

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОРРЕКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИОКСИДАНТА КОЭНЗИМА КОМПОЗИТУМА

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

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

Никелевая интоксикация, вызванная в ходе эксперимента введением хлорида никеля 0,5 мг/кг массы тела парентерально крысам линии Wistar, приводит к образованию активных форм кислорода, атака которых вызывает перекисное окисление липидов в мембранах эритроцитов и гомогенатах почечной ткани. Липопероксидация и ее метаболиты приводят к угнетению активности супероксиддисмутазы, нарушению продукции и биодоступности оксида азота, что в дальнейшем влечет развитие дисфункции эндотелия, снижение скорости микроциркуляторной гемодинамики. На фоне этих нарушений выявляется повреждение цитоплазматических мембран структур нефрона, о чем свидетельствует снижение активности фермента цитоплазматической мембраны, ответственного за трансмембранный АТФ-зависимый перенос Na^+ и K^+ в клетках в корковом и мозговом слоях почечной ткани. Показана эффективность убихинон композитума на кровоток в микроциркуляторных сосудах, липопероксидацию, функциональное состояние Na -насоса, продукцию суммарных метаболитов оксида азота и на липопротеиновые фракции холестерина при никелевой интоксикации. Следует отметить, что под влиянием коэнзима композитума восстановление окислительно-восстановительной активности вызвало повышение NO-продуцирующей функции эндотелиальной NO-синтазы и, соответственно, возрастание концентрации оксида азота. С другой стороны, антиоксидантное действие препарата способствовало снижению содержания общего холестерина, восстановлению взаимодействия липопротеинов низкой плотности с рецепторами и утилизации холестерина клетками тканей.

Ключевые слова: соли никеля, NO (оксид азота), липопероксидация, антиокислительная защита клетки, нарушение функции эндотелия, аминоксидин-аминокислота, липопротеины, убихинон композитум.

BIOCHEMICAL MARKERS OF THE EFFECTIVENESS OF THE CORRECTION OF REDOX POTENTIAL AND ENDOTHELIAL FUNCTION USING THE ANTIOXIDANT COENZYME COMPOSITUM

Dzugkoev S.G., Dzugkoeva F.S., Margieva O.I., Mozhaeva I.V.

Institute of Biomedical Research - Branch of the Federal State Budget Institution of Science of the Federal Scientific Center "Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Vladikavkaz, e-mail: dzugkoevaf@mail.ru

Nickel intoxication caused during the experiment by the administration of 0.5 mg / kg nickel chloride parenteral to Wistar rats leads to the formation of reactive oxygen species, the attack of which causes lipid peroxidation in erythrocyte membranes and renal tissue homogenates. Lipoperoxidation and its metabolites inhibit the activity of superoxide dismutase, impaired production and bioavailability of nitric oxide, which subsequently leads to the development of endothelial dysfunction, and a decrease in the rate of microcirculatory hemodynamics. Against the background of these disorders, damage to the cytoplasmic membranes of the nephron structures is revealed, as evidenced by a decrease in the activity of the enzyme of the cytoplasmic membrane, responsible for the transmembrane ATP-dependent transfer of Na^+ and K^+ in cells in the cortical and brain layers of renal tissue. The effectiveness of the ubiquinone compositum on blood flow in microcirculatory vessels, lipoperoxidation, the functional state of the Na pump, production of total nitric oxide metabolites and on lipoprotein fractions of cholesterol in nickel intoxication has been shown. It should be noted that, under the influence of the coenzyme of the compositum, the restoration of redox activity caused an increase in the NO-producing function of endothelial NO-synthase and, accordingly, an increase in the concentration of nitric oxide. On the other hand, the antioxidant effect of the drug helped to reduce total cholesterol, restore the interaction of LDL with receptors and the utilization of cholesterol by tissue cells.

Keywords: nickel salts, NO, lipid peroxidation, antioxidant cell defense, endothelial dysfunction, amino-guanidine-amino acid, lipoproteins, ubiquinone compositum.

