

УДК 612.354:577.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ L-АРГИНИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИЙ ТКАНИ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ У КРЫС

Э. С. Бельских¹, В. И. Звягина², О. М. Урясьев¹, Ю. А. Марсянова²

¹Кафедра факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша,

²кафедра биологической химии

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
 Минздрава России, Рязань

Аннотация. Токсические эффекты гипергомоцистеинемии принято связывать с развитием окислительного стресса и сопутствующим нарушением функции эндотелия, снижением продукции NO и нарушением перфузии органов. Целью экспериментальной работы стало исследование влияния L-аргинина, как фактора способного поддерживать синтез оксида азота, на биохимические показатели функционирования митохондрий ткани печени в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии. Было установлено, что L-аргинин уменьшает степень выраженности гипергомоцистеинемии, увеличивает концентрацию метаболитов оксида азота, способствует снижению уровня молочной кислоты и проявляет выраженные антиоксидантные эффекты в митохондриях печени крыс.

Ключевые слова: митохондрии, гипергомоцистеинемия, печень, L-аргинин, NO.

STUDY OF THE EFFECT OF L-ARGININE ON FUNCTIONAL INDICATORS OF LIVER TISSUE MITOCHONDRIA IN EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN RATS

E. S. Belskikh, V. I. Zvyagina, O. M. Uryasiev, Yu. A. Marsyanova

Ryazan State Medical University

Abstract. The toxic effects of hyperhomocysteinemia are usually associated with the development of oxidative stress and concomitant endothelial dysfunction, decreased NO production and impaired organ perfusion. The aim of the experimental study was to investigate the effect of L-arginine, as a factor capable of supporting nitric oxide synthesis, on biochemical markers of mitochondria functioning in liver tissue under conditions of experimental hyperhomocysteinemia. It was found that L-arginine reduces the severity of hyperhomocysteinemia, increases the concentration of nitric oxide metabolites, contributes to the reduction of lactic acid levels and exhibits pronounced antioxidant effects in rat liver mitochondria.

Key words: mitochondria, hyperhomocysteinaemia, liver, L-arginine, NO.

Введение

Гомоцистеин является продуктом цикла превращения метионина [1–3]. В настоящее время токсические эффекты повышенного уровня гомоцистеина связывают с гипотезой об активации окислительного стресса (ОС) и продукцией избытка активных форм кислорода [1–3]. Повреждение эндотелия в связи с ОС и развитие эндотелиальной дисфункции проявляется, в свою очередь, нарушением продукции и биодоступности метаболитов NO (NO_x) [1–3]. В качестве терапевтических агентов, способных влиять на уровень гомоцистеина, в настоящее время наиболее изучены витамины группы В (В9, В12), непосредственно относящиеся к кофакторам ферментов, принимающих участие в метаболизме метионина [4].

Наряду с этим в настоящее время хорошо известны эффекты L-аргинина, как донора NO, улучшающего функцию эндотелия, и фактора, индуцирующего антиоксидантную защиту [5, 6]. Поэтому для оценки иссле-

дования роли L-аргинина при повышенном уровне гомоцистеина в крови — гипергомоцистеинемии (ГГЦ) — была выбрана модель метиониновой нагрузки, не связанная с дефицитом витаминов группы В.

Целью работы стало исследование влияния L-аргинина, как фактора, способного поддерживать синтез оксида азота, на биохимические показатели функционирования митохондрий ткани печени в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии (ГГЦ).

Материал и методы исследования

Исследование проводилось на половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Животные содержались в условиях вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Кормление животных осуществляли кормом «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. Крысы 1-й группы (Твин, $n = 8$) служили контролем и получали суспензионную основу [7]; 2-я группа (ГГЦ, $n = 8$) животных — крысы с экспериментальной гипергомоцистеинемией путем метиониновой нагрузки, которые получали суспензию метионина 2 раза в день в дозе 1,5 г на кг массы тела в течение 3 недель внутрижелудочно с помощью зонда и градуированного шприца [7]. Дополнительно в рамках моделирования гипергомоцистеинемии животные получали 1 % раствор метионина вместо питьевой воды. Животным 3-й группы (ГГЦ+Арг, $n = 8$) на фоне моделирования гипергомоцистеинемии, начиная с 11-го по 21-й день, осуществляли внутривенное введение раствора L-аргинина в дозе 500 мг/кг массы тела в 0,9 % растворе NaCl ежедневно в промежутке между введением суспензии метионина [7]. Выведение животных из эксперимента осуществлялось под эфирным рауш-наркозом при сохранённом дыхании и сердцебиении путём обескровливания пересечением брюшной аорты на 22-е сутки. Митохондрии из гомогенатов ткани печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [8].

