

©Коллектив авторов

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ЛЁГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ У КРЫС

Д.В. Медведев, В.И. Звягина, О.М. Урясьев, Э.С. Бельских, С.В. Булатецкий, А.Н. Рябков*

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
390026, Рязань, ул. Высоковольная, д. 9; эл. почта: meddmit@mail.ru

Гипергомоцистеинемия является фактором риска развития многих заболеваний человека, в том числе патологий лёгких. Большой интерес представляет изучение вторичной митохондриальной дисфункции, которая является важным звеном в патогенезе ассоциированных с гипергомоцистеинемией заболеваний. В условиях тяжёлой гипергомоцистеинемии, вызванной введением крысам-самцам линии Wistar метионина, гомоцистеин накапливается в митохондриях клеток лёгких и, следовательно, может оказывать прямое токсическое действие на эти органеллы. Однако значительных изменений в активности митохондриальных ферментов, участвующих в тканевом дыхании (сукцинатдегидрогеназы) и окислительном фосфорилировании (H^+ -транспортирующей АТФазы), а также цитоплазматической лактатдегидрогеназы не отмечено. Не было выявлено и накопления молочной кислоты в цитоплазме. У животных с тяжёлой гипергомоцистеинемией усиливалось карбонилирование белков митохондрий лёгких со снижением резервно-адаптационного потенциала и увеличением активности супероксиддисмутазы. Эти результаты свидетельствуют о том, что при тяжёлой гипергомоцистеинемии в митохондриях лёгких развивается окислительный стресс, компенсированный активацией антиоксидантной защиты. Указанные изменения сопровождались снижением концентрации метаболитов оксида азота в митохондриях. Введение животным неселективного ингибитора NO-синтаз N_{ω} -нитро-L-аргинина метилового эфира вызывало аналогичное усиление карбонилирования митохондриальных белков, что свидетельствует о большом значении снижения биодоступности оксида азота, являющегося в физиологических концентрациях антиоксидантом, в развитии окислительного стресса в митохондриях лёгких при гипергомоцистеинемии.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, оксид азота, лёгкие, окислительный стресс, митохондрии

DOI 10.18097/PBMC20176303248

ВВЕДЕНИЕ

Гомоцистеин является непротеиногенной аминокислотой, которая образуется в процессе нормального метаболизма метионина (рис. 1) [1]. В основном гомоцистеин расходуется на ресинтез метионина и на образование цистеина путём транссульфирования. Большое значение для метаболизма этой аминокислоты имеют коферменты, образующиеся из витаминов B_6 , B_9 и B_{12} . В норме концентрация гомоцистеина в плазме крови не должна превышать 15 (по некоторым данным 12) мкмоль/л. Повышению уровня гомоцистеина в организме могут способствовать: диета с высоким содержанием метионина; наследственные нарушения активности цистаденин- β -синтазы, метилентетрагидрофолат-редуктазы, метионинсинтазы; системные заболевания (например, патологии почек), приём некоторых лекарственных препаратов, пол и возраст (уровень гомоцистеина увеличивается с возрастом и в среднем выше у мужчин), употребление кофе, малоподвижный образ жизни, курение [2].

Клиническими исследованиями установлено, что гипергомоцистеинемия связана с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, ишемический инсульт, облитерирующий атеросклероз нижних конечностей, тромбоз артерий и вен, хроническая сердечная недостаточность, и ухудшает прогноз при этих патологиях [2]. Наряду с этим, выявлено, что повышенный уровень гомоцистеина плазмы крови

ассоциирован с развитием заболеваний, напрямую не связанных с поражением сердца и сосудов. Среди таких патологических состояний можно назвать осложнения беременности (преэклампсия, низкий вес ребёнка при рождении, преждевременные роды, отслойка плаценты, мертворождение, дефекты нервной трубки у плода), остеопороз и нарушение минерального обмена [2], заболевания нервной системы (болезнь Альцгеймера, когнитивные нарушения, сосудистая деменция [2, 3], шизофрения [4]), неалкогольную жировую болезнь печени [5].

В последние годы возрастает интерес к изучению взаимосвязи между уровнем гомоцистеина в плазме крови и риском развития заболеваний лёгких, что отражается в увеличении количества посвящённых этой проблеме статей. Продемонстрировано, что у больных хронической обструктивной болезнью лёгких уровень гомоцистеина повышен и связан с тяжестью заболевания [6]. Высказываются предположения о том, что гомоцистеин может быть использован в диагностике рака лёгких [7, 8].

