

КОРРЕКЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ НИКЕЛЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ИНГИБИТОРАМИ ЭКСПРЕССИИ eNOS И АРГИНАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Дзугкоев С.Г.¹, Дзугкоева Ф.С.¹, Маргиева О.И.¹, Можаяева И.В.¹

¹Институт биомедицинских исследований – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, e-mail: patbiochem@mail.ru

В исследованиях на крысах установлено, что избыточное поступление никеля в организм оказывает негативное действие: индуцируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне угнетения активности супероксиддисмутазы (СОД), происходит снижение содержания суммарных метаболитов оксида азота (NOx). Полученные нами данные свидетельствуют о позитивном действии терапии L-аргинином. Аргинин угнетает ПОЛ, повышает активность СОД, одновременно снижая активность каталазы и концентрацию церулоплазмينا. Из этих данных следует, что антиоксидантное действие L-аргинина обусловлено устранением дисбаланса и расхождения в антиоксидантной системе (АОС). Параллельно с этими изменениями повышается концентрация суммарных метаболитов оксида азота. Поскольку содержание L-аргинина – субстрата нитрооксидсинтазы мы изучали влияние неспецифического ингибитора энзима цикла синтеза мочевины на его концентрацию. Данные подтвердили, что комплексная терапия нарушенных окислительно-восстановительных процессов при никелевой интоксикации способствовала более значительному ингибированию липопероксидации, стимулируя активность СОД и одновременно повышая содержание NOx. Таким образом, оба препарата: L-аргинин и L-норвалин – предотвращают снижение концентрации оксида азота в крови экспериментальных животных и развитие дисфункции эндотелия в условиях никелевой модели.

Ключевые слова: никель, ПОЛ, АОС, L-аргинин, L-норвалин, оксид азота.

CORRECTION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN NICKEL INTOXICATION BY INHIBITORS OF EXPRESSION OF ENOS AND ARGINASE IN EXPERIMENT

Dzugkoev S.G.¹, Dzugkoyeva F.S.¹, Margieva O.I.¹, Mozhaeva I.V.¹

¹Institute of Biomedical Research - a branch of the Federal State Budgetary Institution of Science of the Federal Scientific Center "Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Vladikavkaz, e-mail: patbiochem@mail.ru

In the studies on the rats, it has been found that excessive intake of nickel into the body has a negative effect: lipid peroxidation (LPO) processes are induced against the background of suppression of superoxide dismutase (SOD) activity, the total metabolites of nitric oxide (NOx) decrease. The data obtained by us testify to the positive effect of L-arginine therapy. Arginine inhibits LPO, increases the activity of SOD, while reducing the activity of catalase and the concentration of ceruloplasmin. These data suggest that the antioxidant effect of L-arginine is due to the elimination of imbalance and divergence in the antioxidant system (AOC). In parallel with these changes, the concentration of total metabolites of nitric oxide increases. Since the content of L-arginine, a substrate of nitroxide synthase, we studied the effect of a nonspecific inhibitor of the enzyme of the urea synthesis cycle on its concentration. The data confirmed that complex therapy of disturbed oxidation-reduction processes during nickel intoxication contributed to a more significant inhibition of lipoperoxidation, stimulating SOD activity and simultaneously increasing the NOx content. Thus, both drugs: L-arginine and L-norvaline prevent a decrease in the concentration of nitric oxide in the blood of experimental animals and the development of endothelial dysfunction under the conditions of the nickel model.

Keywords: nickel, LPO, AOS, L-arginine, L-norvaline, nitric oxide.

Наряду с другими тяжелыми металлами никель влияет на аллергические мутагенные показатели, индуцирует процессы липопероксидации и способствует развитию онкопатологий [1]. На молекулярном уровне никель повышает уровень активных метаболитов кислорода (АМК), нарушая окислительно-восстановительные реакции в клетках

[2; 3].

В условиях окислительного стресса развивается эндотелиальная дисфункция, патогенетическим звеном которой является уменьшение концентрации NO-вазодилатирующего фактора и снижение уровня биодоступности оксида азота. Современные данные литературы в эксперименте и клинике подтверждают ключевую роль дисфункции эндотелия в развитии сосудистых осложнений при различных нозологиях [4].

