

DOI 10.18699/vjgb-24-34

Метаболомный профиль мочи крыс с артериальной гипертонией разного генеза


А.А. Сорокоумова , А.А. Серяпина , Ю.К. Политыко ^{1,3}, Л.В. Яньшолэ ², Ю.П. Центалович ,
М.А. Гилинский ³, А.Л. Маркель ^{1,4}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 evanesalisa@yandex.ru; seryapina@bionet.nsc.ru

Аннотация. Многообразие патогенетических механизмов, лежащих в основе артериальной гипертонии, приводит к необходимости разработки персонализированного подхода к диагностике и терапии заболевания. Одним из перспективных методов для персонализированной медицины является метаболомика, которая позволяет получить комплексное представление о физиологических процессах, происходящих в организме. Метаболом – это совокупность низкомолекулярных веществ, определяемых в образце и являющихся промежуточными и конечными продуктами метаболизма клеток. Изменения в содержании и соотношении метаболитов в исследуемом образце маркируют соответствующие патогенетические механизмы, выделяя их, что особенно важно для такого мультифакторного заболевания, как артериальная гипертония. Для идентификации метаболомных маркеров гипертензивных состояний разного генеза были исследованы три разные формы артериальной гипертонии (АГ): крысы с наследственной АГ (линия крыс НИСАГ/ISIAH); крысы с АГ, индуцированной введением L-NAME (модель эндотелиальной дисфункции с нарушением продукции NO); крысы с АГ, вызванной введением дезоксикортикостерона в сочетании с солевой нагрузкой (гормон-зависимая форма – DOCA-солевая АГ). В качестве нормотензивного контроля были использованы крысы линии WAG. У всех животных собрали образцы суточной мочи, метаболомный профиль которой проанализировали методом количественной ЯМР-спектроскопии. Затем с помощью методов многомерной статистики выявили потенциальные метаболомные маркеры исследуемых форм гипертензивных состояний. Анализ полученных данных показал, что для наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертонии у крыс линии НИСАГ характерно снижение содержания следующих метаболитов в моче: никотинамида и 1-метилникотинамида (маркеры воспалительных процессов), N-ацетилглутамата (цикл оксида азота), изобутирата и метилацетоацетата (микробиота кишечника). Фармакологически индуцированные формы АГ (группы L-NAME и DOCA+NaCl) не имеют общих с наследственной АГ метаболомных маркеров. Их отличают один общий маркер, N,N-диметилглицин, и два специфических – холин (для группы L-NAME) и 1-метилникотин-амид (для группы крыс с DOCA-солевой артериальной гипертонией).

Ключевые слова: артериальная гипертония; крысы НИСАГ (ISIAH); L-NAME; DOCA-солевая гипертония; метаболомные маркеры мочи.

Для цитирования: Сорокоумова А.А., Серяпина А.А., Политыко Ю.К., Яньшолэ Л.В., Центалович Ю.П., Гилинский М.А., Маркель А.Л. Метаболомный профиль мочи крыс с артериальной гипертонией разного генеза. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(3):299-307. DOI 10.18699/vjgb-24-34

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-20025) совместно с Министерством науки Новосибирской области (соглашение № р-36 от 06.04.2022).

Urine metabolome profile in rats with arterial hypertension of different genesis


A.A. Sorokoumova , A.A. Seryapina , Yu.K. Polityko ^{1,3}, L.V. Yanshole ², Yu.P. Tsentalovich ,
M.A. Gilinsky ³, A.L. Markel ^{1,4}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² International Tomography Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 evanesalisa@yandex.ru; seryapina@bionet.nsc.ru

Abstract. The diversity of pathogenetic mechanisms underlying arterial hypertension leads to the necessity to devise a personalized approach to the diagnosis and treatment of the disease. Metabolomics is one of the promising methods for personalized medicine, as it provides a comprehensive understanding of the physiological processes occurring in

the body. The metabolome is a set of low-molecular substances available for detection in a sample and representing intermediate and final products of cell metabolism. Changes in the content and ratio of metabolites in the sample mark the corresponding pathogenetic mechanisms by highlighting them, which is especially important for such a multifactorial disease as arterial hypertension. To identify metabolomic markers for hypertensive conditions of different origins, three forms of arterial hypertension (AH) were studied: rats with hereditary AH (ISIAH rat strain); rats with AH induced by L-NAME administration (a model of endothelial dysfunction with impaired NO production); rats with AH caused by the administration of deoxycorticosterone in combination with salt loading (hormone-dependent form – DOCA-salt AH). WAG rats were used as normotensive controls. 24-hour urine samples were collected from all animals and analyzed by quantitative NMR spectroscopy for metabolic profiling. Then, potential metabolomic markers for the studied forms of hypertensive conditions were identified using multivariate statistics. Analysis of the data obtained showed that hereditary stress-induced arterial hypertension in ISIAH rats was characterized by a decrease in the following urine metabolites: nicotinamide and 1-methylnicotinamide (markers of inflammatory processes), N-acetylglutamate (nitric oxide cycle), isobutyrate and methyl acetoacetate (gut microbiota). Pharmacologically induced forms of hypertension (the L-NAME and DOCA+NaCl groups) do not share metabolomic markers with hereditary AH. They are differentiated by N,N-dimethylglycine (both groups), choline (the L-NAME group) and 1-methylnicotinamide (the group of rats with DOCA-salt hypertension).

Key words: arterial hypertension; ISIAH rats; L-NAME; DOCA-salt hypertension; urine metabolomic markers.

For citation: Sorokoumova A.A., Seryapina A.A., Polityko Yu.K., Yanshole L.V., Tsentalovich Yu.P., Gilinsky M.A., Markel A.L. Urine metabolic profile in rats with arterial hypertension of different genesis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(3):299-307. DOI 10.18699/vjgb-24-34

Введение

Артериальная гипертония (АГ) – это сложное мультифакторное заболевание, в патогенез которого вовлечены многие системы организма. Разнообразие механизмов развития этого заболевания и их взаимодействия между собой обуславливают необходимость учитывать множество факторов при разработке методов профилактики и лечения. К настоящему времени разработаны и применяются многоступенчатые протоколы лечения АГ, учитывающие образ жизни, стадию заболевания, сопутствующие патологии и т.д. (Carey et al., 2022). Однако все еще актуальны задачи персонализированной медицины: использовать комплексные подходы к диагностике с целью определения характерного для конкретного пациента «набора» задействованных в развитии АГ механизмов и, соответственно, назначить индивидуальное лечение. Для этой цели хорошо подходят так называемые омиксные технологии, анализирующие своего рода «срез» деятельности организма и функционирования его систем (на уровне генома, транскриптома, протеома, метаболома и т.д.).