Среди мишеней токсического действия гомоцистеина на лёгкие большое значение придают сосудистой сети органа. Так, в эксперименте на изолированных лёгочных артериях морской свинки продемонстрировано, что гомоцистеин нарушает сосудистую реактивность этих артерий за счёт развития окислительного стресса в эндотелии с последующим повреждением ДНК [9]. Однако ввиду неспецифичности механизмов токсичности

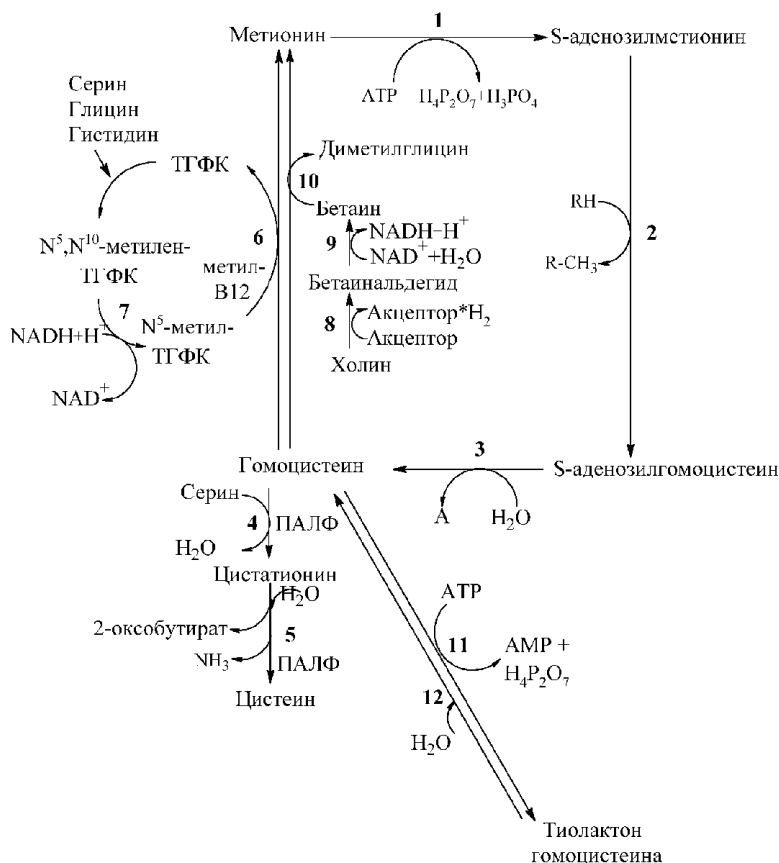


Рисунок 1. Пути метаболизма гомоцистеина у человека [1]. 1 - метионин-S-аденозилтрансфераза, 2 - метилтрансферазы, 3 - S-аденозил-L-гомоцистеингидролаза, 4 - цистатионин-β-синтаза, 5 - цистатионин-γ-лиаза, 6 - метионинсинтаза, 7 - метилентетрагидрофолатредуктаза, 8 - холиндегидрогеназа, 9 - бетаинальдегиддегидрогеназа, 10- бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансфераза, 11- метионил-tPHK-синтетаза, 12- параксоназа.

гомоцистеина можно предположить и наличие прямого повреждающего действия на внеклеточный матрикс и паренхиму лёгких. Например, в одном из экспериментов при моделировании гипергомоцистеинемии высокими дозами метионина на птицах и мышах было обнаружено, что продолжительное воздействие на развивающиеся лёгкие высокого уровня метионина/гомоцистеина может приводить к значительным нарушениям в эластических волокнах и структуре органа [10].

В связи с описанными выше фактами представляется целесообразным изучение метаболических изменений в лёгких при гипергомоцистеинемии. Механизмы токсичности этой аминокислоты можно разделить на первичные и вторичные. Первичные обусловлены, по-видимому, 3 типами реакций: восстановлением кислорода до супероксидного анион-радикала в присутствии ионов металлов переменной валентности [11], связыванием оксида азота (II) (NO) за счёт нитрозилирования гомоцистеина [12] и гомоцистеинилированием – то есть ковалентным связыванием гомоцистеина с сульфгидрильными группами цистеина или тиолактона гомоцистеина с аминокислотными группами лизина в белках [13]. Вторичными можно считать снижение эффектов NO, увеличение активности матричных металлопротеиназ, способность вызывать развитие таких типовых патологических процессов как окислительный стресс

[14, 15], митохондриальная дисфункция [16], стресс эндоплазматического ретикулума, эндотелиальная дисфункция [17].

