

УДК 615.27.015.44:612.616]-092.9

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ109410>

# Протективные эффекты L-аргинина на митохондриях эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой

В. И. Звягина<sup>1</sup>✉, К. Б. Шумаев<sup>2</sup>, Э. С. Бельских<sup>1</sup>, О. М. Урясьев<sup>1</sup>, С. Р. Ахмедова<sup>1</sup>,  
Ю. А. Марсянова<sup>1</sup>, А. М. Шитикова<sup>1</sup>, О. Н. Сучкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Рязань, Российская Федерация;

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Введение.** Исследование маркеров окислительного стресса, метаболитов оксида азота (II) ( $\text{NO}_x$ ) и баланса фракций карнитина в митохондриях эпидидимиса крыс позволит оценить протективную роль L-аргинина в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии.

**Цель.** Изучить влияние L-аргинина на показатели энергетического обмена, уровень метаболитов  $\text{NO}$ , окислительной модификации белков и баланс фракций карнитина в митохондриях головки и хвоста эпидидимиса крыс в условиях гипергомоцистеинемии.

**Материалы и методы.** Животным 1 группы ( $n = 8$ ) моделировали тяжелую гипергомоцистеинемию (ГГЦ) путем введения суспензии метионина в дозе 1,5 г/кг дважды в день в течение 21 дня с добавлением 1% метионина в питьевую воду; крысы 2 группы ( $n = 8$ ) получали суспензионную основу без метионина; животным 3 группы ( $n = 8$ ) на фоне метиониновой нагрузки с 11 дня по 21 день ежедневно внутрижелудочно вводили раствор L-аргинина в дозе 500 мг/кг; 4 группе ( $n = 8$ ) назначали L-аргинин в дозе 500 мг/кг в течение 10 дней; группа 5 ( $n = 8$ ) служила контролем для группы 4 и получала внутрижелудочно питьевую воду. В сыворотке определяли концентрацию общего гомоцистеина и  $\text{NO}_x$ . В митохондриальной фракции гомогената тканей эпидидимиса оценивали уровень окислительно-модифицированных белков (ОМБ), концентрацию  $\text{NO}_x$ , лактата и фракций карнитина, активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), супероксиддисмутазы (СОД),  $\text{H}^+$ -АТФазы, сукцинатдегидрогеназы (СДГ).

**Результаты.** ГГЦ сопровождалась снижением уровня  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови и митохондриях тканей головки эпидидимиса. В митохондриях тканей головки и хвоста эпидидимиса наблюдалось выраженное снижение всех фракций карнитина, активности ЛДГ,  $\text{H}^+$ -АТФазы, СДГ, повышение активности СОД и уровня ОМБ. L-аргинин на фоне моделирования ГГЦ уменьшал выраженность гипергомоцистеинемии, предотвращал снижение уровня  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови и головке эпидидимиса и снижал содержание ОМБ митохондрий эпидидимиса.

**Заключение.** L-аргинин при совместном введении с метионином снижает степень выраженности гипергомоцистеинемии. Также подтверждено его положительное влияние на рост концентрации метаболитов  $\text{NO}_x$  сыворотки крови и митохондрий эпидидимиса в условиях метиониновой нагрузки. L-аргинин проявляет антиоксидантные свойства, снижая выраженность окислительного стресса, вызванного гипергомоцистеинемией. Продемонстрированы различия в адаптивном ответе на окислительный стресс митохондрий головки и хвоста эпидидимиса.

**Ключевые слова:** гомоцистеин; митохондриальная дисфункция; L-аргинин; эпидидимис; окислительный стресс; гипергомоцистеинемия

## Для цитирования:

Звягина В.И., Шумаев К.Б., Бельских Э.С., Урясьев О.М., Ахмедова С.Р., Марсянова Ю.А., Шитикова А.М., Сучкова О.Н. Протективные эффекты L-аргинина на митохондриях эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2022. Т. 30, № 4. С. 457–470. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ109410>

Рукопись получена: 19.07.2022

Рукопись одобрена: 07.11.2022

Опубликована: 31.12.2022



DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ109410>

# Protective Effects of L-Arginine on Mitochondria of Rat Epididymis in Hyperhomocysteinemia Induced by Prolonged Methionine Load

Valentina I. Zvyagina<sup>1</sup>✉, Konstantin B. Shumayev<sup>2</sup>, Eduard S. Belskikh<sup>1</sup>,  
Oleg M. Uryasyev<sup>1</sup>, Sabina R. Akhmedova<sup>1</sup>, Yuliya A. Marsyanova<sup>1</sup>,  
Anna M. Shitikova<sup>1</sup>, Ol'ga N. Suchkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation;

<sup>2</sup> The Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology' of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The study of markers of oxidative stress, metabolites of nitric oxide (II) (NO<sub>x</sub>) and the balance of carnitine fractions in mitochondria of rat epididymis, permits to evaluate the protective role of L-arginine in experimental hyperhomocysteinemia.