Для изучения метаболических путей, вовлеченных в патогенез различных гипертензивных состояний, мы использовали три экспериментальные модели АГ. Первая модель: линия крыс НИСАГ/ISIAH (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертония/Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension), которая была получена из аутбредной популяции крыс Wistar путем многолетней селекции на повышение АД в условиях психоэмоционального стресса (Markel, 1992). Эта модель наиболее близко воспроизводит первичную (эссенциальную) гипертонию человека. Вторая модель: АГ, вызванная дисфункцией эндотелия сосудов, индуцированной фармакологически – введением L-NAME (ингибитора синтеза NO) (Biancardi et al., 2007). Эндотелиальная дисфункция, связанная с нарушением синтеза оксида азота, – один из распространенных механизмов повышения АД. Третья модель: АГ, также индуцированная фармакологически введением синтетического минералокортикоида – DOCA (дезоксикортикостерона ацетат) на фоне дополнительной

солевой нагрузки (Basting, Lazartigues, 2017). Сочетание повышенного уровня минералокортикоидов и солевой нагрузки – еще одна из возможных причин развития АГ у людей (Gupta, 2011).

При разработке методов поиска биохимических маркеров разных форм АГ следует обращать внимание на доступность и неинвазивность предлагаемых технологий. Один из наиболее доступных методов – анализ образцов мочи. Метаболомные исследования мочи в настоящее время представляют интерес для исследователей; активно обсуждаются способы анализа и интерпретации данных (Zhang et al., 2012; Bouatra et al., 2013).

Цель нашей работы – оценить метаболомный профиль суточной мочи крыс, моделирующих три разных по механизмам развития формы гипертензивных состояний, в сравнении с нормотензивным контролем.

Методы исследования

Экспериментальные животные. Исследование выполнено на 3–4-месячных самцах крыс линии НИСАГ (ISIAH) с наследственной формой АГ, а также на двух группах крыс с фармакологически индуцированными формами АГ: группа крыс, получавших блокатор синтеза NO – L-NAME, и группа крыс с гормон-зависимой DOCA-солевой АГ. В качестве нормотензивного контроля использованы крысы линии WAG.

Для моделирования NO-дефицитной АГ с эндотелиальной дисфункцией крысам линии WAG перорально вводили раствор ингибитора эндотелиальной NO-синтазы (L-NAME, N ω -nitro-L-arginine methyl ester – N-омега-нитро-L-аргинин метиловый эфир; Sigma Aldrich, США) в дозе 30 мг/кг массы тела в течение двух недель (Fürstenau et al., 2008). Для моделирования гормон-зависимой DOCA-солевой гипертонии крысам WAG подкожно вводили DOCA (deoxycorticosterone acetate – дезоксикортикостерона ацетат; Sigma Aldrich, США) в дозе 25 мг/кг массы тела раз в 4 дня при постоянной солевой нагрузке (1 % раствор NaCl в поилках) в течение трех недель (Chan et al., 2006). В результате были сформированы четыре экс-

периментальные группы животных: три с АГ и одна нормотензивная, по 10 самцов в каждой.

Все животные содержались в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН (температура воздуха 22–24 °С, световой режим дня 12:12 ч), получая полнорационный корм («Чара», Россия) и питьевую воду в свободном доступе. Все процедуры с экспериментальными животными соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Межинститутской комиссии по биологической этике при Институте цитологии и генетики СО РАН (протокол № 127 от 08.09.2022).

Мониторинг АД проводили два раза в неделю в течение всего эксперимента с использованием прибора для неинвазивного измерения АД (БИОРАС, США) методом tail-cuff с предварительной адаптацией животных к данной процедуре в течение трех-четырех дней. Одновременно с измерением АД крыс регулярно взвешивали.

Сбор образцов суточной мочи. Животных помещали по одному в индивидуальные метаболические клетки для грызунов (Techniplast, Италия), где они адаптировались к новым условиям в течение трех дней. В последующие три дня в одно и то же время суток осуществляли сбор образцов мочи и учет объема выпитой воды. Собранную мочу хранили при –70 °С. Дальнейшая работа с полученными образцами проводилась в ЦКП «Масс-спектрометрические исследования» Международного томографического центра СО РАН, в лаборатории протеомики и метаболомики.

Экстракция метаболитов из образцов мочи. Для получения небелкового экстракта метаболитов мочи крыс использовали следующий протокол пробоподготовки: оптимальным соотношением объемов мочи и экстрагирующего раствора является соотношение моча/метанол = 1/4. К 100 мкл мочи добавляли 400 мкл холодного метанола (–20 °С). Образцы перемешивали на вихревой центрифуге и помещали в шейкер на 15 мин при 1300 об/мин, затем центрифугировали при 12000 об/мин при 4 °С в течение 30 мин, после чего отбирали надосадочную жидкость.

Супернатант высушивали на вакуумном испарителе и хранили при –70 °С. Лиофилизированные экстракты разводили в 600 мкл дейтерированного фосфатного буфера (50 мМ, pH 7.4) с добавлением внутреннего стандарта DSS (3-(триметилсилил)пропан-1-сульфонат натрия, 20 мкМ).

Спектры ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре AVANCE III HD 700 MHz (Bruker BioSpin, Германия), оборудованном криомагнитом Ascend с полем 16.44 Тл и зондом TXI 1H-13C/15N/D ZGR 5 мм. Параметры съемки соответствовали описанным ранее (Zelentsova et al., 2020). Для обработки спектров и интегрирования сигналов применялась программа MestReNova v12.0. Метаболиты идентифицировали с использованием базы данных Human Metabolome Database (<https://hmdb.ca/>) и собственных данных о метаболомном составе биологических жидкостей человека и животных (Tsentalovich et al., 2020; Fomenko et al., 2022).

Статистическая обработка данных проводилась в пакете программ Statistica 12 (StatSoft, Inc., 2014) и на веб-платформе MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) с применением многомерного анализа (метод главных компонент) и непараметрических методов (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественные сравнения).