В условиях высокого парциального давления кислорода в лёгких большое значение имеет развитие окислительного стресса под действием гомоцистеина. В случае если гомоцистеин в достаточном количестве накапливается в клетках лёгких, окислительный стресс может развиваться вследствие восстановления кислорода до супероксидного аниона под действием гомоцистеина как донора электронов. В то же время гомоцистеин способен повлиять на активность митохондриальных оксидоредуктаз, например, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), тем самым изменяя продукцию активных форм кислорода (АФК) дыхательной цепью. С другой стороны, гиперпродукция АФК может приводить к окислительной модификации белков (ОМБ) митохондрий и нарушению их функционирования. Это должно отразиться в изменении интенсивности окислительного фосфорилирования, активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и уровня молочной кислоты. Накопление гомоцистеина может приводить к нарушению метаболизма NO и снижению эффектов последнего. В физиологических, относительно низких, концентрациях NO проявляет антиоксидантные свойства. Вследствие этого нарушение его метаболизма способно усилить окислительный стресс.

МЕТОДИКА

Исследование проведено на 33 крысах-самцах линии Wistar. Работу с животными осуществляли в соответствии с “Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986), приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н “Об утверждении правил лабораторной практики” и приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755 “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”. Крыс содержали в стандартных условиях вивария, в качестве пищи они получали корм “Чара” (“Ассортимент-Агро”, Россия), содержащий 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.

Животные были разделены на 4 группы:

У крыс 1 группы (n=9) моделировали тяжёлую гипергомоцистеинемию (>100 мкмоль/л). Этим животным в течение 21 дня внутрижелудочно (через зонд) вводили 25% суспензию метионина в дозе 1,5 г метионина (“Sigma-Aldrich”, США) на 1 кг массы тела 2 раза в сутки; при этом вместо питьевой воды животные получали 1% водный раствор метионина при свободном доступе к поилкам [18]. Выпиваемый в сутки объём раствора метионина составил 17,2 (15,5; 18,1) мл. В эксперимент были взяты 8 животных с развившейся тяжёлой гипергомоцистеинемией, 1 особь была исключена из эксперимента, так как уровень гомотеина в сыворотке крови этого животного был ниже 100 мкмоль/л.

Крысы 2 группы (n=8) по аналогичной схеме получали суспензионную основу, состоящую из воды, твина-80 (ЗАО “Вектон”, Россия) и крахмала (ЗАО “Вектон”) и не содержащую метионин. Поилки для этих животных наполняли обычной питьевой водой.

У крыс 3 группы (n=8) моделировали дефицит NO. Этим животным ежедневно 1 раз в сутки в течение 7 дней внутрибрюшинно вводили 0,5% раствор метилового эфира N_ω-нитро-L-аргинина (L-NAME, “Sigma-Aldrich”), приготовленный на физиологическом растворе.

Крысам 4-ой группы (n=8) по аналогичной схеме вводили физиологический раствор.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось с утра после ночного перерыва в кормлении. Крыс умерщвляли под эфирным рауш-наркозом при сохранённом дыхании и сердцебиении путём обескровливания пересечением брюшной аорты. Крови давали свернуться и получали сыворотку центрифугированием в течение 15 мин при 1000 g. Кроме того, извлекали лёгкие. Отмывали их от крови в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,001 М ЭДТА и 0,05 М трис-буфер,

pH 7,4. Затем навеску лёгкого массой 750 мг гомогенизировали в той же среде в соотношении 1:9 на гомогенизаторе Potter S (“Sartorius”, ФРГ) с зазором между пестиком и стенкой сосуда 0,16-0,24 мм. Полученный гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию сначала при 800 g для осаждения неразрушенных клеток и ядер, затем при 14000 g для осаждения митохондрий и при 20000 g для осаждения лизосом [19]. Митохондриальную фракцию ресуспендировали в среде выделения, не содержащей ЭДТА. К части суспензии митохондрий добавляли тритон X-100 для разрушения мембран. Все описанные манипуляции осуществляли при температуре не выше 4°C.

В дальнейшем для анализа использовали:

- сыворотку крови, в которой определяли концентрацию общего гомотеина и метаболитов NO;
- цитоплазматическую фракцию, лишённую лизосом, (содержала и растворимые компоненты внеклеточного матрикса); в ней определяли концентрации белка, метаболитов NO, молочной кислоты и активность ЛДГ;
- митохондриальную фракцию с разрушенными мембранами, где оценивали ОМБ, концентрацию метаболитов NO, активность ЛДГ и супероксиддисмутазы (СОД);
- митохондриальную фракцию с неразрушенными мембранами, в которой определяли активности Н⁺-транспортирующей АТФазы (Н⁺-АТФазы) и СДГ.

