

## ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА НА ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ИНТОКСИКАЦИОННОМ СИНДРОМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Можаева И.В., Маргиева О.И.

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

Кобальт, являясь экотоксикантом, проникая в клетки внутренних органов и тканей человека, приводит к патологическим нарушениям в сосудистой системе. При этом происходит процесс повреждения клеток организма, который способствует формированию окислительного стресса, а активные формы кислорода (АФК) и метаболиты перекисления липидов вызывают нарушения функциональной активности эндотелия в процессе образования оксида азота. Развивается дисфункция эндотелия, патогенетическим звеном которой является уменьшение концентрации вазодилатирующего фактора - оксида азота (NO). Основным субстратом в процессе образования NO служит окисление аминокислоты L-аргинина под влиянием фермента NO-синтазы с синтезом аминокислоты цитруллина. Исходя из вышеизложенного в эксперименте на фоне кобальтовой интоксикации было изучено влияние L-аргинина на биохимические показатели функции эндотелия. Установлено, что негативное влияние АФК и продуктов окислительной деградации липидов вызвало нарушение функции эндотелия, признаками которого были повышение концентрации диальдегида малоновой кислоты и уменьшение содержания стабильных метаболитов оксида азота. Рассматривая L-аргинин как субстрат синтеза NO, мы исследовали его влияние на механизм повышения концентрации NO. Полученные в ходе эксперимента результаты показали, что введение L-аргинина воздействовало на повышение продукции оксида азота, что положительно сказалось на функции эндотелия и привело к устранению рассогласования в системе ПОЛ - АОС.

Ключевые слова: хлорид кобальта, ПОЛ, АОС, оксид азота, интоксикационный синдром, L-аргинин.

## EFFECT OF L-ARGININE ON ENDOTHELIAL FUNCTION IN INTOXICATION SYNDROME IN EXPERIMENT

Mozhaeva I.V., Margieva O.I.

*Institute for 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*

Cobalt, being an ecotoxicant, penetrating into the cells of human internal organs and tissues, leads to pathological disorders in the vascular system. In this case, there is a process of damage to body cells, which contributes to the formation of oxidative stress, and ROS and lipid peroxidation metabolites cause disturbances in the functional activity of the endothelium in the formation of nitric oxide. Endothelial dysfunction develops, the pathogenetic link of which is a decrease in the concentration of vasodilatory factor - nitric oxide. The main substrate in the process of NO formation is oxidation of the amino acid L-arginine under the influence of the enzyme NO synthase with synthesis of the amino acid citrulline. Based on the above, the effect of L-arginine on biochemical parameters of endothelial function was studied in the experiment against the background of cobalt intoxication. It was found that the negative effect of ROS and products of oxidative degradation of lipids caused endothelial function disorders, the signs of which were increased concentration of malonic acid dialdehyde and decreased content of stable nitric oxide metabolites. Considering L-arginine as a substrate of NO synthesis, we investigated its effect on the mechanism of increased NO concentration. The results obtained in the experiment showed that the introduction of L-arginine influenced the increase in nitric oxide production, which had a positive effect on endothelial function, leading to the elimination of mismatch in the LPO - AOS system.

Keywords: cobalt chloride, lipid peroxidation, antioxidant system, nitric oxide, intoxication syndrome, L-arginine.

Загрязнение окружающей среды многие годы является глобальной проблемой общества, актуальность которой в последние годы только возрастает. Из атмосферы соли тяжелых металлов проникают в организм человека через волосы, участки кожных покровов, слизистые, при дыхании и с пищей. Такие представители тяжелых металлов, как железо, медь, цинк, молибден, кобальт, в малых количествах являются микроэлементами, необходимыми