Результаты

Сравнительный анализ физиологических параметров исследуемых животных показал, что группы крыс не имели достоверных различий по массе тела: WAG – 326.1 ± 12.87 г (АД = 135.9 ± 1.21 мм рт. ст.), НИСАГ (ISIAH) – 325.9 ± 6.44 г (АД = 205.9 ± 2.12 мм рт. ст.), L-NAME – 326.9 ± 4.71 г (АД = 192.0 ± 2.96 мм рт. ст.), DOCA – 328.2 ± 6.18 г (АД = 184.2 ± 1.19 мм рт. ст.). Однако такие показатели, как суточное потребление жидкости, суточный диурез и скорость клубочковой фильтрации, были достоверно повышены у крыс группы DOCA по отношению к контролю (рис. 1). Повышенные диурез и потребление жидкости наблюдались также у крыс НИСАГ (ISIAH). Исходя из этих межгрупповых различий, для метаболомного анализа состава суточной мочи полученные методом ЯМР-

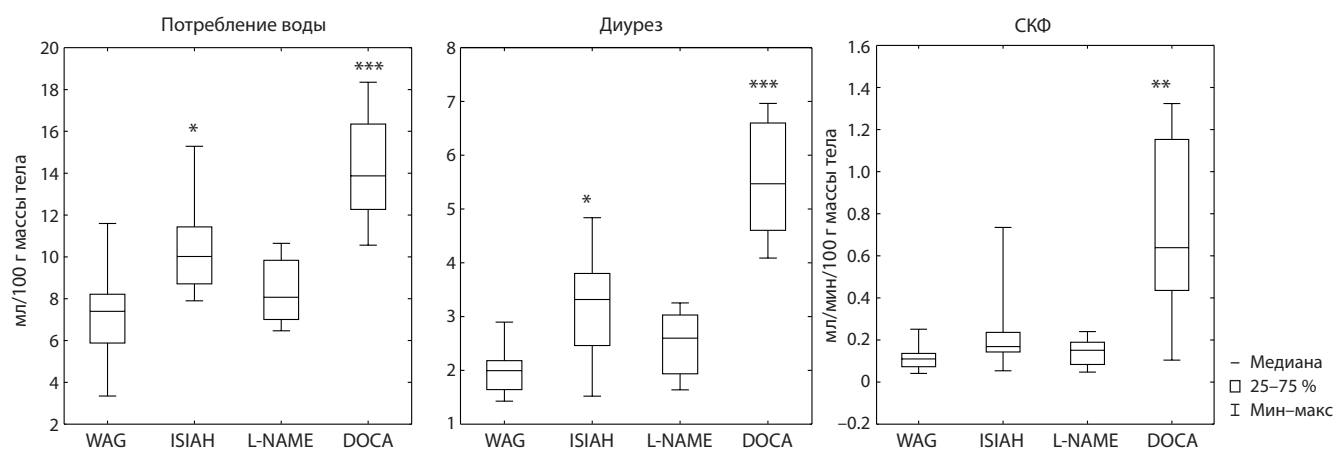


Рис. 1. Межгрупповые различия в суточном потреблении жидкости, суточном уровне диуреза и скорости клубочковой фильтрации (СКФ) у крыс НИСАГ (ISIAH), L-NAME, DOCA по отношению к контрольным крысам WAG.

Критерий Манна–Уитни, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

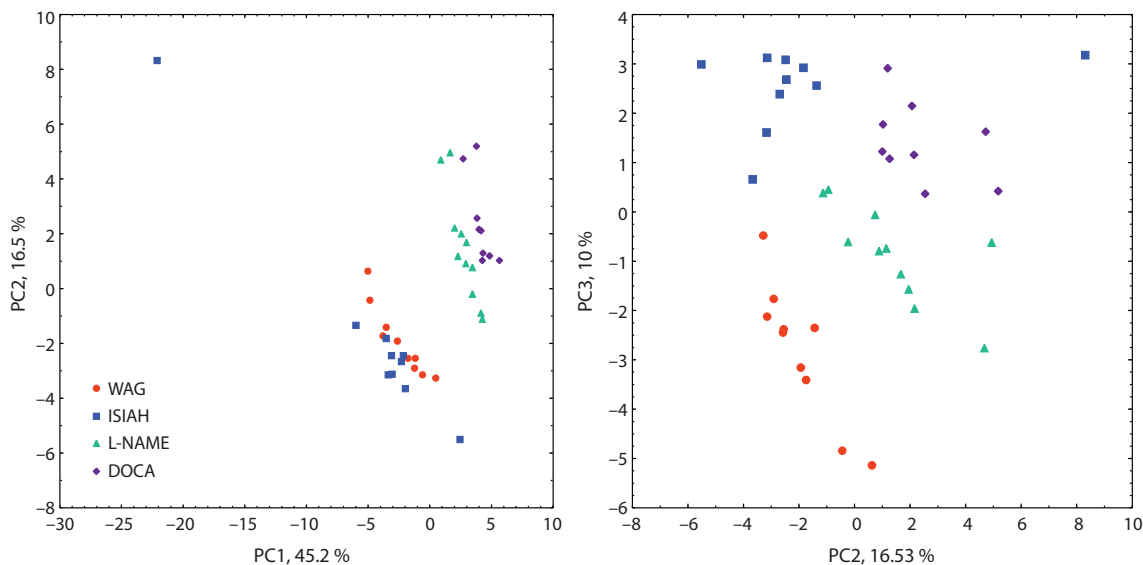


Рис. 2. Распределение групп нормотензивных (WAG) и гипертензивных (ISIAH, L-NAME, DOCA) крыс в координатах осей главных компонент (PC1, PC2, PC3).

спектроскопии концентрации метаболитов (нмоль/мл) были пересчитаны в суточные показатели выделения метаболитов с мочой (нмоль/сут) с учетом уровня диуреза каждой крысы в день сбора анализируемых проб.

Многомерный анализ метаболомных данных методом главных компонент выявил три основных оси (PC1, PC2, PC3), отвечающих соответственно за 45.2, 16.5 и 10.0 % общей вариации содержания исследуемых метаболитов в образцах суточной мочи. Распределение экспериментальных групп в координатах главных компонент приведено на рис. 2. Можно наблюдать четкое разделение групп исследуемых крыс по первой главной компоненте, отвечающей за 45.2 % вариации признаков: в одну группу попали нормотензивные крысы WAG и крысы с наследственной гипертонией линии НИСАГ. Крысы с фармакологическими формами АГ – L-NAME и DOCA – образовали другую группу. Отсюда можно заключить, что «естественная» генетическая АГ резко отличается от двух фармакологически индуцируемых форм АГ и что метаболомные маркеры мочи соответствуют не столько повышенному уровню АД, сколько механизмам развития разных форм артериальной гипертонии.

Относительно небольшая доля изменчивости (16.5 %) метаболомных показателей описывается второй главной компонентой. Проекция исследуемых групп крыс на вторую компоненту не позволяет разделить сравниваемые группы по набору метаболомных маркеров. В то же время учет остаточной изменчивости показателей (10 %) по третьей главной компоненте показал возможность четкого разделения крыс нормотензивной группы (WAG) и крыс с наследственной артериальной гипертонией (НИСАГ). То есть метаболомные маркеры, коррелирующие с третьей главной компонентой, могут служить диагностическими показателями наследственных стресс-зависимых форм артериальной гипертонии.