Все указанные показатели измеряли с использованием спектрофотометрических методик. Концентрацию общего гомотеина определяли иммуноферментным анализом с помощью коммерческого набора (“Axis Shield”, Великобритания), содержание белка – методом Лоури с помощью набора реактивов (“Экосервис”, Россия), уровень метаболитов NO – методом в модификации Метельской и Гумановой [20], концентрацию молочной кислоты – лактатоксидазным методом с помощью набора (“Ольвекс-Диагностикум”, Россия) активность СДГ – по реакции восстановления гексацианоферрата (III) калия [19], активность ЛДГ – по снижению концентрации NADH в реакции восстановления пирувата с помощью коммерческого набора (“Diasys”, ФРГ), активность Н⁺-АТФазы – измеряя содержание неорганического фосфата методом Боданского после остановки реакции, активность СОД – по торможению реакции аутоокисления кверцетина [21]. ОМБ оценивали методом Levine в модификации Дубининой, который основан на реакции взаимодействия карбонильных групп и иминогрупп окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, обладающих специфическим спектром поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Анализ количества карбонильных производных проводили посредством расчёта площади под кривой абсорбции света, разбивая её на прямоугольные трапеции. Общее количество продуктов ОМБ определяли по суммарной площади под кривой.

ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ЛЁГКИХ ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Затем рассчитывали доли ранних и поздних маркеров окислительной деструкции белков – альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) нейтрального и основного характера. АДНФГ нейтрального характера имеют максимумы поглощения при 230, 254, 270, 280, 356 нм, а основного – при 428 и 430 нм. Максимумы поглощения света для нейтральных КДНФГ наблюдаются при 363 и 370 нм, а для основных – при 434, 520, 535 нм. АДНФГ являются маркерами фрагментации белков, а КДНФГ – их агрегации. Нейтральный или основной характер оксопроизводных отражает степень повреждения нейтральных и основных аминокислот. Кроме того рассчитывали резервно-адаптационный потенциал митохондриальных белков как долю в % суммарной площади под спектром абсорбции света спонтанной ОМБ к площади ОМБ, индуцированной с помощью реакции Фентона (последняя принималась за 100%). Чем ниже доля продуктов спонтанного окисления, тем выше резервно-адаптационный потенциал [22].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2007, StatSoft Statistica 8.0 и IBM SPSS Statistics 20. Соответствие выборок нормальному распределению проверяли посредством критерия Шапиро-Уилка. Для нормально распределенных выборок результаты представляли в виде: среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$), а если распределение отличалось от нормального – как медиану [первый квартиль; третий квартиль] ($Me [Q_1, Q_3]$). Равенство дисперсий в выборках оценивали с помощью теста Левена. Для нормально распределенных выборок с равными дисперсиями использовали критерий Стьюдента для попарного сравнения, а для множественных сравнений – однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кейлса. В остальных случаях применяли критерий Манна-Уитни для попарного сравнения, для множественных сравнений – критерий Краскела-Уоллиса и непараметрический вариант критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали отличия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение метионина по указанной схеме приводит к значительному увеличению концентрации гомоцистеина в сыворотке крови (табл. 1). Уровень этой аминокислоты у крыс, получавших метионин, превысил 100 мкмоль/л, что соответствует тяжёлой

форме гипергомоцистеинемии. Кроме того, у животных, которым вводили метионин и L-NAME, статистически значимо снижалась концентрация метаболитов NO в сыворотке крови (на 23,9 и 37,5% соответственно) по сравнению с крысами соответствующих контрольных групп.

Как видно на рисунке 2, удельная концентрация гомоцистеина оказалась выше в митохондриях, чем в цитоплазме клеток лёгких, и в группе, получавшей метионин, и у животных, которым вводили суспензионную основу. При этом у животных с гипергомоцистеинемией уровень гомоцистеина по сравнению с контрольной группой практически не отличался в цитоплазме, однако статистически значимо был выше в митохондриях (на 24,9%). Следует отметить, что в целом эти изменения несопоставимы с увеличением уровня гомоцистеина в сыворотке крови.

Полученные данные указывают на то, что в условиях гипергомоцистеинемии гомоцистеин в ткани лёгкого не накапливается. Однако его неравномерное распределение по компартментам клетки создаёт условия для накопления этой аминокислоты в отдельных органеллах (в частности, в митохондриях), на которые гомоцистеин может оказывать прямое токсическое действие. Причина такого распределения не ясна, так как механизм транспорта гомоцистеина в митохондрии точно не установлен. Известно только, что во внутренней мембране митохондрий присутствует транспортер S-аденозилметионина (S-adenosylmethionine carrier 1), переносящий S-аденозилметионин в матрикс митохондрий, а S-аденозилгомоцистеин – из матрикса [23].