для функционирования организма человека, и принимают участие в биологических процессах [1, 2]. В частности, кобальт является составной частью витамина В<sub>12</sub>, а также кофактором определенных ферментов и влияет на процессы образования форменных элементов крови, на метаболизм углеводов и липидов. Он участвует в синтезе некоторых аминокислот, имеет большое значение для нормального протекания биохимических процессов [3]. При этом соли тяжелых металлов способны накапливаться в тканях, оказывая токсическое влияние на организм человека, и могут вызывать мутации, аллергические реакции, образование активных форм кислорода (АФК), предполагают развитие онкопатологии [2]. Кобальт, являясь экотоксикантом, проникает в клетки внутренних органов и тканей человека и приводит к патологическим изменениям в сосудистой системе. В больших дозах он остроотоксичен, и в тест-системах *in vitro* у млекопитающих ионы кобальта вызывают структурно-функциональные изменения клеток и апоптоз, а при максимальных концентрациях - воспалительные реакции с последующим некрозом. Накапливается кобальт чаще всего в сердце, печени, почках, поджелудочной железе, и со временем его сравнительное содержание в скелетных мышцах, в скелете растет. Кобальт оказывает токсическое воздействие на клеточный генетический материал, реактивные формы кислорода вызывают окислительное повреждение ДНК, возможно, в сочетании с ингибированием процесса восстановления нативной структуры ДНК [4]. В результате окислительных реакций происходит процесс повреждения клеток организма, приводящий к активации окислительного стресса, при этом продукты метаболизма липопероксидации нарушают функцию эндотелия - выработку оксида азота (NO) и, соответственно, уменьшение концентрации NO - эндогенного релаксирующего фактора. Нарушение функции эндотелия может быть вызвано недостаточным количеством L-аргинина, а также присутствием эндогенных ингибиторов L-аргинина. Эта вероятность дает основание полагать, что поступление L-аргинина может привести к улучшению эндотелиальной функции. Данными исследований доказано, что L-аргинин благотворно действует на тонус кровеносных сосудов, который зависит от функциональной способности эндотелия. Оксид азота играет роль вторичного посредника, является мощной релаксирующей и противовоспалительной сигнализирующей молекулой, которая принимает участие в обеспечении сосудистого гомеостаза. NO, продуцируемый эндотелиальными клетками, служит критическим регулятором этого баланса, так что снижение способности вырабатывать оксид азота и чувствительности к нему проявляется как эндотелиальная дисфункция. Оксид азота вырабатывается эндотелиальными клетками за счет активности конститутивной синтазы оксида азота (cNOS). Клетки гладкой мускулатуры генерируют NO с помощью индуцибельной изоформы NOS (iNOS). NO регулирует тонус сосудов, различные механизмы, участвующие во взаимодействии клеток

крови со стенкой сосудов, рост гладкомышечных клеток и синтез белков матрикса. Отсутствие эндотелий-зависимой вазодилаторной реакции было определено как эндотелиальная дисфункция, которая занимает центральное место во многих патофизиологических процессах. Основным фактором в процессе образования NO является окисление аминокислоты L-аргинина под влиянием фермента NO-синтазы с синтезом аминокислоты цитруллина (рис. 1).