**AIM:** To study the influence of L-arginine on the parameters of energy metabolism, level of NO metabolites, oxidative modification of proteins and balance of carnitine fractions in mitochondria of the head and tail of rat epididymis in hyperhomocysteinemia.

**MATERIALS AND METHODS:** In animals of group 1 (n = 8), severe hyperhomocysteinemia (HHcy) was modeled by administration of methionine suspension at a dose of 1.5 g/kg twice daily for 21 days with addition of 1% methionine in drinking water; group 2 rats (n = 8) received suspension base without methionine; animals of group 3 (n = 8) were daily administered L-arginine solution at a dose of 500 mg/kg intragastrically against the background methionine load from day 11 to day 21; group 4 animals (n = 8) were administered L-arginine solution of at a dose of 500 mg/kg for 10 days; group 5 (n = 8) served as a control for group 4 and received drinking water intragastrically. Concentrations of total homocysteine and NO<sub>x</sub> were determined in serum. In the mitochondrial fraction of the homogenate of epididymis tissues, the level of oxidatively modified proteins (OMP), the concentration of NO<sub>x</sub>, lactate and carnitine fractions, the activity of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), H<sup>+</sup>-ATPase, succinate dehydrogenase (SDH) were evaluated.

**RESULTS:** HHcy was accompanied by reduction of the level of NO<sub>x</sub> in blood serum and mitochondria of epididymis head tissues. In mitochondria of tissues of head and tail of epididymis, a marked reduction of all fractions of carnitine, activity of LDH, H<sup>+</sup>-ATPase, SDH, increase in the activity of SOD and in the level of OMP were observed. With modeled HHcy, L-arginine reduced the extent of hyperhomocysteinemia, prevented reduction of NO<sub>x</sub> level in the blood serum and epididymis head and reduced the content of OMP of the epididymis mitochondria.

**CONCLUSION:** L-arginine introduced in combination with methionine, reduces the extent of severity of hyperhomocysteinemia. The positive effect of L-arginine on increase in the concentration of NO<sub>x</sub> metabolites in blood serum and mitochondria of epididymis in conditions of methionine load was also confirmed. L-arginine exhibits antioxidant properties, reducing the severity of oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia. Differences in the adaptive response to oxidative stress of the mitochondria of the head and tail of epididymis were demonstrated.

**Keywords:** homocysteine; mitochondrial dysfunction; L-arginine; epididymis; oxidative stress; hyperhomocysteinemia

## For citation:

Zvyagina VI, Shumayev KB, Belskikh ES, Uryasyev OM, Akhmedova SR, Marsyanova YuA, Shitikova AM, Suchkova ON. Protective Effects of L-Arginine on Mitochondria of Rat Epididymis in Hyperhomocysteinemia Induced by Prolonged Methionine Load. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2022;30(4):457–470. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ109410>

Received: 19.07.2022

Accepted: 07.11.2022

Published: 31.12.2022

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК — активные формы кислорода  
ГГЦ — гипергомоцистеинемия  
е.о.п. — единица оптической плотности  
ЛДГ — лактатдегидрогеназа  
ОМБ — окислительная модификация белков  
ОС — окислительный стресс  
РАП ОМБ — резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков  
СДГ — сукцинатдегидрогеназа  
СОД — супероксиддисмутаза  
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат  
ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение  
ADMA — asymmetric dimethylarginine (асимметричный диметиларгинин)  
AGXT-2 — Alanine-Glyoxylate Aminotransferase 2 (аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2)  
BCKDC — branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex (дегидрогеназный комплекс разветвлённых  $\alpha$ -кетокислот)

CrAT II — carnitine acyltransferase II (карнитинацилтрансфераза II)  
DDAH — dimethylarginine dimethylaminohydrolase (диметиларгинин-диметиламиногидролаза)  
NO — nitric oxide (II) (оксид азота (II))  
NO<sub>x</sub> — total metabolites NO (II) (суммарные метаболиты NO (II))  
NOS — nitric oxide synthase (синтаза оксида азота)  
NAD<sup>+</sup> — nicotinamide adenine dinucleotide oxidized, (никотинамидадениндинуклеотид окисленный)  
NADH — nicotinamide adenine dinucleotide reduced (никотинамидадениндинуклеотид восстановленный)  
PRMTs — protein arginine methyltransferases (протеин-аргининметилтрансферазы)  
ROS — reactive oxygen species (активные формы кислорода)  
SAH — S-adenosylhomocysteine (S-аденозилгомоцистеин)  
SAM — S-adenosylmethionine (S-аденозилметионин)  
SDMA — symmetric dimethylarginine (симметричный диметиларгинин)

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время рост распространенности нарушений фертильности становится одной из глобальных проблем здравоохранения [1]. По данным ряда авторов, пик фиксируемых нарушений фертильности приходится на наиболее работоспособный возраст 35–44 года — в 17,7% случаев у женщин и в 14,9% у мужчин [2]. При этом доля «мужского фактора» в  $21,1 \pm 2,8\%$  случаев является ключевой причиной невозможности зачать ребенка [3].