Следует отметить, что во всех четырёх группах не обнаружено статистически значимых различий в концентрации белка как в цитоплазме, так и в митохондриях лёгких (табл. 2).

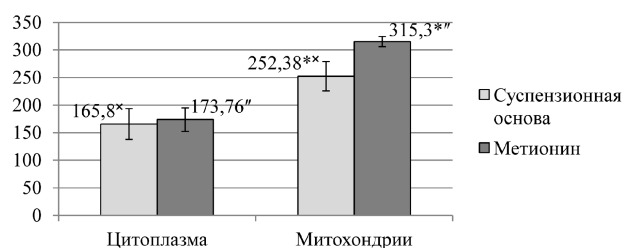


Рисунок 2. Удельная концентрация гомоцистеина (нмоль/г белка) в субклеточных фракциях, полученных из лёгких крыс. * - $p=0,000155$, × - $p=0,000018$, '' - $p=0,000000$.

Таблица 1. Содержание метаболитов NO и общего гомоцистеина в сыворотке крови крыс в исследуемых группах

	Метионин	Суспензионная основа	L-NAME	Физ. раствор
Концентрация общего гомоцистеина, мкмоль/л	291,7 [277,4; 334,4] ($p_{1-2}=0,002$; $p_{1-3}=0,004$; $p_{1-4}=0,005$)	5,8 [5,6; 6,8]	6,5 [5,6; 7,1]	6,2 [5,5; 7,4]
Концентрация метаболитов NO, мкмоль/л	39,15 \pm 2,86 ($p_{1-2}=0,048$; $p_{1-4}=0,035$)	51,47 \pm 10,57 ($p_{2-3}=0,02$)	35,48 \pm 3,93 ($p_{3-4}=0,001$)	56,74 \pm 15,97

Примечание: Здесь и в таблицах 2-3 указаны только статистически значимые p ($p \leq 0,05$).

Таблица 2. Концентрация метаболитов и активность ферментов в субклеточных фракциях, полученных из гомогенатов лёгких

	Метионин	Суспензионная основа	L-NAME	Физ. раствор
Цитоплазма				
Концентрация белка, мг/мл	9,46 [8,83; 9,71]	9,64 [8,94; 9,73]	10,01 [9,28; 10,22]	9,80 [9,28; 10,08]
Концентрация молочной кислоты, мкмоль/г белка	48,05±20,66	43,96±23,02	52,41±27,83	43,98±6,60
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	396,66 [392,40; 421,34]	394,57 [371,12; 413,30]	419,38 [395,68; 437,75]	355,05 [324,38; 385,19]
Митохондрии				
Концентрация белка, мг/мл	5,40 [5,27; 5,49]	6,17 [5,81; 6,55]	4,97 [4,66; 5,99]	4,97 [4,37; 5,57]
Концентрация метаболитов NO, мкмоль/г белка	40,54±11,59 ($p_{1-2}=0,042466$ $p_{1-4}=0,073886$)	60,72±21,33 ($p_{2-3}=0,013193$)	34,56±7,89 ($p_{3-4}=0,037010$)	55,24±18,73
Активность ЛДГ, ЕД/г белка	333,97±52,90 ($p_{1-2}=0,000180$ $p_{1-3}=0,000165$ $p_{1-4}=0,000432$)	215,13±38,18 ($p_{2-3}=0,028717$)	161,10±27,15 ($p_{3-4}=0,007946$)	237,56±61,42
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	50,95±24,32	40,40±29,92	42,19±29,36	44,71±22,71
Активность Н ⁺ -АТФазы, мкмоль фосфата/мг белка в час	12,47±2,56	9,23±4,73	8,75±2,91	11,69±4,91
Активность СОД, УЕ/мг белка	8,90±2,89 ($p_{1-2}=0,005466$ $p_{1-4}=0,003385$)	4,06±2,62 ($p_{2-3}=0,002232$)	10,10±4,62 ($p_{3-4}=0,000985$)	3,12±2,10

Между всеми четырьмя группами животных не было обнаружено и статистически значимых отличий в концентрации молочной кислоты и активности ЛДГ в цитоплазме. При этом активность ЛДГ в митохондриях у группы крыс, получавших метионин, была статистически значимо выше, а у животных, получавших L-NAME, ниже, чем в остальных трёх группах. Уровень метаболитов NO в митохондриях как после введения метионина, так и после введения L-NAME, оказался ниже, чем в обеих контрольных группах на 33,2% и 37,4% соответственно. Эти данные указывают на то, что снижение активности митохондриальной ЛДГ не связано напрямую с основным эффектом L-NAME – ингибированием NO-синтазы.

