zweier, A. Samouilov, P. Kuppusamy. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta*. – 1999. – Vol.1411. – P.250 – 262.