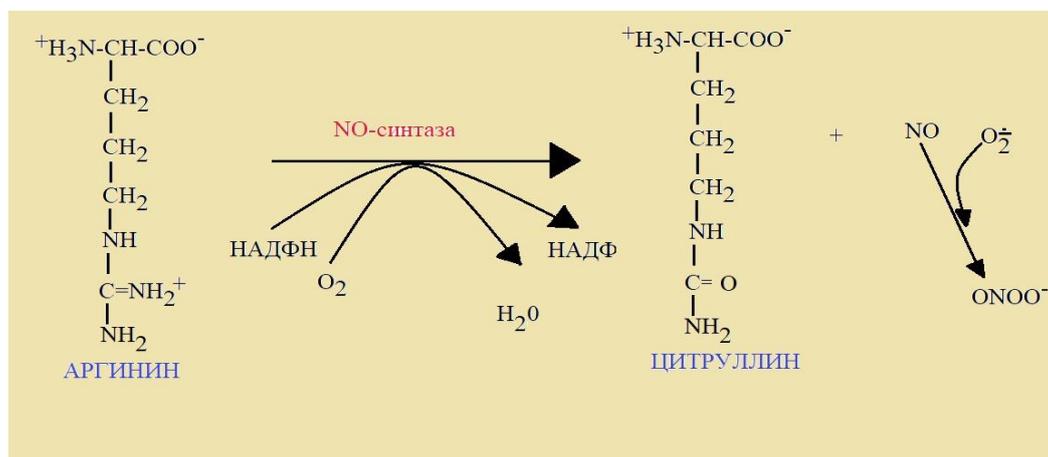


Рис. 1. Синтез оксида азота

Процесс сложен и катализируется NO-синтазой (NOS), кофакторами в реакции выступают НАДФН, тетрагидробиоптерин, ФАД и ФМН. NO, синтезированный из L-аргинина, может влиять на факторы ангиогенеза, проницаемость сосудов, рекрутирование периваскулярных клеток, ремоделирование и созревание сосудов. Кроме того, путь L-аргинин - NO может активировать широкий спектр генов, которые функционально вовлечены в пролиферацию, метастазирование и апоптоз. Нарушение работы эндотелиальной NO-синтазы и, в свою очередь, снижение продукции NO можно рассматривать как дефицит ее важнейшего компонента — L-аргинина. Как известно, эту условно незаменимую аминокислоту организм получает в необходимом количестве; помимо этого, она непосредственно синтезируется в самом организме. «Метаболизм L-аргинина в клетках протекает двумя путями: посредством аргиназы гидролизуется в орнитин и мочевину; в NO и цитруллин катализируется NO-синтазой» [5]. Данными исследований установлено, что «ингибирование аргиназы способствует увеличению продукции NO и предотвращению дисфункциональных нарушений в эндотелии» [5]. «Повышение концентрации L-аргинина в эндотелиальных клетках сопровождается усиленным образованием промежуточного продукта метаболизма аргинина - N-гидрокси-L-аргинина, облегчающего процесс окисления аргинина NO-синтазой, а также тормозящего активность аргиназы» [5]. Поскольку L-аргинин является основным субстратом синтеза NO, то представляется интересным вопрос о его влиянии на продукцию оксида азота.

Цель исследования - в условиях модельного эксперимента с экспозицией хлорида кобальта исследовать действие L-аргинина на функцию эндотелия.

### **Материалы и методы исследования**

Опыты на экспериментальных крысах выполнены в рамках плановой НИР и соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 755). Объектом проведенного эксперимента были крысы-самцы линии Wistar (возрастная группа 10-14 месяцев, масса 230-260 г, n=75). В соответствии с поставленной целью они были распределены по группам:

- 1) интактные крысы - контрольная группа (n=25);
- 2) животные, которым хлорид кобальта ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) вводили парентерально, доза 2 мг/кг веса животного (n=25);
- 3) животные, которым хлорид кобальта и L-аргинин (Ajinomoto, Япония) вводили внутримышечно в дозе 10 мг/кг (n=25).

Эксперимент продолжался 1 месяц, по окончании в гемолизате эритроцитов для оценки оксидативного стресса исследовали концентрацию малондиальдегида (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой, активность супероксиддисмутазы (СОД) - методом измерения количества образующегося адrenoхрома. По завершении эксперимента в сыворотке крови подопытных животных определяли: каталазную активность методом М.И. Королюка, концентрацию медьсодержащего белка церулоплазмينا - методом Равина, уровень суммарных метаболитов NO (NOx) - модифицированным скрининг-методом В.А. Метельской. При проведении исследований использовали цифровой спектрофотометр PD - 303 («Arel Co., Ltd.», Япония).

Для обработки полученных в ходе исследования статистических данных применяли пакет программ Microsoft Excel. Для характеристики показателей вариационных рядов были использованы следующие характеристики: средняя величина (M), стандартная ошибка среднего (SEM). При проверке статистических гипотез уровень значимости (p) составлял менее 0,05. Проверку достоверности различий у сравниваемых показателей между двумя группами животных проводили, используя t-критерий Стьюдента.