Для диагностики фертильности мужчин принято использовать количественные и морфологические критерии сперматозоидов, которые, однако, не позволяют точно предсказать вероятность зачатия у пациентов с идиопатическим бесплодием и обладают невысокой точностью для предсказания результатов процедур экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [3]. В этой связи, по мнению R. J. Aitken, et al., важная роль в оценке функции сперматозоидов принадлежит исследованию маркеров окислительного стресса (ОС) и антиоксидантной защиты [3, 4].

Среди возможных причин ОС, которые могут лежать в основе окислительного повреждения в клетках мужской репродуктивной системы, важную роль играет митохондриальная дисфункция, связанная с избыточной генерацией митохондриями активных форм кислорода (АФК) и нарушением антиоксидантной защиты, что, в свою очередь, вызывает дисбаланс процессов редокс-регуляции клеточного гомеостаза [5–7].

Необходимо отметить, что антиоксиданты, такие как L-аргинин, L-карнитин, каротиноиды, витамины E, C и B<sub>9</sub>, коэнзим Q, цистеин и ацетил-цистеин, в настоящее время рассматриваются как потенциальные

терапевтические агенты для коррекции нарушений фертильности. Вместе с тем результаты их применения до настоящего времени остаются противоречивыми [7, 8]. В связи с этим представляется перспективным подход, учитывающий гетерогенность причин ОС, что отражает потребность в выделении биомаркеров для персонализации терапии нарушений фертильности [9].

Установлено, что L-аргинин характеризуется выраженной антиоксидантной активностью, которая проявляется даже в условиях первичной митохондриальной дисфункции [10], и способен снижать выраженность дефицита синтеза оксида азота II (NO) и ОС, обусловленного гомоцистеином [11], но механизм этого процесса до конца не изучен [12].

Сообщается, что эпидидимальная дисфункция, связанная с нарушением формирования микроокружения для сперматозоидов, может являться существенным фактором мужского бесплодия. Причем каждый сегмент эпидидимиса вносит особый вклад в микроокружение просвета, но тем не менее молекулярные механизмы, участвующие в приобретении подвижности и в способности к оплодотворению, остаются в значительной степени малоизученными [13]. Анализ содержания карнитина, маркеров ОС и активности ферментов митохондрий при экспериментальной гипергомоцистеинемии изолированно и совместно с L-аргиномом позволит оценить тканеспецифичность отделов эпидидимиса в ответ на моделируемые патологические состояния [13, 14].

**Цель** — изучить влияние L-аргинина на показатели энергетического обмена, уровень метаболитов NO, окислительной модификации белков и баланс фракций карнитина в митохондриях головки и хвоста эпидидимиса крыс в условиях гипергомоцистеинемии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на крысах-самцах линии Wistar. Эксперименты с животными проведены 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 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и положениями Биоэтической комиссии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 16 от 06.11.2018). Животные содержались в стандартных условиях вивария, для кормления они получали сухой корм «Чара» (Ассортимент-Агро, Россия), содержащий 0,7% метионина-цистина в пересчёте на сухое вещество, все витамины группы В, в том числе В<sub>6</sub> — 28 мг/кг, В<sub>9</sub> — 64 мг/кг, В<sub>12</sub> — 0,13 мг/кг.

Экспериментальные животные были поделены на 5 групп:

- **1 группа** (ГГЦ, n = 8) — модель гипергомоцистеинемии: крысы с тяжёлой гипергомоцистеинемией (> 100 мкмоль/л), для этого 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; дополнительно вместо питьевой воды крысы получали 1% водный раствор метионина при свободном доступе к поилкам [15];

- **2 группа** (Твин, n = 8) — контроль модели гипергомоцистеинемии: крысы по аналогичной схеме получали суспензионную основу, в состав которой входили вода, твин-80 (ЗАО Вектон, Россия) и крахмал (ЗАО Вектон, Россия). Поилки для этих животных наполняли обычной питьевой водой;

- **3 группа** (ГГЦ + Арг, n = 8) — модель гипергомоцистеинемии на фоне назначения L-аргинина 3 группы: животным на фоне гипергомоцистеинемии (аналогично группе 1) с 11 дня по 21 день осуществляли внутрижелудочное введение раствора L-аргинина (Sigma, США) на 0,9% NaCl в дозе 500 мг/кг ежедневно в промежутке между введением суспензии метионина [16];