Для нарушения функции эндотелия характерно изменение взаимодействия между вазодилататорами и вазоконстрикторами с преобладанием последних. Следует отметить, что оксид азота обладает сосудорасширяющими свойствами, а еще оказывает мембранотропное, антипролиферативное, антитромботическое действия. Как правило, угнетение NO-продуцирующей функции эндотелия развивается в условиях нарушения окислительно-восстановительных процессов, которые имеют место на фоне действия тяжелых металлов, и может индуцироваться ингибитором экспрессии eNOS – L-NAME.

Субстратом для образования оксида азота является L-аргинин - полунезаменимая аминокислота, которая используется во многих метаболических процессах, включая синтез мочевины. Поэтому актуальным является исследование взаимодействия между ингибиторами фермента аргиназы и индукторами, и блокаторами экспрессии eNOS в процессе образования оксида азота. Данные экспериментальных исследований о влиянии L-аргинина на образование NO в системе кровообращения при заболеваниях сердца свидетельствуют о восстановлении синтеза NO и сосудистой функции при сердечно-сосудистых заболеваниях [5; 6].

Участие L-аргинина в процессе образования NO подтверждается наличием его дефицита при генетически детерминированных заболеваниях [7]. Роль аргиназы в регуляции доступности L-аргинина также подтверждают генетические исследования. Нокаут гена у мышей, определяющий образование аргиназы I, не оказывает влияние на их жизнеспособность. Отмечается нулевое содержанием аргиназы II и примерно двукратное увеличение в плазме концентрации L-аргинина. Предположительно в определении содержания L-аргинина в крови оказывают влияние аргиназа I и II, которые осуществляют разные биологические действия [7]. Исследуется причинность сниженной доступности L-аргинина. Аргиназа – металлофермент, имеет две изоформы: аргиназа-I, характерная для печеночной, почечной тканей, однако работает и в предстательной железе, и в ГМК аорты, нормализует угнетение аргиназы или вспомогательную подачу оксида азота и сосудорасширяющую функцию после ишемии-реперфузии. При метаболическом синдроме повышает функциональную гипергликемию и способствует эндотелиальной дисфункции. Степень образования аргиназы II стимулируется продуктами липопероксидации. Это связано

с тем, что реагирующие элементы находятся в промоторной области аргиназы II [7].

Данные литературы свидетельствуют о том, что торможение аргиназы приводит к увеличению синтеза NO в эндотелиальных клетках. Очень важен факт, что существенная экспрессия аргиназы в эндотелиальных клетках (ЭК) микрососудов противодействует NO-опосредованной дилатации.

Таким образом, в лечении дисфункции эндотелия при различных патологиях аргиназа является точкой приложения фармакологических препаратов.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что перспективным путем терапии эндотелиальной дисфункции является разработка способа коррекции, основанного на изучении взаимодействия между индуктором eNOS – L-аргинином и ингибитором аргиназы – L-норвалином.

Целью настоящего исследования является исследование состояния системы ПОЛ – АОС, содержания NOx на модели дисфункции эндотелия, вызванной никелевой интоксикацией, и разработка нового способа коррекции дефицита оксида азота L-аргинином, L-норвалином и их комбинацией.

Материал и методы исследования. Эксперимент проводили на крысах «Вистар» одинакового возраста. Животных содержали в виварии по «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и принципам Хельсинкской декларации.

Моделировали никелевую интоксикацию парентеральным введением хлорида никеля в течение 1 месяца в дозе 0,5 мг/ кг веса животного. Вводимая доза хлорида никеля была выбрана методом титрования, начиная от DL₅₀ до биологически значимой, не вызывающей гибели животных. Подопытные крысы разделялись по группам:

- 1) интактные крысы;
- 2) крысы с Ni интоксикацией без лечения;
- 3) крысы с Ni интоксикацией + L-аргинин (10 мг/кг, 30 дней); крысы с Ni интоксикацией + L-норвалин (10 мг/кг, 30 дней);
- 4) крысы с Ni интоксикацией + L-аргинин + L-норвалин (30 дней).

Выбор доз вводимых препаратов основывался на данных литературы – общепринятых и широко используемых. По завершении в гемолизате эритроцитов определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) [9]. Состояние АО системы судили по активности СОД [10]. Активность каталазы [11], концентрацию церулоплазмينا [12] и концентрацию суммарных метаболитов оксида азота (NOx) [13] определяли в сыворотке крови.