На рис. 3 приведены нагрузки метаболитов на оси первой и третьей главных компонент. Большинство маркеров

по первой главной компоненте коррелируют с объединенной группой – нормотензивные крысы WAG + гипертензивные крысы НИСАГ, в то время как с фармакологически индуцированными формами АГ коррелируют холин, N,N-диметилглицин, N6-ацетиллизин, 1-метилникотинамид и формиат. Таким образом, метаболомный профиль наследственной АГ (по крайней мере на ранних этапах ее развития) ближе к норме, чем к фармакологически индуцированным моделям АГ. Маркеры, отличающие стресс-зависимую АГ крыс НИСАГ от нормотензивного контроля (крыс WAG), можно условно разделить на положительно и отрицательно коррелирующие с наследственной формой АГ, исходя из расположения их нагрузок относительно оси третьей главной компоненты. К положительно коррелирующим относятся ацетат, цитозин, глицин, лактат; к отрицательно коррелирующим – цитидин, изобутират, 1-метилникотинамид, 2'-дезоксисуридин, урацил, никотинамид, цитрат, метилацетоацетат, N-ацетилглутамат.

Помимо оценки нагрузок метаболитов на оси главных компонент, проведен анализ межгрупповых различий по содержанию метаболитов в суточной моче исследуемых животных (см. таблицу). В результате был сформирован список из 12 метаболитов мочи, уровни которых отличались у животных с разными формами АГ от контроля и которые вносили наибольший вклад в разделение экспериментальных групп в пространстве осей главных компонент.

Для выявления возможных взаимосвязей между метаболитами, которые давали наибольший вклад в наблюдаемые различия между группами, был проведен корреляционный анализ методом Пирсона с частичной клас-теризацией (рис. 4). Наиболее высокие коэффициенты корреляции ($r > 0.7$) наблюдались между холином, N,N-диметилглицином и N6-ацетиллизинном (корреляция была положительной). Эти же три соединения отрицательно коррелировали с метилацетоацетатом ($r < -0.5$). Цитрат и 1-метилникотинамид положительно коррелировали меж-

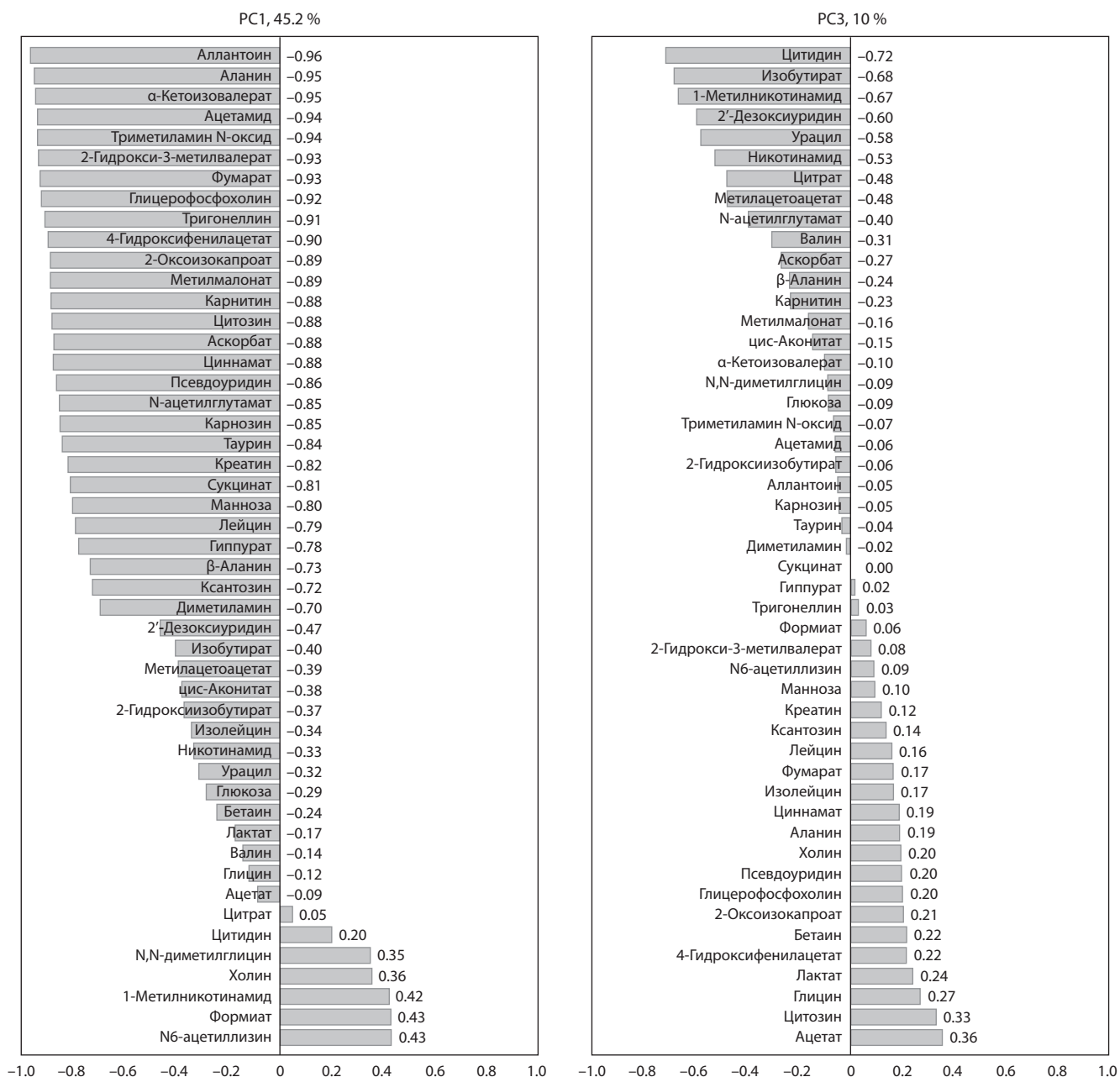


Рис. 3. Нагрузки уровней метаболитов мочи на оси главных компонент (PC1, PC3).