- **4 группа** (L-аргинин, n = 8) — введение L-аргинина здоровым животным: назначали L-аргинин в дозе 500 мг/кг ежедневно в течение 10 дней;

- **5 группа** — контроль для группы 4 (контроль, n = 8): животные получали в течение того же времени, что и группа 4, внутрижелудочно тот же объем питьевой воды вместо раствора L-аргинина.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось утром до приема пищи. Под эфирным рауш-наркозом при сохранённом дыхании и сердцебиении путём обескровливания пересечением брюшной аорты. После этого извлекали эпидидимис, промывали его в среде, содержащей 0,25 М сахарозу (Чехия, перефасовано ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), 0,001 М ЭДТА (ООО Компания

Хеликон, Россия) и 0,05 М трис-буфер (pH 7,4) (ЗАО Вектон, Россия), отделяли головку и хвост эпидидимиса, которые использовали для дальнейших исследований [13]. Для гомогенизации использовали гомогенизатор PotterS (Sartorius, Германия).

Гомогенаты центрифугировали 10 минут при 800 g для осаждения ядер и не разрушенных клеток. Надосадочную жидкость центрифугировали 15 минут при 14000 g на рефрижераторной центрифуге K24D (Германская Демократическая Республика) [17]. Осадок содержащий митохондрии ресуспендировали в среде выделения в отношении 1:9. К части суспензии митохондрий добавляли тритон X-100 (ООО Компания Хеликон, Россия) в конечной концентрации 0,02% для разрушения мембран. Все описанные выше процедуры проводили при температуре не выше 4°C. В дальнейшем для анализа использовали:

- сыворотку крови, в которой определяли концентрацию общего гомоцистеина и метаболитов NO (NO<sub>x</sub>), т. е. суммарного уровня нитрита и нитрата;

- митохондриальную фракцию с разрушенными мембранами, где оценивали окислительную модификацию белков (ОМБ), концентрацию NO<sub>x</sub>, лактата, фракций карнитина, активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) и супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1);

- митохондриальную фракцию с не разрушенными мембранами, в которой определяли активность Н<sup>+</sup>-АТФазы (КФ 3.6.3.14) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.5.1).

Концентрацию общего гомоцистеина определяли иммуноферментным анализом с помощью коммерческого набора (Axis Shield, Великобритания). Принцип метода основан на восстановлении гомоцистеина, связанного с белками, в свободный гомоцистеин, который энзиматически превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин с его последующим иммуноферментным анализом.

Содержание общего белка определяли по методу Лоури с помощью набора реактивов (Экосервис, Россия), проводили с использованием фотоколориметра КФК-3-01 ЗОМЗ (Россия).

Фотоколориметрическим методом на анализаторе Stat Fax 3200 (Awareness Technology, США) оценивали суммарный уровень метаболитов NO (NO<sub>x</sub>) с использованием реактива Грисса (ООО НеваРеактив, Россия) и хлорида ванадия (III) (AcrosOrganics, США) для определения суммы нитритов и нитратов [18].

Концентрацию молочной кислоты измеряли колориметрически лактатоксидазным методом с использованием набора (Diasys, Федеративная Республика Германия) на анализаторе Stat Fax 1900+ (Awareness Technology, США).

Активность СДГ оценивали спектрофотометрическим методом по реакции восстановления гексацианоферрата (III) калия в ферроцианид калия на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Активность фермента

пропорциональна количеству восстановленного ферроцианида [17].

Активность ЛДГ определяли по снижению концентрации NADH в реакции восстановления пирувата с помощью коммерческого набора (Diasys, Федеративная Республика Германия) на анализаторе Stat Fax 1900+ (Awareness Technology, США).

Активность  $H^+$ -АТФазы оценивалась по методу Боданского путем определения количества неорганического фосфата по образованию фосфомолибдата аммония, восстанавливаемого аскорбиновой кислотой в молибденовую синь, оптическая плотность которой прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфата. Измерение проводили с использованием фотоколориметра КФК-3-01 ЗОМЗ (Россия) [19].

Общую активность митохондриальной СОД оценивали по торможению реакции аутоокисления кверцетина с использованием фотоколориметра КФК-3-01 ЗОМЗ (Россия) [20].