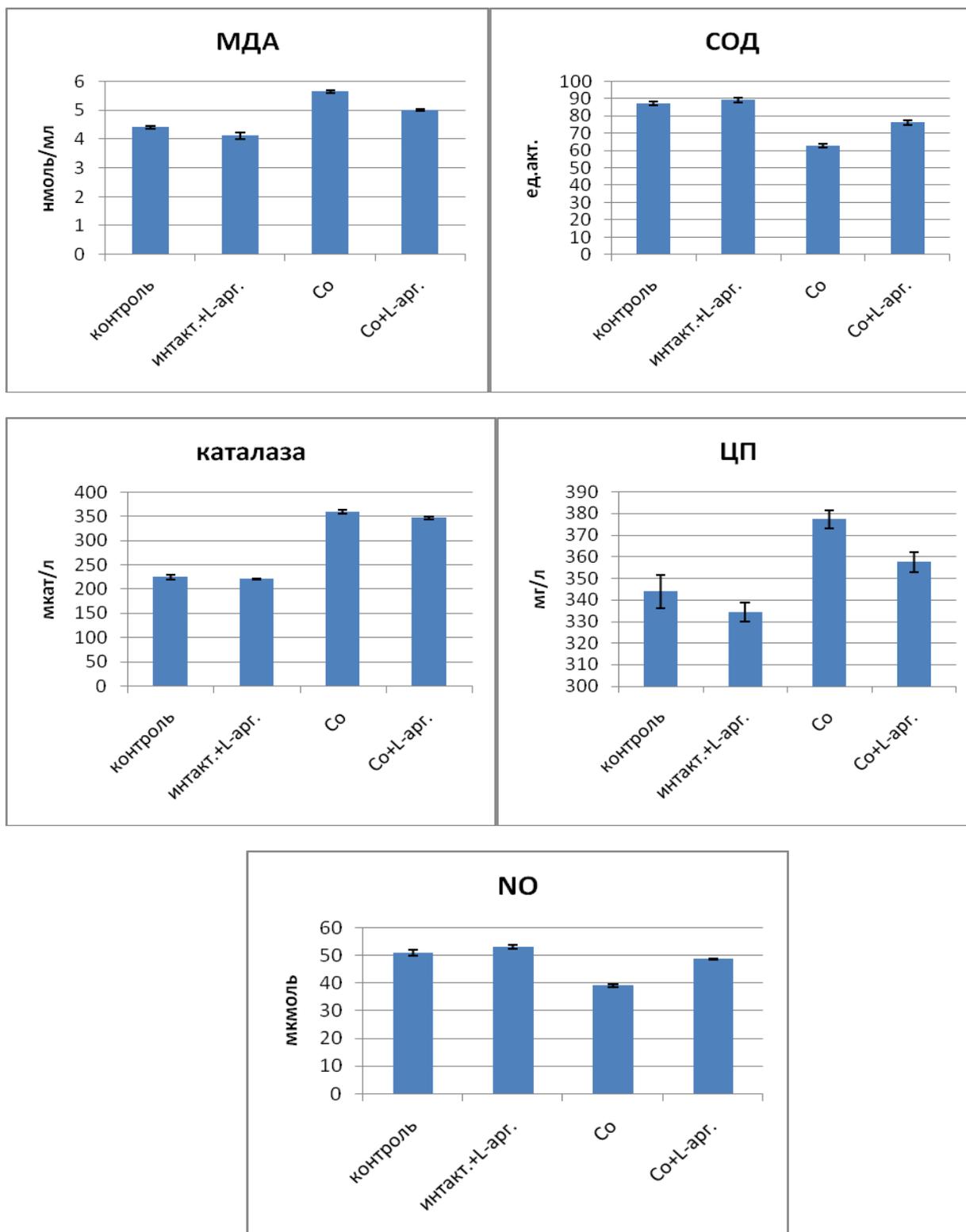
### **Результаты исследования и их обсуждение**