Формирование многих патологий, таких как сахарный диабет, интоксикационный синдром, сопряжено с развитием окислительного стресса. Неблагоприятная экологическая обстановка вообще, и в нашем регионе в частности, представляет серьезную опасность для здоровья населения [1; 2]. Ионы цветных металлов поступают перорально через органы дыхания и наружные покровы. Повышенные концентрации никеля обладают мутагенными, аллергическими свойствами, вызывают образование АФК (активных форм кислорода) и онкопатологию. Чрезмерное поступление в организм никеля, кадмия, кобальта индуцирует свободнорадикальное окисление липидов, что способствует развитию дисфункции эндотелия в результате повреждения мембранных структур клеток сосудистой стенки [3]. На фоне влияния солей тяжелых металлов повреждается нитрооксидпродуцирующая функция эндотелия сосудов. Особое внимание в этом плане привлекает оксид азота (NO), как молекула - посредник реагирования клеток органов. Продуцируется оксид азота клетками эндотелия сосудов из L-аргинина с участием фермента NO-синтазы [4]. Различают 2 изоформы NOS - конститутивные: эндотелиальная - eNOS (NOS-3) и нейрональная nNOS (NOS-1), активность которых является Ca-зависимой. Помимо этих двух видов, существует индуцибельная - iNOS (NOS-2), активируемая эндотоксинами и провоспалительными цитокинами [5; 6]. Поскольку основным субстратом синтеза NO является L-аргинин, то представляется интересным вопрос о биодоступности субстрата к eNOS, факторы, влияющие на этот процесс, а также влияние L-аргинина и его модифицированного производного L-NAME (NG-нитро-L-аргинин метиловый эфир) на продукцию оксида азота. Выяснение маркеров эндотелиальной дисфункции, которая сопровождается нарушением баланса между вазоконстрикцией и вазодилатацией, представляет научный интерес. В связи с изложенным не менее важной является разработка способов коррекции.

Цель исследования: выявление биохимических маркеров, свидетельствующих о механизмах нарушения окислительно-восстановительных процессов в условиях действия экопатогенных факторов и разработка способа их коррекции.

Материал и методы исследования. Подопытные биологические объекты (крыс подбирали по массе и возрасту) состояли из 5 групп: 1-я - контрольная, 2-я - с моделью никелевых ангиопатий в дозе 0,5 мг/кг веса животного, 30 дней парентерально, 3-я и 4-я группы - введение L-NAME (25 мг/кг) интактным и интоксифицированным крысам, 5-я группа - введение коэнзима композитума (10 мг/кг, 30 дней) на фоне интоксикации хлоридом никеля. Экспериментальные исследования соответствовали требованиям проведения работ с использованием экспериментальных животных и условиям Хельсинкской декларации. В работе определяли: интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах, гомогенатах ренальной ткани по концентрации диальдегида малоновой кислоты (МДА) на

фотоэлектроколориметре (ФЭК) по методу Asacawa; состояние антиокислительной защиты клеток (АОЗ) - по активности каталазы (метод Королюка М.И) и супероксиддисмутазы (СОД) по аутоокислению адреналина, концентрацию церулоплазмина (ЦП) в сыворотке по методу Равина. Активность натриевого насоса в ткани почек - методом Scou TC (1957). Содержание в плазме крови суммарных конечных метаболитов оксида азота (NO_x) определяли с реактивом Грисса. С целью выявления предатерогенных изменений в сосудистой системе изучали метаболизм холестерина: общий холестерин (ХС), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерин липопротеинов низкой плотности ХС ЛПНП, триацилглицериды (ТАГ).

Для выявления достоверности показателей использовали программы статанализа Statistika 6.0 и Microsoft Office Excel.