Анализ уровня ОМБ проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) с последующим перерасчётом площади под кривой абсорбции света [21]. Для оценки ОМБ определяли уровень карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Количество карбонильных производных аминокислотных остатков в белках оценивали по площади под кривой, разбивая её на прямоугольные трапеции. Общее количество продуктов спонтанной окислительной модификации белков (СП ОМБ) выражали в единицах оптической плотности (е.о.п.) на мг белка (е.о.п./ мг белка) [21]. Параллельно определению СП ОМБ проводили определение металлкатализируемого окисления (МК ОМБ) с помощью реакции Фентона, служившее показателем максимально возможного окислительного повреждения белковых молекул, которое принималось за 100%. Затем рассчитывали резервно-адаптационный потенциал окислительного повреждения митохондриальных белков (РАП ОМБ), который выражали в % как отношение СП ОМБ/МК ОМБ. Чем ниже доля продуктов спонтанного окисления (СП ОМБ), тем выше резервно-адаптационный потенциал (РАП ОМБ) [21].

Концентрацию карнитина в митохондриях тканей эпидидимиса крыс определяли на анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology, США) по методу Wan L. и Hubbard R. W. (1998), основанному на образовании свободного KoASH, реагирующего неэнзиматически с 5,5-дитиобис-2-нитробензоатом (англ.: 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoate, DTNB) с образованием окрашенного 5-тио-2-нитробензоата, интенсивность окраски которого измеряли спектрофотометрически при  $\lambda = 410$  нм [22].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью Statistica 10.0 (Stat Soft Inc., США). Построение графиков осуществляли, используя GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Соответствие

выборки нормальному распределению проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Распределение отличалось от нормального, в связи с чем для выявления различий между независимыми группами использовали критерий Краскела–Уоллиса и критерий Манна–Уитни с 2-х этапной поправкой для множественных сравнений Бенджамини–Криегера–Иекутелли или критерий Манна–Уитни при сравнении 2 групп. Уровень отличий рассматривался как статистически значимый при вероятности нулевой гипотезы об отсутствии различий  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Назначение в пищевой рацион крысам-самцам метионина в течение 21 дня приводило к повышению концентрации гомоцистеина в сыворотке крови более 100 мкмоль/л, что соответствовало тяжелой форме ГГЦ. Развившаяся ГГЦ сопровождалась статистически значимым снижением  $NO_x$  в сыворотке крови, что отражало индуцированный в модели дефицит синтеза оксида азота эндотелием сосудистой стенки. Также было обнаружено значительное снижение концентрации общего и свободного карнитина в сыворотке крови (рис. 1).

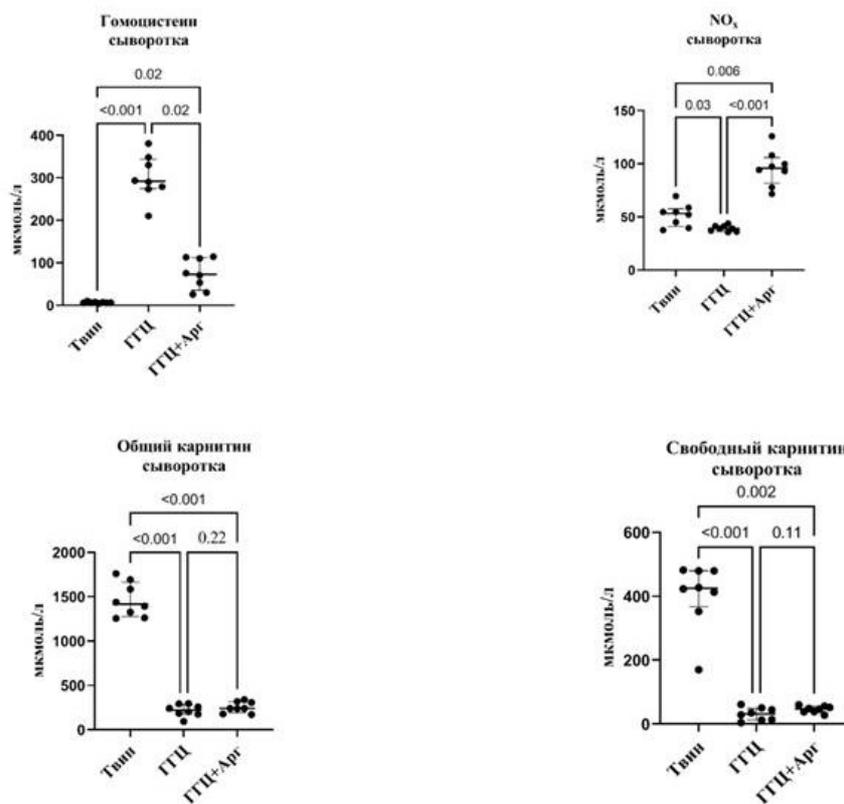
Оценка уровня  $NO_x$  в митохондриях гомогената головки эпидидимиса позволила выявить снижение их концентрации по сравнению с показателем группы, получавшей только суспензионную основу, и подтвердить системный характер дефицита синтеза NO в условиях тяжелой формы гипергомоцистеинемии (рис. 2).