Для адекватного функционирования живого организма кобальт необходим как один из важных микроэлементов, он является составным элементом витамина  $\text{B}_{12}$ , который в многочисленных химических реакциях выполняет функцию кофактора, но даже незначительное повышение его количества оказывает токсическое действие. Токсичность кобальта, прежде всего, определяется наличием неспаренного электрона на внешней орбитали

атома, что позволяет реагировать с высокой скоростью с  $O_2$ , а также с ПНЖК. Образующиеся при этом АФК инициируют окислительный процесс, и происходит угнетение АОС клеток. Экспериментально установлено, что у подопытных животных на фоне введения  $CoCl_2$  развился процесс липопероксидации, подтверждением чего явилось повышение концентрации вторичного продукта ПОЛ - МДА - в мембранах эритроцитов. На фоне липопероксидации происходило снижение активности СОД, вместе с тем активность каталазы, разлагающей перекись водорода на молекулу воды и кислород, и концентрация церулоплазмينا повышались. «Разнонаправленные изменения активности ферментов АОС СОД и каталазы можно объяснить структурной особенностью молекул. В молекуле каталазы присутствует 4 группы гема, поэтому каталаза оказывается наиболее устойчивой к активным метаболитам кислорода» [6]. «В отличие от этого в структуре СОД имеются восприимчивые к модификации кислородными радикалами остатки таких аминокислот, как гистидин, аргинин и др.» [6].

Можно предположить, что «пероксид водорода в условиях токсического воздействия тяжелыми металлами вызывает частичную инактивацию СОД и снижение активности данного фермента» [6]. Так как тяжелые металлы гидрофобны, они легко всасываются в кровь и, циркулируя в ней, оказывают влияние на эндотелий сосудов. Установлено, что уровень стабильных метаболитов NO по сравнению с исходными данными статистически достоверно оказался ниже. АФК и метаболиты ПОЛ послужили причиной дисфункции эндотелия. В то же время индикаторами патологических нарушений эндотелиальной дисфункции явились повышение показателей концентрации МДА и снижение содержания суммарных метаболитов NO (рис. 2).

Для коррекции выявленных нарушений в системе ПОЛ - АОС и метаболизма NO как показателей эндотелиальной дисфункции экспериментальным животным вводили L-аргинин. В ходе эксперимента установлено, что у подопытных животных в группе 3 с экспозицией хлорида кобальта после введения L-аргинина активность СОД в эритроцитах повысилась, в то время как данные активности каталазы и концентрации ЦП в сыворотке крови понизились, причем в сравнении с контролем активность каталазы осталась все еще повышенной (рис. 2).



*Рис. 2. Влияние L-аргинина на активность ферментов АОС при экспозиции хлорида кобальта*

Принимая во внимание, что L-аргинин является предшественником синтеза NO, мы изучили его влияние на колебания концентрации оксида азота. Данные показали, что при применении L-аргинина увеличилась концентрация стабильных метаболитов NO. Эти данные подтверждают исследования ученых [7], что супероксидный анион может не только тормозить

экспрессию и активность eNOS, но также связывать и инактивировать NO, превращая его в пероксинитрит. Как отмечают некоторые авторы, в электрон-транспортной цепи присутствует повышенное образование супероксидного радикала, приводящее к дисбалансу в АОС [8, 9], что в дальнейшем вызывает дисфункцию эндотелия сосудов при кобальтовой интоксикации [10]. Наши данные, полученные в ходе модельного эксперимента, наглядно показали, что используемый препарат L-аргинин оказал позитивное влияние на состояние функции эндотелия и таким путем повысил продукцию NO, воздействие которого на клеточные структуры сосудистой стенки, играющие роль в регуляции просвета кровеносных сосудов, осуществляется посредством активации циклического гуанозинмонофосфата, что способствует расслаблению мускулатуры. Следовательно, L-аргинин приводит к увеличению концентрации стабильных метаболитов NO, вместе с тем улучшает циркуляцию крови в тканях и органах. Таким образом, применение L-аргинина оказалось результативным в том плане, что выявлены положительные изменения биохимических показателей, оказывающих существенное влияние на функцию эндотелия. Полученные нами данные продемонстрировали доказательные результаты, подтверждающие внутримембранные изменения внутренних органов на фоне интоксикационного синдрома, а также показана роль систем ПОЛ - АОС, NO-продуцирующей функции в развитии системных и органных нарушений.