Результаты исследования и их обсуждение. Избыточные концентрации ионов никеля в плазме крови и выделение почками при регулярном введении регенерируют активные радикалы, стимулирующие ПОЛ в красных кровяных клетках, а также во внутренних органах. Маркером этих изменений является повышение содержания альдегида малоновой кислоты в клетках крови, коркового и мозгового вещества ренальной ткани.

Свое участие в развитие окислительного стресса вносит нарушение ферментативной составляющей антиокислительной системы (АОС) организма. Она обеспечивается СОД, глутатионредуктазой и пероксидазой. Второй линией антиоксидантной защиты является каталаза, оксидоредуктаза, расщепляющая пероксид на молекулу кислорода и воды. Церулоплазмин в плазме крови выполняет антиоксидантную функцию. Наши данные показали снижение активности СОД в эритроцитах на 65% и повышение активности каталазы и ЦП на 39% и 16,7% соответственно, как проявление компенсаторной реакции организма. Эти данные идут в унисон со сведениями литературы, свидетельствующими об индуцировании ионами тяжелых металлов процесса ПОЛ [3].

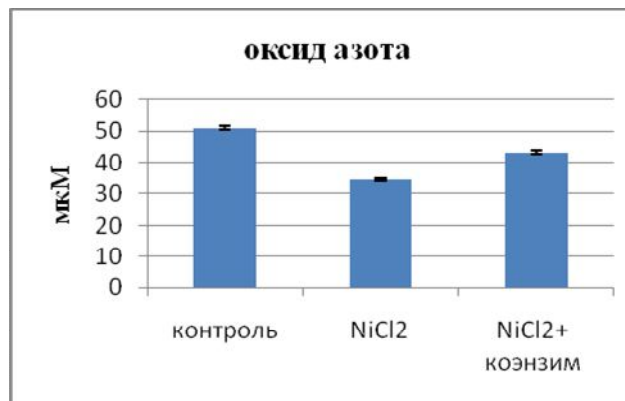
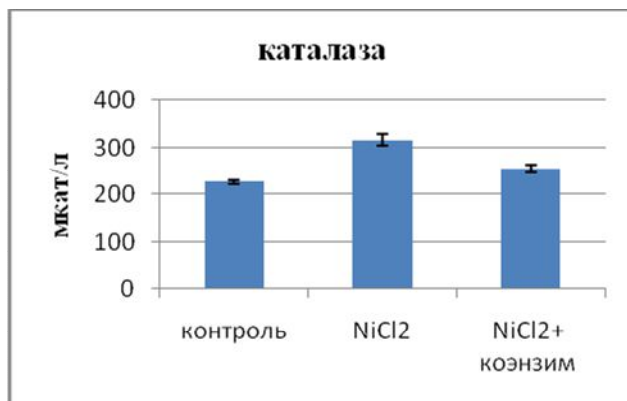
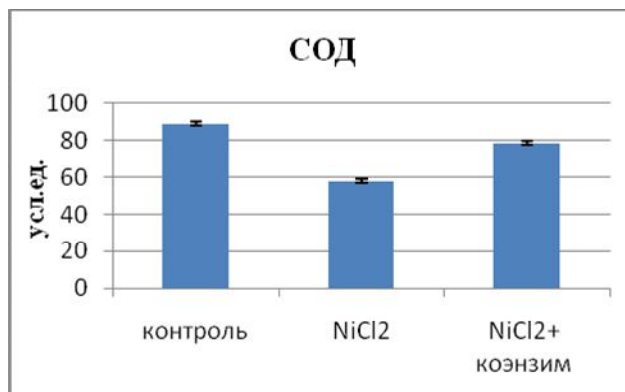
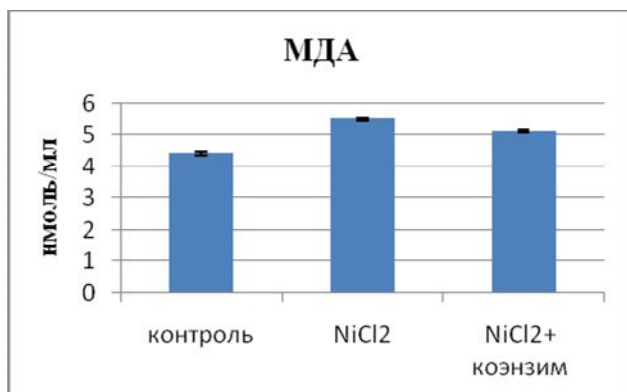
Образующийся супероксид-анион радикал взаимодействует с оксидом азота, что способствует снижению концентрации в сыворотке крови суммарных метаболитов NO. При этом образуется сильный окислитель - пероксинитрит. Важную роль играет путь передачи сигнала от L-аргинина к NO, т.е. механизм транспорта L-аргинина к эндотелиальной NO-синтазе и нарушение экспрессии eNOS [7]. В этом плане одной из возможных причин препятствия транспорту L-аргинина к эндотелиальной NO-синтазе могут быть метаболические изменения, в частности обмена холестерина. Повышенное содержание холестерина в сыворотке крови является фактором риска развития атеросклероза в эндотелии сосудов. Более того, следует заметить, что в этом процессе важную роль играют ЛПНП. В наших исследованиях при систематической интоксикации хлоридом никеля отмечается