С помощью программы Microsoft Excel 2006 проводили статобработку результатов, представленных в виде среднего значения (Mean) и ошибки среднего (SEM).

Статистическую достоверность различий проверяли t-критерием Стьюдента, $p < 0,05$ считали уровнем статистической значимости. Провели корреляционный анализ.

Результаты исследования и их обсуждение

У интоксифицированных хлоридом никеля крыс повышается активность ПОЛ и увеличивается содержание вторичного продукта МДА в крови. Прямую корреляционную связь ($r = +0,57$, $p < 0,001$) показало исследование взаимосвязей между активностью ПОЛ в эритроцитах и концентрацией никеля в плазме крови на фоне экспозиции хлоридом никеля в течение месяца. Интенсивность процессов СРО ограничивает АОС организма: СОД, каталаза и ЦП. Поэтому мы определяли активность СОД в эритроцитах, а каталазы и ЦП в сыворотке крови. Активация липопероксидации обусловлена снижением активности СОД в эритроцитах у подопытных крыс с никелевой интоксикацией. Что касается каталазы, то происходит возрастание ее функциональной способности наряду с ЦП. Развивается окислительный стресс, который сопровождается снижением концентрации суммарных метаболитов NO. Наличие сильной отрицательной связи между увеличением МДА и снижением NOx в крови ($r = -0,72$) выявил корреляционный анализ. Нехватка L-аргинина, наличие ингибитора eNOS, снижение уровня экспрессии нитрооксидсинтазы, доступности NO и участие L-аргинина в орнитинном цикле – основные причины нарушения гомеостаза оксида азота. При систематической интоксикации хлоридом Ni впервые установлена активация окислительно-восстановительных процессов, сопровождающаяся понижением содержания NOx. Эти изменения содержания NO происходили на фоне достоверного повышения в эритроцитах концентрации МДА – вторичного продукта липопероксидации (таблица).

Биохимические показатели крови при затравке хлоридом никеля у крыс

	Контроль	NiCl ₂	NiCl ₂ + L-аргинин	NiCl ₂ + L-аргинин+ L-норвалин
МДА, эритроциты, нмоль/мл	4,41±0,06	5,49±0,049 ¹¹¹¹⁾	5,27±0,031 ²²²²⁾	4,95±0,045 ³³³³⁾ 4444) ⁵⁵⁵⁵⁾
СОД, эритроциты, ед. акт.	88,86±1,26	57,8±1,19 ¹¹¹¹⁾	60,3±0,31 ²⁾	64,80±1,29 ³³³³⁾ 444) ⁵⁵⁵⁵⁾
Каталаза, сыворотка крови, мкат/л	227,84±3,98	318,76±3,23 ¹¹¹¹⁾	310,05±2,67 ²⁾	271±2,15 ³³³³⁾ 4444) ⁵⁵⁵⁵⁾
Церулоплазмин, сыворотка крови, мг/л	343,86±7,14	401,4±1,27 ¹¹¹¹⁾	390,1±4,48 ²²⁾	367,8±3,45 ³³³³⁾ 4444) ⁵⁵⁵⁵⁾
NOx, сыворотка крови, мкМ	50,93±0,63	34,53±0,39 ¹¹¹¹⁾	40,13±0,13 ²²²²⁾	45,1±0,52 ³³³³⁾ 4444) ⁵⁵⁵⁵⁾

Примечания: ¹¹¹¹⁾ - $p < 0,001$; ¹¹¹⁾ - $p < 0,01$; ¹¹⁾ - $p < 0,02$; ¹⁾ - $p < 0,05$ достоверность хлорид никеля относительно

контроля;
²²²²) - $p < 0,001$; ²²²) - $p < 0,01$; ²²) - $p < 0,02$; ²) - $p < 0,05$ достоверность хлорид никеля относительно $\text{NiCl}_2 + \text{L-аргинин}$;
³³³³) - $p < 0,001$; ³³³) - $p < 0,01$; ³³) - $p < 0,02$; ³) - $p < 0,05$ достоверность хлорид никеля относительно $\text{NiCl}_2 + \text{L-аргинин} + \text{L-норвалин}$;
⁴⁴⁴⁴) - $p < 0,001$; ⁴⁴⁴) - $p < 0,01$; ⁴⁴) - $p < 0,02$; ⁴) - $p < 0,05$ достоверность $\text{NiCl}_2 + \text{L-аргинин}$ относительно $\text{NiCl}_2 + \text{L-аргинин} + \text{L-норвалин}$;
⁵⁵⁵⁵) - $p < 0,001$; ⁵⁵⁵) - $p < 0,01$; ⁵⁵) - $p < 0,02$; ⁵) - $p < 0,05$ достоверность контроль относительно $\text{NiCl}_2 + \text{L-аргинин} + \text{L-норвалин}$.