В соответствии с рисунком 3 увеличение концентрации гомоцистеина сопровождалось выраженным усилением окислительной модификации белков как в головке, так и в хвосте придатка яичка и значительным подъемом активности СОД на 220% ( $p = 0,03$ ) и 240% ( $p = 0,04$ ) соответственно относительно группы контроля. Все это могло свидетельствовать о возникновении ОС в тканях придатка яичка в условиях гипергомоцистеинемии (рис. 3).

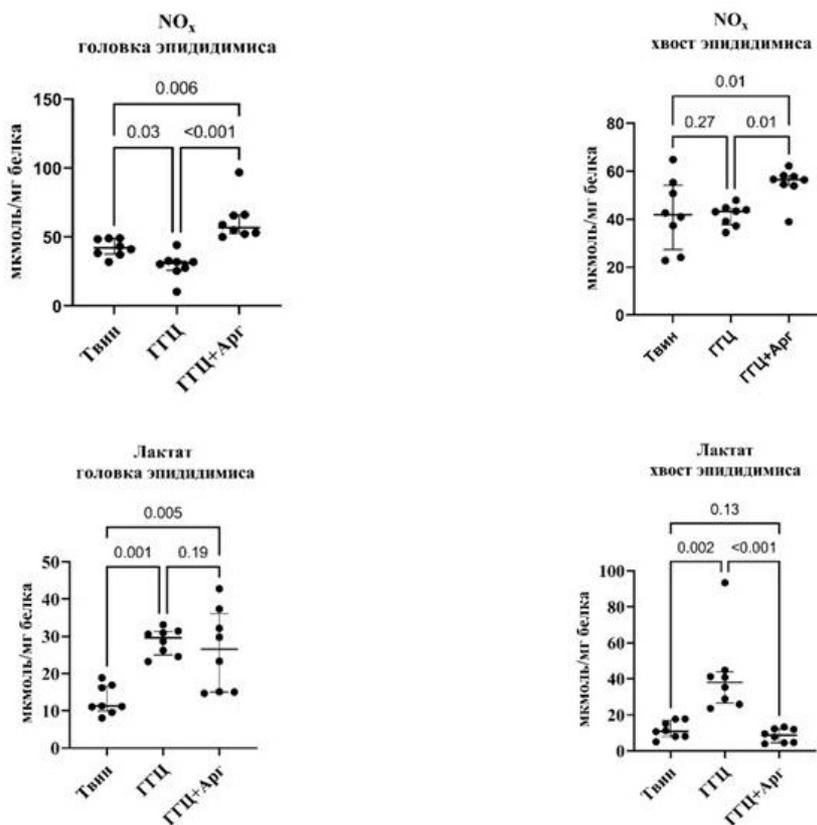
У животных наблюдалось также уменьшение РАП окислительной модификации только в головке эпидидимиса, что, по-видимому, указывает на более низкую устойчивость головки придатка яичка крыс к окислительному повреждению.

Наряду со значительным увеличением показателей ОС отмечалось и снижение активности исследуемых ферментов, вовлечённых в биоэнергетические процессы митохондрий (СДГ,  $H^+$ -АТФазы), а также увеличением концентрации митохондриального лактата и статистически значимым падением активности ЛДГ в головке придатка яичка (рис. 2, 4).

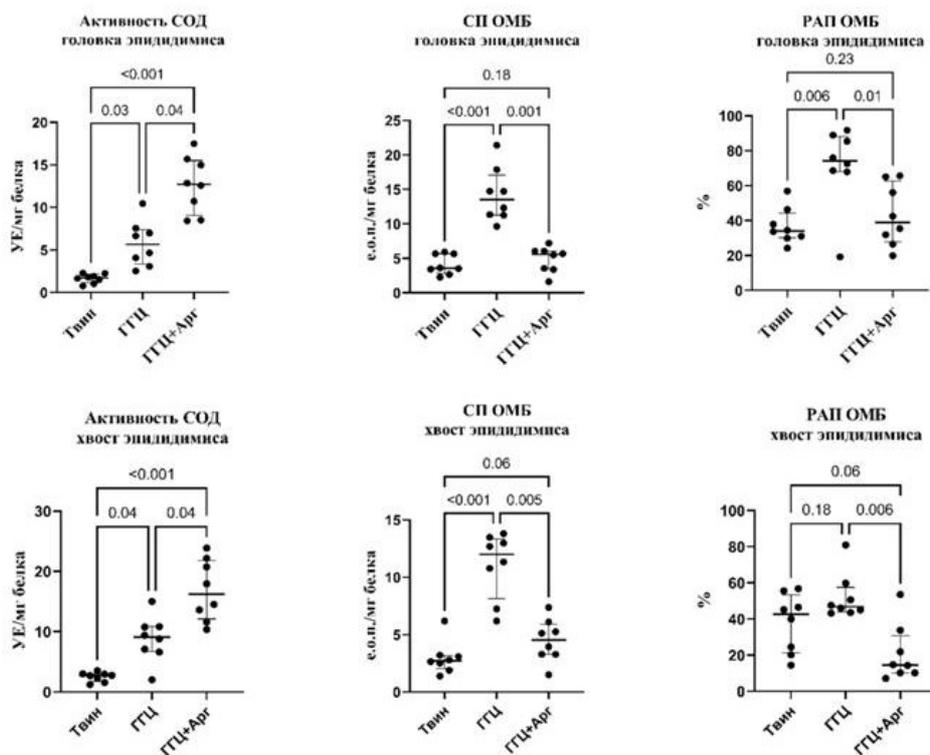
Обнаруженные изменения сопровождалось значительным уменьшением концентрации общего карнитина в митохондриях, выделенных из гомогената тканей эпидидимиса, на 270% ( $p < 0,001$ ) в головке эпидидимиса и на 300% ( $p < 0,001$ ) в хвосте придатка яичка (рис. 5).