гиперхолестеринемия и гипер- β -липопротеинемия при снижении ХС ЛПВП. Принимая во внимание условия окислительного стресса, предатеросклеротическое поражение (липоидоз) в интиме развивается при неконтролируемом захвате циркулирующих в кровяном русле холестеринсодержащих ЛПНП клетками стенки сосудов, в результате чего образуются богатые липидами «пенистые клетки». Окислительной модификации подвергаются фосфолипиды наружного слоя ЛПНП, так как в крови имеется большое количество индукторов окисления: кислород, ионы железа, гемопротеиды. В процессе окисления ЛПНП первичные продукты - липопероксиды в результате окислительной деструкции продуцируют α -оксоальдегиды, подобные МДА. Альдегидные группы МДА способны легко реагировать с Σ -аминогруппами аргинина в апопротеине В100 частиц ЛПНП. Происходит окислительная модификация белковой молекулы, она реагирует со «скэвинджер» рецепторами фагоцитов, обеспечивая более эффективный захват липопротеиновых частиц с образованием «пенистых клеток». Одновременно с этим происходит угнетение аффинности ЛПНП к собственным рецепторам, что поддерживает повышенное содержание холестерина в крови. Следует подчеркнуть, что эти изменения в метаболизме холестерина препятствуют транспортному механизму. Помимо этого фактора, на содержание оксида азота может оказывать влияние сам субстрат L-аргинин и его модифицированное производное L-NAME. Возможность использования L-аргинина NO-синтазой определяли в другом варианте исследований на фоне экспозиции хлоридом никеля в течение 30 дней. Результаты показали антиоксидантные свойства аминокислоты по данным снижения содержания МДА в крови. Адаптивная система в условиях снижения интенсивности ПОЛ показала повышение активности СОД и снижение уровня каталазы и ЦП (рис.). Эти изменения способствовали повышению концентрации NO на фоне L-аргинина в токсических условиях. Модифицированный L-аргинин - L-NAME показал противоположные результаты: повышение интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) при ингибировании АОС, что сопровождалось более выраженным снижением концентрации NO сравнительно с уровнем при интоксикации. Наряду с этим L-аргинин оказал позитивное влияние на липопротеиновые фракции, способствуя нормализации в обмене холестерина, одновременно улучшал биодоступность аминокислоты к eNOS. При введении L-NAME животным в токсических условиях отмечались противоположные аргинину результаты, сопровождающиеся более значительным снижением уровня оксида азота.