### **Заключение**

Результаты исследования показали, что при интоксикации хлоридом кобальта происходят интенсификация общепатологического процесса ПОЛ, образование АФК и метаболитов перекисления липидов, которые, в свою очередь, приводят к повышению концентрации МДА и понижению ферментативной активности СОД в эритроцитах, а в сыворотке крови - к понижению содержания каталазы и концентрации ЦП. Варьирование этих показателей является свидетельством развития дисфункции эндотелия. Выявленное снижение концентрации NO свидетельствует о нарушении NO-продуцирующей функции и вазодилатации. Корректирующая терапия сосудистых осложнений и метаболизма NO на фоне интоксикационного синдрома, вызванного хлоридом кобальта с применением L-аргинина - предшественника оксида азота, ингибирует интенсивность липопероксидации в эритроцитах, что обуславливает нарастание в крови активности ферментов антиоксидантной защиты клеток, в частности СОД, и уровня стабильных метаболитов NO. Таким образом, происходит устранение рассогласования в системе ПОЛ - АОС и L-аргинин положительно влияет на способность эндотелия сосудов продуцировать NO. Такой методологический подход можно использовать для профилактики и коррекции нарушений в условиях действия

тяжелых металлов, особенно для людей, работающих во вредных цехах металлургических заводов.

### Список литературы

1. Rehman K., Fatima F., Waheed I., Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J. Cell Biochem.* 2018. vol. 119. no. 1. P. 157-184. DOI: 10.1002/jcb.26234.
2. Гудиева И.Р. Физиологические свойства кобальта и его влияние на организм человека // Молодой ученый. 2019. № 5 (243). С. 42-46.
3. Feng Y., Ying G.G., Yang Z., Shih K., Li H., Wu D. Sulfate radical-induced destruction of emerging contaminants using traces of cobalt ions as catalysts. *Chemosphere.* 2020. vol. 256. P. 127061. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127061.
4. Simonsen L.O., Harbak H., Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology-A brief update. *Sci Total Environ.* 2012. vol. 15. no. 432. P. 210-215. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.009.
5. Дзугкоев С.Г., Можаяева И.В., Такоева Е.А., Дзугкоева Ф.С., Маргиева О.И. Механизмы развития эндотелиальной дисфункции и перспективы коррекции // Фундаментальные исследования. 2014. № 4 (1). С. 198-204.
6. Дзугкоев С.Г., Можаяева И.В., Маргиева О.И., Тедтоева А.И., Дзугкоева Ф.С. Влияние афобазола и регуляторов экспрессии eNOS на показатели системы ПОЛ - АОС и содержание оксида азота при никелевой интоксикации в эксперименте // Sciences of Europe. 2017. № 12-2 (12). С. 78-81.
7. Ferdinandy P., Schulz R. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in myocardial ischemia // *Br J. Pharmacol.* 2003. vol. 138. no. 4. P. 532-543. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705080.
8. Звягина В.И., Медведев Д.В., Бельских Э.С., Фрольцов Д.В. Воздействие донора оксида азота (II) L-аргинина на активность митохондриальных оксидоредуктаз и окислительные процессы в ткани сердца крыс в условиях дефицита оксида азота // Фундаментальные исследования. 2013. № 8-5. С. 1087-1091.
9. Григорьева Н.М. Использование антиоксидантов в спортивной практике // Научно-спортивный вестник Урала и Сибири. 2020. № 1 (25). С. 23-36.
10. Дзугкоев С.Г., Дзугкоева Ф.С., Маргиева О.И., Можаяева И.В. Биохимические маркеры эффективности коррекции окислительно-восстановительного потенциала и функции эндотелия с применением антиоксиданта коэнзима композитума // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29880>. (дата обращения: 18.11.2021). DOI: 10.17513/spno.29880.