Все показатели, определяемые в митохондриальной фракции, пересчитывали на содержание белка. Определение концентрации белка проводили по методу Лоури с использованием коммерческого набора НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург, Россия) и фотометра КФК 3-01-«ЗОМЗ» (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия).

Определение гомоцистеина в сыворотке крови проводили с использованием набора Axis® Homocysteine EIA (Axis-Shield Diagnostics Ltd., Великобритания) на иммуноферментном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США).

Содержание суммарных метаболитов оксида азота (нитраты и нитриты, NO_x) определяли спектрофотометрическим методом на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology, США) с использованием реактива Грисса и хлорида ванадия [9].

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и концентрацию лактата определяли на биохимическом анализаторе StatFax 1904+ (Awareness Technology Inc., США) с использованием коммерческих наборов производства DiaSys Diagnostic Systems GmbH, ФРГ.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли фотоколориметрически по скорости торможения реакции аутоокисления кверцетина [10].

Комплексную оценку уровня окислительной модификации белков митохондрий оценивали по методике Е. Е. Дубининой в модификации [11]. Общее количество продуктов спонтанной окислительной модификации белков выражали в условных единицах (S OMB — площадь под кривой спектра поглощения спонтанно окисленно-модифицированных белков или карбонилированных белков).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью приложения «GraphPad Prism 9.5.1». Так как распределение полученных данных отличалось от нормального, для описания показателей использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1 и Q3), результаты представляли в форме Me [Q1, Q3]. Для анализа статистической значимости различий независимых выборок по количественному признаку использовали критерий Краскела — Уоллиса и U-критерий Манна — Уитни с поправкой Бенджамини — Кригера — Йекутиели на множественное сравнение. Анализ корреляционных взаимосвязей осуществлялся с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждения

В рамках экспериментальной модели метиониновой нагрузки была получена тяжелая гипергомоцистеинемия с уровнем гомоцистеина более 100 мкмоль/л, сопровождавшаяся снижением суммарной концентрации NO_x в сыворотке крови (рис. 1).

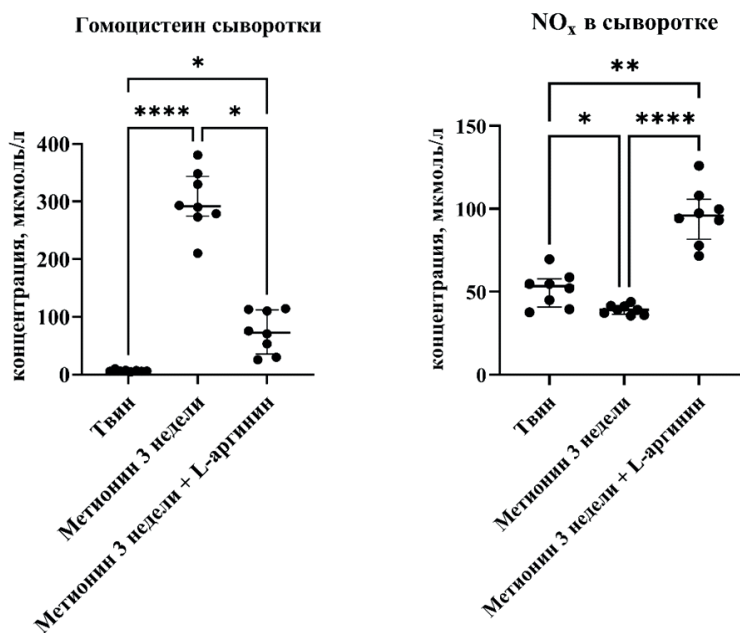


Рис. 1. Концентрация гомоцистеина и NO_x в сыворотке крови исследуемых групп животных

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

Исследование уровня NO_x в митохондриях печени позволило обнаружить снижение в группе 2 (27,5 [22,01; 30,93]; в 1,38 раз, $p = 0,023$) по сравнению с группой 1, получавшей только суспензионную основу (37,77 [35,5; 40,78]).