Достоверные отличия от контроля в содержании отдельных метаболитов в моче гипертензивных крыс трех групп (ISIAH, L-NAME, DOCA)

Метаболиты	Группы крыс с АГ			Метаболиты	Группы крыс с АГ		
	ISIAH	L-NAME	DOCA		ISIAH	L-NAME	DOCA
Холин		***		2'-Дезоксиуридин	**		
N,N-диметилглицин		*	*	Урацил	***		
N6-ацетиллизин		***	*	Никотинамид	**		
1-Метилникотинамид	***		***	Цитрат	***		
Цитидин	***			Метилацетоацетат	**		
Изобутират	***			N-ацетилглутамат	**		

Примечание. Цветом показано повышение (оранжевый цвет) или понижение (синий) уровней метаболитов по отношению к контрольным крысам WAG. Критерий Манна-Уитни, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

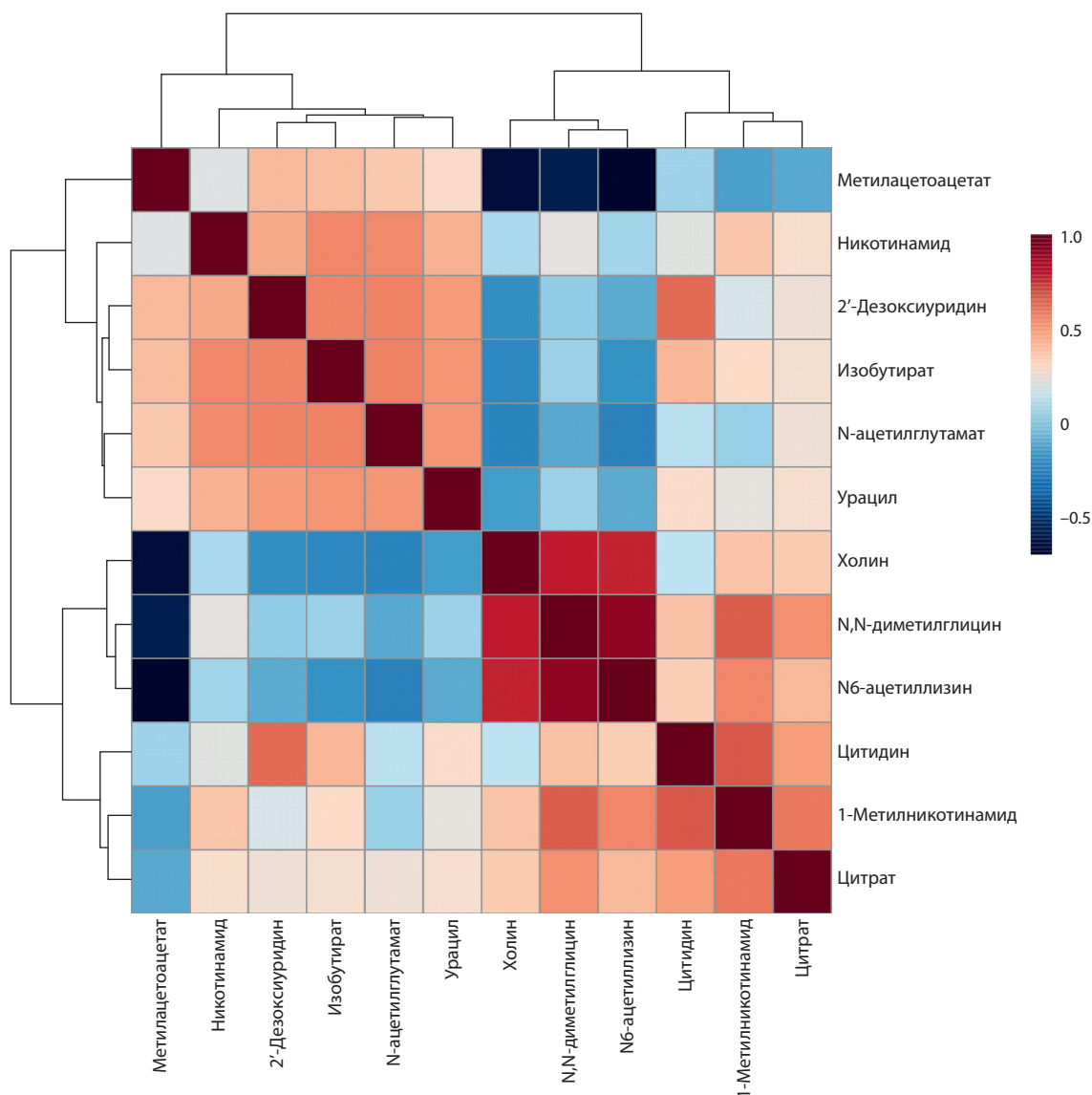


Рис. 4. Коэффициенты корреляций Пирсона между исследуемыми параметрами (уровни метаболитов в моче).

ду собой и с N,N-диметилглицином, N6-ацетиллизин и цитидином ($r > 0.5$). Никотинамид, 2'-дезоксисуридин, изобутират, N-ацетилглутамат и урацил также положительно коррелировали между собой ($r > 0.5$). Кроме того, 2'-дезоксисуридин положительно коррелировал с цитидином с коэффициентом корреляции $r = 0.64$.

Таким образом, отмечено наличие определенных ассоциаций между метаболитами мочи, которые могут служить маркерами трех различных по своему генезу гипертензивных состояний.

Обсуждение

Метаболизм холина и гомоцистеина

Холин принимает участие в метаболизме липидов, образовании клеточных мембран, синтезе нейромедиатора ацетилхолина (Zeisel, 2000). Под действием ферментов холиноксидазы и бетаин-альдегиддегидрогеназы холин окисляется до бетаина. Бетаин, в свою очередь, является

донором метильной группы для фермента бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы – участвует в реметилировании гомоцистеина до метионина с образованием N,N-диметилглицина (альтернативный путь утилизации гомоцистеина в фолатном цикле). В норме гомоцистеин не должен накапливаться в организме, при повышении его содержания в крови возрастает риск нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний (Wald et al., 2002). Увеличение концентрации гомоцистеина в крови способствовало повреждению эндотелия стенок сосудов, активации агрегации тромбоцитов, образованию атеросклеротических бляшек (Paré et al., 2009; Ganguly, Alam, 2015). Повышенный уровень N,N-диметилглицина в крови коррелирует с повышенным гомоцистеином у пациентов с хронической почечной недостаточностью (McGregor et al., 2001). Поскольку введение L-NAME ингибирует синтез оксида азота и приводит к эндотелиальной дисфункции, одновременное повышение уровней холина и N,N-диметилглицина в моче крыс данной группы пред-

ставляет интерес для дальнейших исследований. В литературе отмечается, что эффекты введения экзогенного гомоцистеина и L-NAME могут быть разнонаправленными: гомоцистеин усиливает экспрессию NO-синтазы, тогда как L-NAME ингибирует этот процесс (Celotto et al., 2010). В то же время введение L-NAME нормализовало уровни гомоцистеина и его метаболитов в плазме крови крыс с холестазом, индуцированным перевязкой желчного протока (Ebrahimkhani et al., 2005).