NO считается ингибитором дыхательной цепи митохондрий [24]. Однако в условиях проведённого эксперимента гипергомоцистеинемия и дефицит NO не привели к статистически значимым изменениям активности СДГ и Н⁺-АТФазы (табл. 2) – ферментов, участвующих в тканевом дыхании и окислительном фосфорилировании.

И у животных, получавших метионин, и у крыс, которым вводили L-NAME, более высокая активность СОД (табл. 2), по-видимому, свидетельствует об активации системы антиоксидантной защиты в условиях гиперпродукции АФК.

В ходе эксперимента также оценивали ОМБ (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют

о том, что гипергомоцистеинемия и дефицит NO способствуют развитию окислительного стресса: уровень карбонильных производных в группе животных, которым вводили метионин, и в группе, получавшей L-NAME, был статистически значимо выше, чем в митохондриях крыс, получавших суспензионную основу или физиологический раствор (суммарная площадь под кривой абсорбции света была выше на 566,7 и 97,3% соответственно). При этом отмечено увеличение количества как нейтральных, так и основных карбонильных производных, что свидетельствует об окислительном повреждении как нейтральных, так и основных аминокислот. Интересно, что в митохондриях лёгких животных, которым вводили суспензионную основу, содержащую твин-80, суммарная площадь под кривой ОМБ оказалась статистически значимо ниже (на 64,8%), чем у группы, получавшей физиологический раствор. Это свидетельствует о наличии у твина-80 антиоксидантного эффекта.

В ходе исследования был также проанализирован резервно-адаптационный потенциал белков митохондрий в условиях гипергомоцистеинемии и дефицита NO (рис. 3).

И введение метионина, и инъекции L-NAME способствовали снижению резервно-адаптационного потенциала относительно контрольных групп (на 55,1% и 43,6% соответственно). В митохондриях животных, получавших суспензионную основу, резервно-адаптационный потенциал оказался

ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ЛЁГКИХ ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Таблица 3. Площади под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ митохондрий, полученных из ткани лёгкого

	Метионин (1)	Суспензионная основа (2)	L-NAME (3)	Физ. раствор (4)
Площадь под кривой за счёт АДНФГ нейтрального характера, единиц оптической плотности/мг белка	6,66 [5,23; 8,17] ($p_{1-2}=0,000$; $p_{1-4}=0,043$)	0,79 [0,62; 0,93] ($p_{2-3}=0,000$; $p_{2-4}=0,029$)	5,11 [4,83; 5,86]	2,89 [2,03; 3,35]
Площадь под кривой за счёт КДНФГ нейтрального характера, единиц оптической плотности/мг белка	2,30±0,75 ($p_{1-2}=0,000$; $p_{1-4}=0,003$)	0,43±0,19 ($p_{2-3}=0,000$)	1,83±0,38 ($p_{3-4}=0,022$)	0,82±0,17
Площадь под кривой за счёт АДНФГ основного характера, единиц оптической плотности/мг белка	1,82±0,69 ($p_{1-2}=0,000$; $p_{1-4}=0,002$)	0,35±0,15 ($p_{2-3}=0,000$)	1,51±0,48 ($p_{3-4}=0,008$)	0,58±0,29
Площадь под кривой за счёт КДНФГ нейтрального характера, единиц оптической плотности/мг белка	0,29±0,13 ($p_{1-2}=0,000$; $p_{1-4}=0,003$)	0,06±0,04 ($p_{2-3}=0,001$)	0,25±0,10 ($p_{3-4}=0,006$)	0,08±0,06
Суммарная площадь под кривой, единиц оптической плотности/мг белка	10,60 [8,57; 13,73] ($p_{1-2}=0,000$; $p_{1-4}=0,023$)	1,59 [1,35; 1,78] ($p_{2-3}=0,000$; $p_{2-4}=0,049$)	8,92 [8,08; 9,59] ($p_{3-4}=0,046$)	4,52 [3,61; 5,16]

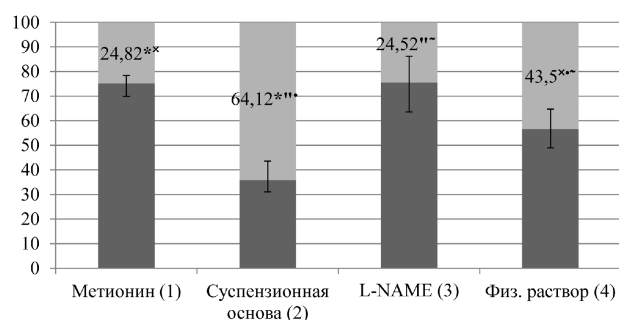


Рисунок 3. Резервно-адаптационный потенциал митохондрий, полученных из ткани лёгкого (в % площади под кривой спектра поглощения продуктов спонтанной ОМБ относительно металл-зависимой ОМБ). * - $p_{1-2}=0,000$; × - $p_{1-4}=0,042$; " - $p_{2-3}=0,000$; • - $p_{2-4}=0,042$; ~ - $p_{3-4}=0,046$; статистически значимых отличий между группами 1 и 3 не выявлено.