**Рис. 1.** Концентрация  $\text{NO}_x$ , гомоцистеина, общего и свободного карнитина в сыворотке крови исследуемых групп животных, Me [Q1; Q3].  
Примечание: ГГЦ — модель гипергомоцистеинемии, группа 1; Твин — группа 2; модель гипергомоцистеинемии на фоне назначения L-аргинина — группа 3. Значения  $p$  с точностью до тысячных долей приведены над графиками.

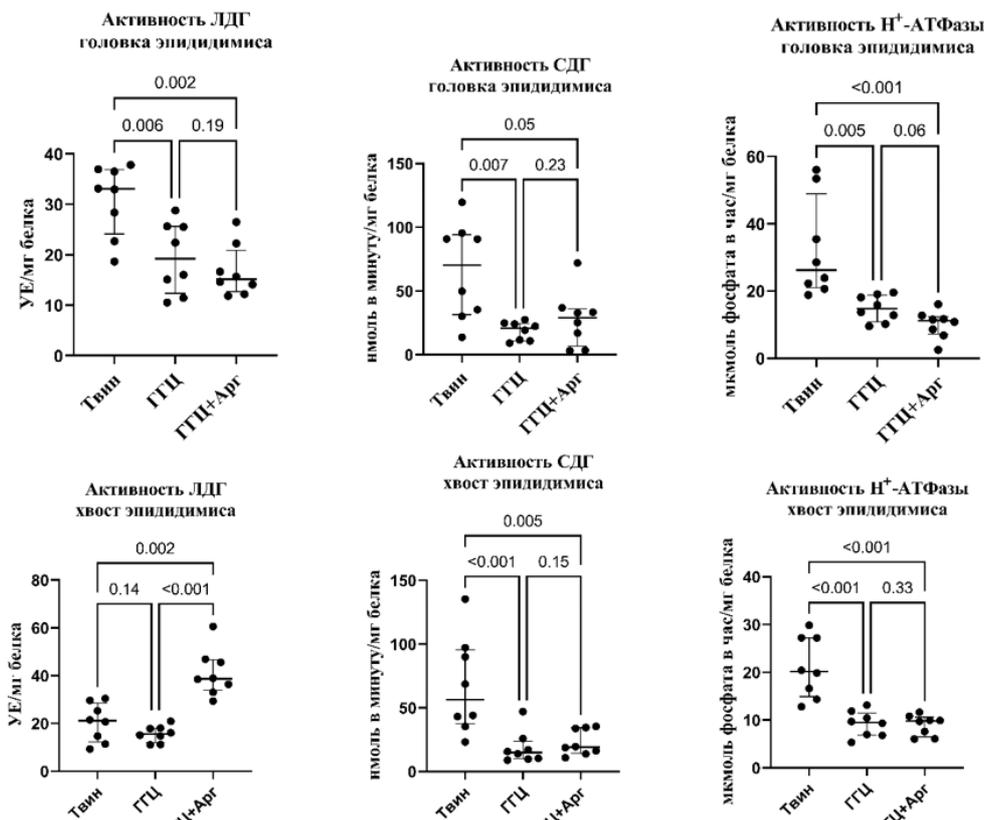


**Рис. 2.** Сравнение уровней метаболитов  $\text{NO}$  (II) и лактата митохондрий в исследуемых моделях, Me [Q1; Q3].  
Примечание: ГГЦ — модель гипергомоцистеинемии, группа 1; Твин — группа 2; модель гипергомоцистеинемии на фоне назначения L-аргинина — группа 3. Значения  $p$  с точностью до тысячных долей приведены над графиками.