N6-ацетиллизин повышен в моче у крыс групп L-NAME и DOCA. На данный момент биологическая роль этого соединения не изучена, однако есть сведения о его ассоциации с развитием осложнений диабета 1-го и 2-го типа (Niewczas et al., 2017; Xu et al., 2023). Тем не менее отсутствие описания каких-либо патогенетических механизмов не позволяет рассматривать N6-ацетиллизин в качестве потенциального биомаркера АГ. N6-ацетиллизин имел высокие коэффициенты корреляции с холином и N,N-диметилглицином, для которых выше была описана связь с гомоцистеином и регуляцией NO-синтаз. Возможно, в дальнейшем роль этих соединений в развитии АГ, вызванной эндотелиальной дисфункцией, будет уточнена.

Метаболизм никотинамида

Никотинамид превращается в 1-метилникотинамид под действием печеночного фермента никотинамид-N-метилтрансферазы. Никотинамид-N-метилтрансфераза также способствует реметилированию гомоцистеина в S-аденозилметионин (один из путей утилизации гомоцистеина) (Hong et al., 2018), положительно коррелирует с ожирением и инсулинорезистентностью (Kannt et al., 2015), предположительно регулирует экспрессию фруктозо-1,6-бисфосфатазы, участвующей в процессе глюконеогенеза (Visinoni et al., 2008). Было показано, что никотинамид предотвращает высвобождение цитохрома C и индукцию каспаз, таким образом поддерживая потенциал митохондриальной мембраны и оказывая цитопротекторное действие на эндотелий мелких мозговых сосудов (Chong et al., 2002).

Также имеются свидетельства того, что никотинамид может проявлять противовоспалительную активность, ингибируя экспрессию тромбопластина и CD11b антигена (Ungerstedt et al., 2003). Внутривенное введение 1-метилникотинамида оказывало антитромботический эффект, активируя простаглицлиновый и циклооксигеназный пути развития воспаления (Chlopicki et al., 2007). Уровни никотинамида и 1-метилникотинамида были снижены в моче крыс НИСАГ, тогда как в моче крыс с DOCA-солевой гипертензией наблюдалось повышенное содержание 1-метилникотинамида, что может указывать на роль воспаления в развитии как наследственной, так и фармакологически индуцированной артериальной гипертензии.

Пиримидиновый метаболизм

Серьезные нарушения пиримидинового метаболизма, как правило, связаны с дисфункцией ферментов – чаще всего дигидропиримидин-дегидрогеназы или дигидропиримидиназы, проявляются в раннем детском возрасте, имеют системный характер, выражаются в умственной отсталости и судорогах (Nyhan, 2005). У крыс НИСАГ такие

симптомы отсутствуют, однако наблюдается снижение содержания в моче цитидина, 2'-дезоксипуридина и урацила по сравнению с нормотензивным контролем. Интерпретация этих данных затруднена в силу наличия лишь отдельных разрозненных исследований. Так, у пациентов с хронической почечной недостаточностью были обнаружены пониженные уровни почечной экскреции 1-метиладенозина, 1-метилгуанозина, N2,N2-диметилгуанозина и N4-ацетилцитидина (Niwa et al., 1998). Кроме того, есть доказательства, что из цитидина и холина может синтезироваться так называемый цитиколин (цитидин-5'-дифосфохолин), который затем способен оказывать холиноподобный эффект на мембранный метаболизм и холинергическую передачу сигнала (Yilmaz et al., 2008). Однако этих результатов недостаточно для того, чтобы определить продукты пиримидинового метаболизма в моче как маркеры гипертензивного состояния.

Цикл мочевины и оксида азота

N-ацетилглутамат является одним из важных участников цикла мочевины, он синтезируется в митохондриях из ацетилКоА и глутамата с помощью фермента N-ацетилглутаматсинтазы. Недостаток самого N-ацетилглутамата или N-ацетилглутаматсинтазы вызывает нарушения цикла мочевины и гипераммониемию – накопление свободных ионов аммония в крови (Tuchman et al., 2008). У крыс НИСАГ ранее наблюдалось повышение концентрации орнитина в сыворотке крови (Серяпина и др., 2023), что в сочетании с пониженным содержанием N-ацетилглутамата в моче позволяет предположить значительную роль нарушений в синтезе оксида азота в формировании гипертензивного статуса крыс НИСАГ.

Цикл трикарбоновых кислот

Цитрат участвует в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). Снижение его концентрации в моче коррелировало с развитием гипертензии в исследовании с участием добровольцев (Chachaj et al., 2020), правда, помимо цитрата, изменены были уровни других метаболитов-участников цикла Кребса: понижено содержание фумарата, трансаконитата, повышено – метилмалоната. В данной работе у крыс НИСАГ снижено содержание лишь одного цитрата, поэтому представляется некорректным говорить о серьезном нарушении ЦТК. Цитрат известен также тем, что предотвращает кристаллизацию солей кальция и образование мочевых камней. Соответственно, дефицит цитрата в моче может быть связан с нарушением почечного механизма выведения кальция. Кроме того, авторы некоторых работ связывают низкий уровень экскреции цитрата с повышенной инсулинорезистентностью (Cupisti et al., 2007). Однако в рамках нашего исследования трудно определить механизм снижения содержания цитрата, поэтому предлагать его в качестве маркера наследственной стресс-зависимой гипертензии представляется нецелесообразным.

Метаболизм короткоцепочечных жирных кислот

Изобутират и метилацетоацетат – производные так называемых короткоцепочечных жирных кислот, которые в основном продуцируются микробиотой кишечника. Снижение их продукции приводит к воспалению и дис-

функции кишечника, почечной недостаточности, что, в свою очередь, способствует повышению артериального давления (Kim et al., 2018; Felizardo et al., 2019). Показано, что короткоцепочечные жирные кислоты могут связываться с различными рецепторами, сопряженными с G-белками. Эти рецепторы расположены во многих тканях и по-разному взаимодействуют со своими лигандами (Chen et al., 2020). Среди эффектов короткоцепочечных жирных кислот – модуляция синтеза цитокинов, регуляция дифференциации и активации макрофагов, нейтрофилов и Т-лимфоцитов, снижение продукции TNF- α и IL-12 (Corrêa-Oliveira et al., 2016). В моче крыс НИСАГ наблюдается сниженное содержание изобутирата и метилацетоацетата. По всей видимости, их гипертензивный статус близок по свойствам микробиоты кишечника к крысам линии SHR со спонтанной гипертензией, у которых было обнаружено пониженное количество бактерий, продуцирующих ацетат и бутират (Yang et al., 2015).