Уменьшение концентрации NO_x в сыворотке крови в модели ГГЦ создавало предпосылки для развития эндотелиальной дисфункции и нарушения перфузии органов, что могло приводить к развитию окислительного стресса. В этой связи была проведена оценка содержания карбонильных производных белков как показателей повреждения вследствие ОС, активности СОД как маркера антиоксидантной защиты митохондрий, а также измерение уровней лактата и ЛДГ как показателей метаболизма митохондрий.

При этом был обнаружен прирост в содержании карбонилированных белков митохондрий в 3,74 раз

($p = 0,0009$) и повышение уровня активности СОД в 2,87 раз ($p = 0,0013$), а также снижение активности ЛДГ в 1,32 раза ($p = 0,0108$) (рис. 2).

Таким образом, развитие окислительного повреждения белков митохондрий печени сопровождалось соответствующим приростом уровня активности супероксиддисмутазы, указывающей на возросшую потребность в антиоксидантной защите на фоне длительного приема высоких доз метионина у крыс. Статистически значимое увеличение активности ЛДГ могло указывать на повышение потребления лактата митохондриями печени в условиях экспериментальной ГГЦ.

Введение L-аргинина сопровождалось увеличением уровня NO_x как в сыворотке крови (рис. 1), так и в митохондриях печени животных группы 3 (47,41 [41,64; 51,61]; в 1,72 раз, $p = 0,0054$) по сравнению с показателями животных группы 2, что позволяло предположить протективный эффект L-аргинина в поддержания продукции NO как эндотелием, так и в митохондриях в условиях экспериментальной модели ГГЦ.

При назначении L-аргинина на фоне гипергомоцистеинемии в группе 3 отмечалось статистически значимое уменьшение содержания в митохондриях печени карбонилированных белков (в 2,27 раз; 3,14 [2,61; 3,83]; $p = 0,0053$) и уменьшение концентрации лактата (в 2,17 раз; 8,76 [3,42; 12,42]; $p = 0,0015$) при повышении активности митохондриальной СОД (в 1,57 раз; 13,75 [13,27; 22,99]; $p_{2-3} = 0,0053$) относительно показателей группы 2.

На основании полученных результатов было сделано предположение, 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 [12]. Были выявлены такие эффекты L-аргинина как способствование снижению уровня молочной кислоты в митохондриальной фракции гепатоцитов. Были подтверждены антиоксидантные эффекты L-аргинина, что нашло отражение в снижении уровня карбонилированных белков и повышении уровня активности СОД.

Заключение

Результаты исследования продемонстрировали, что L-аргинин уменьшает степень выраженности гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина в высокой дозе, с сопутствующим увеличением концентрации метаболитов оксида азота, а также способствует снижению уровня молочной кислоты в митохондриальной фракции печени на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии. Было подтверждено, что L-аргинин проявляет выраженные антиоксидантные эффекты, что нашло отражение в снижении уровня карбонилированных белков и повышении уровня активности СОД в митохондриях печени крыс.

Таким образом, обнаружены предпосылки для изучения коррекции нарушений, вызванных поступлением избыточного количества метионина с помощью L-аргинина, способного повышать содержание