Корреляционный анализ показал, что содержание NO_x зависит от интенсивности СРО и увеличения содержания МДА. Уровень NO_x в этих условиях зависит от следующих факторов:

1) его реакции с супероксиданион-радикалом (O_2^-) с продуктом окисления, который называется пероксинитрит;

2) окислительного влияния супероксиданион-радикала O_2^- на ТГБП эндотелиальной NO-синтазы (eNOS);

3) угнетения уровня воспроизведения NOS-3 и нарушения тканевой функции энзима.

Ведущую роль в развитии дефицита NO и дисфункции эндотелия играет концентрация L-аргинина. В нормальных физиологических условиях его содержание составляет 45-150 мкмоль/л. Это зависит от различных причин и может варьировать. Доставка L-аргинина в эндотелиальные клетки зависит от состояния у-транспортера, связанного с мембраной клетки, и активности ферментов цикла синтеза мочевины, в частности аргиназы. По данным ряда авторов следует отметить, что во внутренней выстилке сосуда происходит реакция превращения L-аргинина в N^G -гидрокси-L-аргинин, и эта реакция ускоряется ферментом нитрооксидсинтазой [14]. Чем интенсивнее работает NO-синтаза, тем сильнее происходит выработка оксида азота, что предотвращает понижение его образования.

Возможность использования L-аргинина энзимом синтазой оксида азота определяли в отдельном варианте у экспериментальных животных, затравленных хлоридом никеля в течение 30 дней. Определяли по прошествии экспериментального времени концентрацию оксида азота и интенсивность системы ПОЛ - АОС. Систематизация результатов показала, что содержание NO_x у подопытных животных при систематической интоксикации хлоридом никеля под влиянием L-аргинина повысилось, а содержание конечного продукта липопероксидации понизилось сравнительно с уровнем при никелевой интоксикации. АОС активировалась, в частности СОД. Следовательно, L-аргинин обладает способностью у затравленных хлоридом никеля животных нормализовать активность АОС, а также устранить в ней расхождение и несоответствие. На фоне модифицированного L-аргинина в крови увеличиваются продукты СРО, а именно конечный результат - МДА. Полученные

результаты показали, что систематическая интоксикация тяжелым металлом (никель) вызывает угнетение АОС и повышение интенсивности липопероксидации. Эти изменения окислительно-восстановительных процессов в живой системе сопровождаются сниженным уровнем образования оксида азота и, соответственно, его содержания.

NO-синтаза в каждой субъединице содержит редуктазную и оксидазную домены, который в активном центре имеет гем. Взаимодействие между ними осуществляется путем транспорта электронов. С другой стороны, для активности энзима существенную роль играет кофактор тетрагидробиоптерин (BH₄).

При введении не только никеля, но и модифицированного L-аргинина имеет место нарушение внутренней молекулярной структуры eNOS. Двойная функция eNOS свидетельствует о том, что энзим способен образовывать не только оксид азота, но и АМК.

Таким образом, решающими факторами, поддерживающими стабильность NOx, являются не только субстрат - L-аргинин, но и уровень воспроизведения eNOS, который может ингибироваться АДМА.

Другим фактором сниженной продукции NO может быть использование L-аргинина в цикле синтеза мочевины, т.е. в результате активности аргиназы. В условиях ингибирования аргиназы – как фармакологического агента на фоне L-норвалина - происходит увеличение концентрации L-аргинина и, как следствие, оксида азота [15].

Результаты показали большую эффективность комплексной терапии на систему ПОЛ – АОС и содержание NOx. Данные показали, что комбинированная терапия L-аргинин + L-норвалин более значительно снижает интенсивность ПОЛ и содержание МДА в эритроцитах, а также корректирует взаимоотношения между ферментами АОЗ, способствует повышению концентрации суммарных метаболитов NO, уровень которых достигает контрольных значений сравнительно с монотерапией L-аргинином.