У экспериментальных животных в хронической стадии интоксикационного синдрома гемодинамические изменения в сосудах почек приводили к повышенному выделению с мочой калия и натрия. Причиной этих изменений было нарушение фильтрационно-реабсорбционных процессов, для выяснения которых определяли функцию фермента АТФ-

азы, активируемой Na и K в гомогенатах почечной ткани. У подопытных животных с интоксикационным синдромом выявлено достоверное понижение активности функционального состояния Na^+/K^+ -АТФ-азы в корковом и мозговом веществе ренальной ткани относительно контроля ($p < 0,001$) на 64,4% и 64,6% соответственно. Наибольшее нарушение функции энзима выявлено в наружном мозговом веществе почек. Это связано с нахождением в нем толстого отдела восходящей части петли Генле. Именно в мозговом веществе почек функционирует Na-насос. Изменения физико-химических свойств фосфолипидов цитоплазматической мембраны канальцев почек в условиях окислительного стресса, в частности активности ПОЛ, может изменять молекулярные структуры и активность встроенной транспортной Na^+/K^+ -АТФ-азы. Действительно, в эксперименте нами было установлено угнетение функциональной способности энзима и показано наличие обратной взаимосвязи между содержанием МДА и активностью Na^+/K^+ -АТФ-азы в корке ($r = -0,8$) и медулле ренальной ткани ($r = -0,75$).

С целью коррекции негативного влияния интоксикационного синдрома на метаболические нарушения подавали коэнзим композитум длительностью один месяц. В состав этого препарата входит витамин E и коэнзим Q. Применяя его, мы исходили из следующих представлений: витамин E обладает способностью предотвращать окислительный стресс и нарушение липидной фазы цитоплазматических мембран. Восстановленная форма α -токоферола образуется с участием гидрофобного начала - убихинола. Сам по себе убихинол (QH_2) является восстановленной формой убихинона (UQ), т.е. коэнзима Q_{10} . Это активный антиоксидант, предотвращающий ПОЛ липидов мембран. Будучи в составе Q-цикла, происходят окислительно-восстановительные реакции в цепи переноса электронов, что и обеспечивает его регенерацию. Он же поддерживает и α -токоферол в восстановленной форме. Синтез коэнзима Q_{10} осуществляется из аминокислоты тирозина при участии кофакторов из витаминов группы B и микроэлементов, а боковая углеводородная цепь образуется из мевалоната - промежуточного предшественника синтеза холестерина. С другой стороны, убихинон индуцирует энергообразование и угнетение супероксид-анион радикала (O_2^-) в реакции сукцинатдегидрогеназы. Все эти метаболические изменения позитивного характера являются показателем его эффективности в ингибировании липопероксидации. Полученные результаты демонстрируют снижение интенсивности ПОЛ по данным содержания МДА в красных кровяных клетках крови, корковом и мозговом веществе ренальной ткани под влиянием коэнзима композитума.



Влияние коэнзима композитума на систему ПОЛ - АОС и содержание оксида азота при интоксикации хлоридом никеля

С целью изучения вопроса, насколько эффективно влияние препарата на ферментативную составляющую АОЗ, изучали взаимосвязь между активностью ПОЛ и дисмутазной реакцией (СОД), что показало обратную связь ($r=-0.46$; $p<0.01$). Этому способствовало повышение активности адаптивных энзимов АОС. Анализ показал восстановление реакции дисмутации супероксид-анион радикала, которая достигла уровня контроля.

Следовательно, данные показывают регулирующее влияние коэнзима композитума на интенсивность тканевого дыхания, ингибирование образования активных метаболитов кислорода, что и способствует образованию энергии АТФ. Коэнзим композитум оказал позитивное влияние и на NO-продуцирующую функцию эндотелия сосудов. На фоне нормализации окислительно-восстановительного потенциала происходит индуцирование продукции оксида азота, и его концентрация на фоне терапии значительно возрастает (рис.). Такой эффект коэнзима композитума может быть обусловлен повышением доступности субстрата синтеза для eNOS. В этом механизме действия позитивную роль сыграла положительная динамика в обмене холестерина, которая происходит по принципу конкурентного ингибирования синтеза холестерина. На фоне введения подопытным животным с интоксикацией тяжелым металлом коэнзима композитума отмечено также

повышение функциональной способности Na^+/K^+ -АТФ-азы как в корковом, так в мозговом слоях почек соответственно на 27,3% и 30,13% вследствие адекватности окисления в цепи переноса электронов.