на 47,4% выше, чем у крыс, которым вводили физиологический раствор. Это подтверждает позитивное влияние твина-80 как антиоксиданта.

Активация ОМБ при гипергомоцистеинемии может быть связана с нарушением синтеза NO, так как известно, что в физиологических концентрациях оксид азота проявляет антиоксидантный эффект за счёт связывания с ионами металлов переменной валентности, препятствуя таким образом взаимодействию с ними пероксида водорода, протеканию реакции Фентона и образованию гидроксильного радикала [25]. Исходя из этих представлений, можно предположить, что дефицит NO способствует развитию окислительного стресса. С другой стороны, увеличение образования активных форм кислорода под действием гомотеина может способствовать ускоренной инактивации NO и снижению его биодоступности. То есть гиперпродукцию активных форм кислорода и дефицит оксида азота, обладающего антиоксидантными свойствами, можно рассматривать как звенья одного порочного круга патогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При тяжелой гипергомоцистеинемии у крыс удельная концентрация гомотеина почти не увеличивается в цитоплазматической фракции, полученной из ткани лёгкого, но статистически значимо повышается в митохондриальной фракции, что создаёт предпосылки для прямого токсического действия этой аминокислоты на митохондрии лёгких.

В условиях тяжелой гипергомоцистеинемии в митохондриях клеток лёгких нарушается метаболизм NO, что выражается в снижении концентрации его метаболитов. По-видимому, этот эффект обусловлен торможением синтеза NO.

При гипергомоцистеинемии, как и при дефиците NO, вызванном введением неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME, в лёгких не наблюдается статистически значимых изменений активности митохондриальных ферментов, участвующих в тканевом дыхании (СДГ) и окислительном фосфорилировании (H^+ -АТРаза), в цитоплазме не происходит существенной модуляции активности ЛДГ и накопления лактата. Однако введение метионина и L-NAME вызывает разнонаправленные изменения активности митохондриальной ЛДГ – в первом случае активность фермента статистически значимо возрастает, а во втором – снижается. По всей видимости, этот эффект не связан с изменениями в метаболизме NO.

У животных с тяжелой гипергомоцистеинемией отмечено усиление карбонилирования белков митохондрий лёгких. При этом окислительной деструкции были подвержены как нейтральные, так и основные аминокислоты, а соотношение маркеров фрагментации и агрегации белков существенно не изменялось. Кроме того, снижался резервно-адаптационный потенциал митохондриальных белков и увеличивалась активность СОД.

Дефицит NO, вызванный введением L-NAME, приводит к аналогичным эффектам в отношении ОМБ митохондрий клеток лёгких. Эти данные