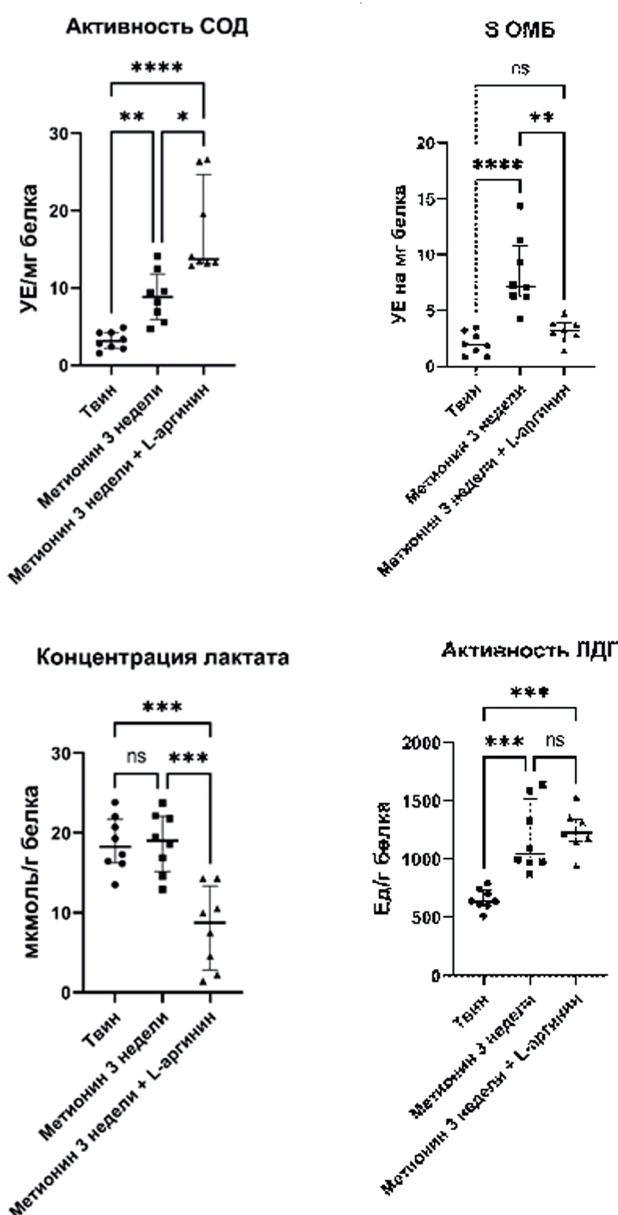


Рис. 2. Исследуемые показатели функционирования митохондрий печени.

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

NO_x, блокировать процессы связанные с избыточным образованием АФК, а также способствовать утилизации лактата митохондриями печени.

Источники финансирования. Исследование проведено при поддержке гранта Президента РФ МК-4805.2022.3.

Список источников / References

1. St hlinger M. C., Tsao P. S., Her J. H., Kimoto M., Balint R. F., Cooke J. P. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001; 104 (21) : 2569–2575. doi: 10.1161/hc4601.098514
2. Jin L., Caldwell R. B., Li-Masters T., Caldwell R. W. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport. *J Physiol Pharmacol*. 2007; 58 (2) : 191–206.
3. Звягина В. И., Бельских Э. С., Урясьев О. М., Медведев Д. В., Киселева В. А., Твердова Л. В. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2018; 13 (1) : 78–81. doi:10.14300/mnnc.2018.13022
4. Miao Y., Guo Y., Chen Y., Lin Y., Lu Y., Guo Q. The effect of B-vitamins on the prevention and treatment of cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*. 2023; nuad127. doi: 10.1093/nutrit/nuad127
5. Roeggeler B., Singh S. K., Sambamurti K., Pappolla M. A. Nitric Oxide as a Determinant of Human Longevity and Health Span. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (19) : 14533. doi: 10.3390/ijms241914533
6. Звягина В. И., Шумаев К. Б., Бельских Э. С., Урясьев О. М., Ахмедова С. Р., Марсянова Ю. А., Шитикова А. М., Сучкова О. Н. Протективные эффекты L-аргинина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2022; 30 (4) : 457–470. doi: 10.17816/PAVLOVJ109410. — EDN GOHAAO
7. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. 2014; 22 (4) : 42–46. doi: 10.17816/PAVLOVJ2014442-46
8. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие / под ред. М.И. Прохоровой. Ленинград: Изд-во Ленинградского университета. 1982: 327.
9. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клинич. лаб. диагностика*. 2005; 6: 15–18.
10. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. Санкт-Петербург : ИКФ «Фолиант». 2000: 90–92.
11. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота: монография. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2018: 192.
12. Robinson J.W. Interactions between neutral and dibasic amino acids for uptake by the rat intestine. *Eur J. Biochem*. 1968; 7 (1) : 78-89. doi: 10.1111/j.1432-1033.1968.tb19577.x

Бельских Эдуард Сергеевич (контактное лицо) — к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии имени проф. В.Я. Гармаша ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9; Тел. 8-920-979-68-46; ed.bels@yandex.ru

Поступила 26.10.2023.