Следовательно, используемый в эксперименте препарат коэнзим композитум оказал положительное влияние на функцию сосудистого эпителия, что подтверждается повышением содержания оксида азота - как вазодилатора в крови у животных с интоксикационным синдромом, получавших этот препарат в течение месяца. На фоне лечения коэнзимом композитумом коррекция дисфункции эндотелия сопровождалась достоверным улучшением микроциркуляции в сосудах почек вследствие повышения содержания вазодилатора в крови на фоне антиоксиданта.

Заключение. Окислительный стресс при систематической интоксикации хлоридом никеля приводит к недостатку основного вазодилатора – NO, вследствие дефицита и снижения биодоступности L-аргинина, необходимого для образования оксида азота. В механизмах нарушения транспорта субстрата синтеза NO играет роль гиперхолестеринемия и гипер- β -липопротеинемия. Активные формы кислорода вызывают окислительную модификацию фосфолипидов и апопротеина В100, что способствует большей их атерогенности. С другой стороны, образующийся оксид азота, реагируя с активными радикалами, играет роль антиоксиданта и препятствует негативным изменениям в артериолах и капиллярах. Показателем эффективности данного антиоксиданта является ингибирование липопероксидации, повышение NO-образующей функции и дилатация мелких сосудов органов, включая почки. Кроме этого, на фоне применения коэнзима композитума происходит нормализация молекулярной структуры фосфолипидов клеточных мембран канальцев почек, адекватное восстановление кислорода в цепи переноса электронов и энергообразования, как активирующий фактор для фермента Na^+/K^+ -АТФ-азы. Следовательно, на фоне введения коэнзима композитума снижаются проявления микрососудистых осложнений интоксикационного синдрома, включая вазоренальную патологию.

Список литературы

1. Хабриева Р.У. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: учебник / Под. ред. Р.У. Хабриева, Н.И. Калетиной. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2010. 752 с.
2. Зайцева Н.В., Май И.В., Клейн С.В. К вопросу установления и доказательства вреда здоровью населения при выявлении неприемлемого риска, обусловленного факторами среды обитания // Анализ риска здоровью. 2013. № 2. С. 14–26.

3. Албегова Ж.К., Брин В.Б., Молдован Т.В., Закс Т.В. Влияние хронической интоксикации хлоридом никеля на морфологические изменения внутренних органов и накопление металла у крыс // Вестник новых медицинских технологий. 2011. Т. XII. №1. С. 160–161.
4. Каде А.Х., Занин С.А., Губарева Е.А., Туровая А.Ю., Богданова Ю.А., Апсаямова С.О., Мерзлякова С.Н. Физиологические функции сосудистого эндотелия // Фундаментальные исследования. 2011. № 11-3. С. 611-617
5. Пожилова Е.В., Новиков В.Е. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2015. №4. С. 35-41.
6. Локтионова И.Л., Покровский М.В., Рагулина В.А. и др. Состояние функции сосудистого эндотелия при инфекционной патологии различной этиологии // Научные ведомости. Сер.: Медицина. Фармация. 2012. № 4 (123). Вып. 17/1. С. 20-31.
7. Дзугкоев С.Г., Можаяева И.В., Отиев М.А., Маргиева О.И., Дзугкоева Ф.С. Влияние L-карнитина, афобазола и их комбинации с L-аргинином на биохимические и гистологические показатели дисфункции эндотелия при кобальтовой интоксикации у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015. Т. 59. № 2. С. 70-75.