и снижение удельной концентрации метаболитов NO в митохондриях после введения метионина свидетельствуют о большом значении нарушения метаболизма NO в развитии окислительного стресса под действием высоких концентраций гомоцистеина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Медведев Д.В., Звягина В.И. (2017) Кардиологический вестник, **12**(1), 52-57.
2. Refsum H., Nurk E., Smith A.D., Ueland P.M., Gjesdal C.G., Bjelland I., Tverdal A., Tell G.S., Nygård O., Vollset S.E. (2006) J. Nutr., **136**, 1731-1740.
3. Herrmann W., Obeid R. (2011) Clin. Chem. Lab. Med., **49**, 435-441.
4. Levine J., Stahl Z., Sela B.A., Gavendo S., Ruderman V., Belmaker R.H. (2002) Am. J. Psychiatry, **159**, 1790-1792.
5. Gulsen M., Yesilova Z., Bagci S., Uygur A., Ozcan A., Erkin C.N., Erdil A., Sanisoglu S.Y., Cakir E., Ates Y., Erbil M.K., Karaeren N., Dagalp K. (2005) J. Gastroenterol. Hepatol, **20**, 1448-1455.
6. Seemungal T.A., Lun J.C., Davis G., Neblett C., Chinyepi N., Dookhan C., Drakes S., Mandeville E., Nana F., Setlhake S., King C.P., Pinto Pereira L., Delisle J., Wilkinson T.M., Wedzicha J.A. (2007) Int. J. COPD, **2**, 313-321.
7. Yecim Özkan Sevgi Yardim-Akaydin, Hikmet Firat, Emel Çalışkan-Can, Sadik Ardiç, Bolkan Şimşek (2007) Anticancer Research, **27** (2), 1185-1190.
8. Tastekin D., Erturk K., Bozbeý H.U., Olmuscelic O., Kiziltan H., Tuna S., Tas F. (2015) Experimental Oncology, **37**, 218-222.
9. Arda T., Gulay S., Edibe K. (2007) Pulmon. Pharmacol. Ther., **20**, 265-272.
10. Starcher B., Hill C.H. (2005) Experimental Lung Research, **31**, 873-885.
11. Steed M.M., Tyagi S.C. (2011) Antioxid. Redox. Signal., **15**, 1927-1943.
12. Jakubowski H. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 21813-21816.
13. Krundieck C.L., Prince C.W. (2000) J. Nutr., **130**, 365-368.
14. Ильичева А.С., Фомина М.А., Медведев Д.В. (2014) Наука молодых (Eruditio Juvenium), **4**, 37-42.
15. Ильичева А.С., Фомина М.А. (2015) Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова, **1**, 45-51.
16. Timkova V., Tatarkova Z., Lehotsky J., Racay P., Dobrota D., Kaplan P. (2016) Mol. Cell. Biochem., **411**, 261-270.
17. Lai W.K.C., Kan M.Y. (2015) Ann. Nutr. Metab., **67**, 1-12.
18. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. (2014) Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова, **4**, 42-46.
19. Прохорова М.И. (ред.) (1986) Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен), Издательство Ленинградского университета, Л, 327 с.
20. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. (2005) Клини. лабор. диагн., **6**, 15-18.
21. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) Вopr. мед. химии, №2, 88-91.
22. Абаленихина Ю.В. (2015) Окислительная модификация белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота. Дисс. канд. наук. ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, Рязань.
23. Agrimi G., Di Noia M.A., Marobbio C.M.T., Fiermonte G., Lasorsa F.M., Palmieri F. (2004) Biochem. J., **379** (1), 183-190.
24. Mason M.G., Nicholls P., Wilson M.T., Cooper C.E. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103**(3), 708-713.
25. Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G., Pluta R.M., Hewett S.J., Colton C., Vitek M., Feelisch M., Grisham M.B. (2001) Antioxid. Redox. Signal., **3**(2), 203-213.

Поступила: 06. 03. 2017.
Принята к печати: 17. 05. 2017.

METABOLIC CHANGES IN PULMONARY MITOCHONDRIA OF RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

D.V. Medvedev, V.I. Zvyagina, O.M. Uryasev, E.S. Belskikh, S.V. Bulatetskiy, A.N. Ryabkov

Ryazan State Medical University,
9 Vysokovoltaja str., Ryazan, 390026 Russia; e-mail: meddmit@mail.ru

Hyperhomocysteinemia is a risk factor for many human diseases, including pulmonary pathologies. In this context much interest attracts secondary mitochondrial dysfunction, which is an important link in pathogenesis of diseases associated with hyperhomocysteinemia. The study was conducted using male Wistar rats. It was found that under conditions of severe hyperhomocysteinemia caused by administration of methionine, homocysteine was accumulated in lung mitochondria thus suggesting a direct toxic effect on these organelles. However, we have not observed any significant changes in the activity of mitochondrial enzymes involved in tissue respiration (succinate dehydrogenase) and oxidative phosphorylation (H^+ -ATPase) and of cytoplasmic lactate dehydrogenase. Also there was no accumulation of lactic acid in the cytoplasm. Animals with severe hyperhomocysteinemia had higher levels of lung mitochondrial protein carbonylation, decreased reserve-adaptive capacity, and increased superoxide dismutase activity. These results indicate that severe hyperhomocysteinemia causes development of oxidative stress in lung mitochondria, which is compensated by activation of antioxidant protection. These changes were accompanied by a decrease in the concentration of mitochondrial nitric oxide metabolites. Introduction to animals a nonselective NO-synthase inhibitor L-NAME caused similar enhancement of mitochondrial protein carbonylation. It demonstrates importance of reducing bioavailability of nitric oxide, which is an antioxidant in physiological concentrations, in the development of oxidative stress in lung mitochondria during hyperhomocysteinemia.

Key words: hyperhomocysteinemia, nitric oxide, lung, oxidative stress, mitochondria