Заключение

Таким образом, у крыс НИСАГ с наследственной стресс-зависимой АГ, исходя из результатов анализа метаболомного профиля мочи, можно предположить нарушения в цикле оксида азота (снижение уровня N-ацетилглутамата), изменения в функции микробиоты кишечника (снижение содержания изобутирата и метилацетоацетата), участие воспалительных процессов в формировании гипертензивного статуса (пониженные никотинамид и 1-метилникотинамид). Полученные данные дополняют наше предыдущее исследование (Серяпина и др., 2023): при сравнении метаболомных профилей сыворотки крови крыс НИСАГ и WAG также были отмечены изменения в цикле оксида азота (повышенное содержание орнитина в крови крыс НИСАГ), содержании короткоцепочечных жирных кислот (повышенный уровень изобутирата и пониженный – 2-гидроксиизобутирата), наблюдалось снижение концентраций бетаина и триптофана, обладающих противовоспалительными свойствами. Следовательно, снижение содержания в моче N-ацетилглутамата, изобутирата, метилацетоацетата, никотинамида и 1-метилникотинамида в сочетании с вышеописанными изменениями в метаболомном составе сыворотки крови можно рассматривать как набор потенциальных маркеров наследственной стресс-зависимой гипертензии крыс линии НИСАГ.

Фармакологически индуцированные формы АГ (группы L-NAME и DOCA + NaCl) идентифицируются другими метаболомными маркерами (повышенное содержание в моче холина, N,N-диметилглицина, 1-метилникотинамида) и в координатах двух первых главных компонент занимают позицию, которая фактически не перекрывается с группами контрольных крыс и крыс НИСАГ с наследственной АГ. Это происходит несмотря на то, что между крысами НИСАГ и группой крыс, получавших L-NAME, предполагается общее метаболическое звено, связанное с нарушением эндотелиальной функции и, возможно, синтеза NO. Полученные результаты свидетельствуют о более глубоких метаболомных различиях между «естественно» развивающейся наследственно обусловленной формой АГ и двумя другими, вызванными внешними фармакологическими воздействиями, что, собственно, и позволило

выявить комплекс специфических метаболомных маркеров наследственной АГ, которые дают возможность дифференцировать ее от фактически «вторичных», или симптоматических, форм гипертензивной болезни.

Список литературы / References

- Серяпина А.А., Малявко А.А., Политыко Ю.К., Яньшолё Л.В., Центалович Ю.П., Маркель А.Л. Метаболомный профиль сыворотки крови при экспериментальной артериальной гипертензии. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):530-538. DOI 10.18699/vjgb-23-64
- [Seryapina A.A., Malyavko A.A., Polityko Y.K., Yanshole L.V., Tsentlovich Y.P., Markel A.L. Metabolic profile of blood serum in experimental arterial hypertension. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5): 530-538. DOI 10.18699/vjgb-23-64]
- Basting T., Lazartigues E. DOCA-salt hypertension: an update. *Curr. Hypertens. Rep.* 2017;19(4):32. DOI 10.1007/s11906-017-0731-4
- Biancardi V.C., Bergamaschi C.T., Lopes O.U., Campos R.R. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007;40(3):401-408. DOI 10.1590/S0100-879X2006005000077
- Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A.C., Wilson M.R., Knox C., Bjorndahl T.C., Krishnamurthy R., Saleem F., Liu P., Dame Z.T., Poelzer J., Huynh J., Yallou F.S., Psychogios N., Dong E., Bogumil R., Roehring C., Wishart D.S. The human urine metabolome. *PLoS One*. 2013;8(9):e73076. DOI 10.1371/journal.pone.0073076
- Carey R.M., Moran A.E., Whelton P.K. Treatment of hypertension: a review. *JAMA*. 2022;328(18):1849-1861. DOI 10.1001/jama.2022.19590
- Celotto A.C., Fukada S.Y., Laurindo F.R.M., Haddad R., Eberlin M.N., de Oliveira A.M. Chronic hyperhomocysteinemia impairs vascular function in ovariectomized rat carotid arteries. *Amino Acids*. 2010; 38(5):1515-1522. DOI 10.1007/s00726-009-0368-y
- Chachaj A., Matkowski R., Gröbner G., Szuba A., Dudka I. Metabolomics of interstitial fluid, plasma and urine in patients with arterial hypertension: new insights into the underlying mechanisms. *Diagnostics*. 2020;10(11):936. DOI 10.3390/diagnostics10110936
- Chan V., Hoey A., Brown L. Improved cardiovascular function with aminoguanidine in DOCA-salt hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 2006;148(7):902-908. DOI 10.1038/sj.bjp.0706801
- Chen X.F., Chen X., Tang X. Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases. *Clin. Sci. (Lond.)*. 2020;134(6):657-676. DOI 10.1042/CS20200128
- Chlopicki S., Swies J., Mogielnicki A., Buczek W., Bartus M., Lomnicka M., Adamus J., Gebicki J. 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. *Br. J. Pharmacol.* 2007;152(2):230-239. DOI 10.1038/sj.bjp.0707383
- Chong Z.Z., Lin S.H., Maiese K. Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J. Vasc. Res.* 2002;39(2):131-147. DOI 10.1159/000057762
- Corrêa-Oliveira R., Fachi J.L., Vieira A., Sato F.T., Vinolo M.A.R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin. Transl. Immunol.* 2016;5(4):e73. DOI 10.1038/cti.2016.17
- Cupisti A., Meola M., D'Alessandro C., Bernabini G., Pasquali E., Carpi A., Barsotti G. Insulin resistance and low urinary citrate excretion in calcium stone formers. *Biomed. Pharmacother.* 2007;61(1): 86-90. DOI 10.1016/j.biopha.2006.09.012
- Ebrahimkhani M.R., Sadeghipour H., Dehghani M., Kiani S., Payabvash S., Riazi K., Honar H., Pasalar P., Mirazi N., Amanlou M., Farsam H., Dehpour A.R. Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis. *Life Sci.* 2005;76(21):2497-2512. DOI 10.1016/j.lfs.2004.12.009
- Felizardo R.J.F., Watanabe I.K.M., Dardi P., Rossoni L.V., Câmara N.O.S. The interplay among gut microbiota, hypertension and