Заключение. Таким образом, полученные нами данные демонстрируют антиоксидантные и NO-стимулирующие свойства L-аргинина и L-норвалина на фоне никелевой интоксикации и участие L-аргинина в механизмах регуляции экспрессии eNOS, а L-норвалина – в ингибировании аргиназы и повышении оксида азота.

Положительное влияние на функциональную активность сосудистого эндотелия оказывали изучаемые вещества – L-норвалин и L-аргинин. Оно проявлялось усилением продукции оксида азота, что сопровождалось снижением внутриклеточного содержания Ca²⁺ и расширением сосудов микроциркуляции. Снижение уровня использования L-аргинина в орнитинном цикле в результате ингибирования фермента аргиназы потенцирует эти эффекты.

Следовательно, комплексная терапия препятствует снижению концентрации

суммарных метаболитов NO в крови. Это дает право рассматривать, что определяющую роль играет нормализация функции нитрооксидсинтазы.

Список литературы

1. Бурдин Н.В. Кобальт-никелевые арсенидные руды и проблемы биоэкологии / Н.В. Бурдин, В.В. Гребенникова, В.И. Лебедев и др. // Успехи современного естествознания. - 2008. - № 7. - С. 64-64.
2. Дзугкоев С.Г. Влияние L-аргинина и его комбинации с L-карнитином на метаболические и функциональные показатели дисфункции эндотелия в условиях интоксикации никеля хлоридом / С.Г. Дзугкоев, И.В. Можаяева, О.И. Маргиева и др. // Астраханский медицинский журнал. - 2017. - Т. 12. - № 1. - С. 44-49.
3. Албегова Ж.К. Состояние свободно-радикальных процессов у крыс при хронической интоксикации хлоридом никеля // Здоровье и образование в XXI веке: электронный научно-образовательный вестник. - 2012. - № 5. - Т. 14. – С. 51.
4. Коновалова Е.А. Коррекция эндотелиальной дисфункции комбинацией L-норвалина и мексидола / Е.А. Коновалова, Е.С. Черноморцева, М.В. Покровский и др. // Научные ведомости. Сер.: Медицина. Фармация. - 2012. - № 4 (123). - Вып. 17/1. – С. 175-181.
5. Покровская Т.Г. Роль фармакологической коррекции метаболического пути L-аргинин/NO при моделировании дефицита оксида азота // Кубанский научный медицинский вестник. - 2008. - № 4. - С. 122-125.
6. Покровский М.В. Эндотелиопротективные эффекты L-аргинина при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.И. Кочкаров, Е.Б. Артюшкова // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2008. - Т. 71, № 2. - С. 29-31.
7. Якушев В.И. Аргиназа – новая мишень для фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции / В.И. Якушев, М.В. Покровский, М.В. Корокин и др. // Научные ведомости. Сер.: Медицина. Фармация. - 2012. - № 22 (141). - Вып. 20/3. – С. 36-40.
8. Локтионова И.Л. Состояние функции сосудистого эндотелия при инфекционной патологии различной этиологии / И.Л. Локтионова, М.В. Покровский, В.А. Рагулина и др. // Научные ведомости. Сер.: Медицина. Фармация. - 2012. - № 4 (123). - Вып. 17/1. – С. 20-31.
9. Asakawa T. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides / T. Asakawa, S. Matsushita // Lipids. - 1980. - Vol. 15. - P. 137-140.
10. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской

химии. - 1999. - № 3. - С. 263-272.

11. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторное дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.

12. Камышников В.С. Определение содержания (активности) церулоплазмينا // Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – 3 е изд. – М.: МЕД пресс информ, 2009. – С. 446.

13. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. - № 6. – С. 15-18.

14. Локтионова И.Л. Состояние функции сосудистого эндотелия при инфекционной патологии различной этиологии / И.Л. Локтионова, М.В. Покровский, В.А. Рагулина и др. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер.: Медицина. Фармация. - 2012. - Т. 17. - № 4-1 (123). - С. 20-31.

15. Соболев М.С. Изучение влияния L-норвалина, розувастатина и их комбинации на уровень микроциркуляции в костной ткани при экспериментальном остеопорозе и переломах на его фоне / М.С. Соболев, О.С. Гудырев, П.П. Ремизов и др. // Научные ведомости. - Сер. Медицина. Фармация. - 2014. - № 11 (182). - Вып. 26. - С. 146-149.