- kidney diseases: the role of short-chain fatty acids. *Pharmacol. Res.* 2019;141:366-377. DOI 10.1016/j.phrs.2019.01.019
- Fomenko M.V., Yanshole L.V., Tsentlovich Y.P. Stability of metabolomic content during sample preparation: blood and brain tissues. *Metabolites.* 2022;12(9):811. DOI 10.3390/metabo12090811
- Fürstenau C.R., Trentin D. da S., Gossenheimer A.N., Ramos D.B., Casali E.A., Barreto-Chaves M.L.M., Sarkis J.J.F. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol. Dis.* 2008;41(2):223-229. DOI 10.1016/j.bcmd.2008.04.009
- Ganguly P., Alam S.F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr. J.* 2015;14(1):6. DOI 10.1186/1475-2891-14-6
- Gupta V. Mineralocorticoid hypertension. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2011;15(Suppl.4):S298-S312. DOI 10.4103/2230-8210.86972
- Hong S., Zhai B., Pissios P. Nicotinamide N-methyltransferase interacts with enzymes of the methionine cycle and regulates methyl donor metabolism. *Biochemistry.* 2018;57(40):5775-5779. DOI 10.1021/acs.biochem.8b00561
- Kannt A., Pfenninger A., Teichert L., Tönjes A., Dietrich A., Schön M.R., Klötting N., Blüher M. Association of nicotinamide-N-methyltransferase mRNA expression in human adipose tissue and the plasma concentration of its product, 1-methylnicotinamide, with insulin resistance. *Diabetologia.* 2015;58(4):799-808. DOI 10.1007/s00125-014-3490-7
- Kim S., Goel R., Kumar A., Qi Y., Lobaton G., Hosaka K., Mohammed M., Handberg E.M., Richards E.M., Pepine C.J., Raizada M.K. Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. *Clin. Sci.* 2018; 132(6):701-718. DOI 10.1042/CS20180087
- Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In: Sassard J. (Ed.) Genetic Hypertension. London, UK: John Libbey & Company, 1992;218: 405-407
- McGregor D.O., Dellow W.J., Lever M., George P.M., Robson R.A., Chambers S.T. Dimethylglycine accumulates in uremia and predicts elevated plasma homocysteine concentrations. *Kidney Int.* 2001; 59(6):2267-2272. DOI 10.1046/j.1523-1755.2001.00743.x
- Niewczas M.A., Mathew A.V., Croall S., Byun J., Major M., Sabietti V.S., Smiles A., Bonventre J.V., Pennathur S., Krolewski A.S. Circulating modified metabolites and a risk of ESRD in patients with type 1 diabetes and chronic kidney disease. *Diabetes Care.* 2017; 40(3):383-390. DOI 10.2337/dc16-0173
- Niwa T., Takeda N., Yoshizumi H. RNA metabolism in uremic patients: accumulation of modified ribonucleosides in uremic serum: technical note. *Kidney Int.* 1998;53(6):1801-1806. DOI 10.1046/j.1523-1755.1998.00944.x
- Nyhan W.L. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 2005;86(1-2):25-33. DOI 10.1016/j.ymgme.2005.07.027
- Paré G., Chasman D.I., Parker A.N., Zee R.R.Y., Mälärstig A., Seedorf U., Collins R., Watkins H., Hamsten A., Miletich J.P., Ridker P.M. Novel associations of CPS1, MUT, NOX4, and DPEP1 with plasma homocysteine in a healthy population: a genome-wide evaluation of 13974 participants in the Women's Genome Health Study. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2009;2(2):142-150. DOI 10.1161/CIRCGENETICS.108.829804
- Tsentlovich Y.P., Zelentsova E.A., Yanshole L.V., Yanshole V.V., Odud I.M. Most abundant metabolites in tissues of freshwater fish pike-perch (*Sander lucioperca*). *Sci. Rep.* 2020;10(1):17128. DOI 10.1038/s41598-020-73895-3
- Tuchman M., Lee B., Lichter-Konecki U., Summar M.L., Yudkoff M., Cederbaum S.D., Kerr D.S., Diaz G.A., Seashore M.R., Lee H.S., McCarter R.J., Krischer J.P., Batshaw M.L. Cross-sectional multicenter study of patients with urea cycle disorders in the United States. *Mol. Genet. Metab.* 2008;94(4):397-402. DOI 10.1016/j.jymgme.2008.05.004
- Ungerstedt J.S., Heimersson K., Söderström T., Hansson M. Nicotinamide inhibits endotoxin-induced monocyte tissue factor expression. *J. Thromb. Haemost.* 2003;1(12):2554-2560. DOI 10.1046/j.1538-7836.2003.00463.x
- Visinoni S., Fam B.C., Blair A., Rantzaou C., Lamont B.J., Bouwman R., Watt M.J., Proietto J., Favaloro J.M., Andrikopoulos S. Increased glucose production in mice overexpressing human fructose-1,6-bisphosphatase in the liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008; 295(5):E1132-E1141. DOI 10.1152/ajpendo.90552.2008
- Wald D.S., Law M., Morris J.K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Br. Med. J.* 2002;325(7374):1202-1206. DOI 10.1136/bmj.325.7374.1202
- Xu J., Chen Q., Cai M., Han X., Lu H. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry-based metabolomics study of diabetic distal symmetric polyneuropathy. *J. Diabetes Investig.* 2023;14(9):1110-1120. DOI 10.1111/jdi.14041
- Yang T., Santisteban M.M., Rodriguez V., Li E., Ahmari N., Carvajal J.M., Zadeh M., Gong M., Qi Y., Zubcevic J., Sahay B., Pepine C.J., Raizada M.K., Mohamadzadeh M. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension.* 2015;65(6):1331-1340. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315
- Yilmaz M.S., Coskun C., Suzer O., Yalcin M., Mutlu D., Savci V. Hypotensive effects of intravenously administered uridine and cytidine in conscious rats: involvement of adenosine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;584(1):125-136. DOI 10.1016/j.ejphar.2008.01.044
- Zeisel S.H. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition.* 2000; 16(7-8):669-671. DOI 10.1016/S0899-9007(00)00349-X
- Zelentsova E.A., Yanshole L.V., Melnikov A.D., Kudryavtsev I.S., Novoselov V.P., Tsentlovich Y.P. Post-mortem changes in metabolomic profiles of human serum, aqueous humor and vitreous humor. *Metabolomics.* 2020;16(7):80. DOI 10.1007/s11306-020-01700-3
- Zhang A., Sun H., Wu X., Wang X. Urine metabolomics. *Clin. Chim. Acta.* 2012;414:65-69. DOI 10.1016/j.cca.2012.08.016

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.11.2023. После доработки 29.12.2023. Принята к публикации 30.01.2024.