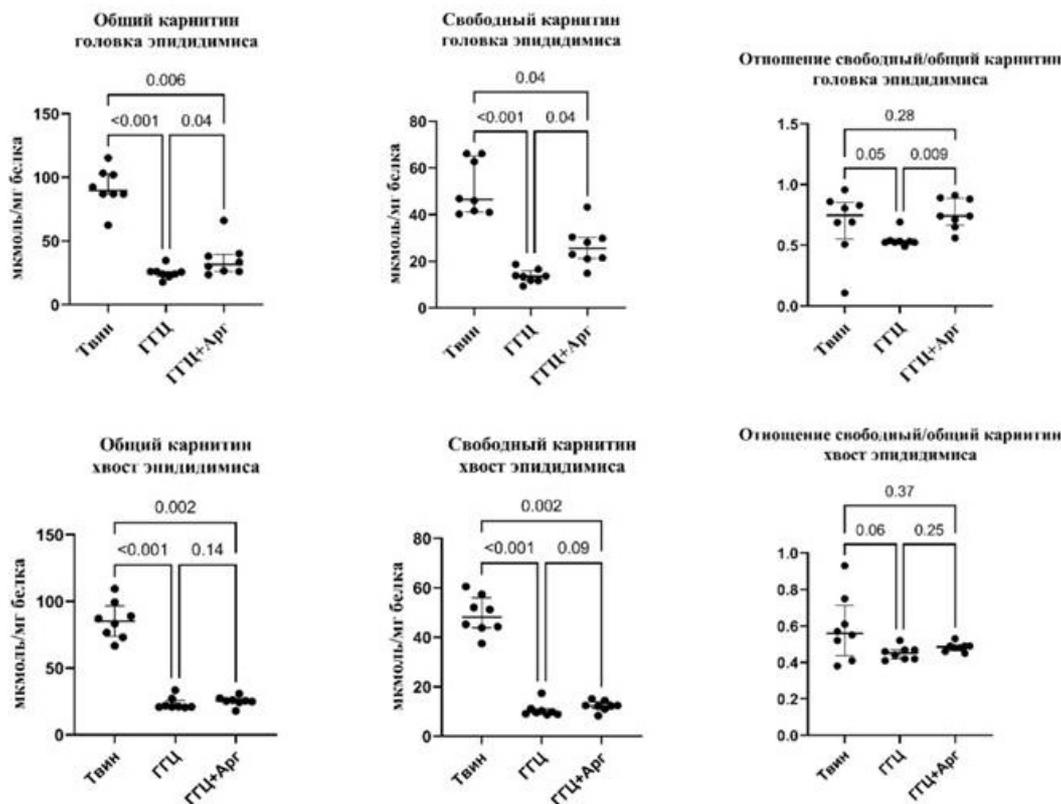
**Рис. 3.** Сравнение исследуемых показателей окислительного стресса митохондрий в исследуемых моделях, Me [Q1; Q3].

Примечание: ГТЦ — модель гипергомоцистеинемии, группа 1; Твин — группа 2; модель гипергомоцистеинемии на фоне назначения L-аргинина — группа 3. Значения р с точностью до тысячных долей приведены над графиками.



**Рис. 4.** Сравнение активностей ферментов митохондрий в исследуемых моделях, Me [Q1; Q3].

Примечание: ГТЦ — модель гипергомоцистеинемии, группа 1; Твин — группа 2; модель гипергомоцистеинемии на фоне назначения L-аргинина — группа 3. Значения р с точностью до тысячных долей приведены над графиками.



**Рис. 5.** Сравнение содержания L-карнитина в митохондриях гомогенатов головки и хвоста эпидидимиса в исследуемых моделях, Me[Q1; Q3].  
Примечание: ГГЦ — модель гипергомоцистеинемии, группа 1; Твин — группа 2; модель гипергомоцистеинемии на фоне назначения L-аргинина — группа 3. Значения  $p$  с точностью до тысячных долей приведены над графиками.

Следует отметить, что между уровнем сывороточного гомоцистеина и концентрацией общего карнитина в митохондриальной фракции нами обнаружена статистически значимая сильная обратная корреляционная связь в головке эпидидимиса ( $r = -0,74$ ,  $p = 0,001$ ); средней силы обратная корреляционная связь в хвосте эпидидимиса ( $r = -0,61$ ,  $p = 0,012$ ).

Пероральное введение L-аргинина крысам в дозе 500 мг/кг на фоне моделирования гипергомоцистеинемии приводило к менее выраженному повышению концентрации сывороточного гомоцистеина, а также к увеличению уровня метаболитов оксида азота II в сыворотке крови на 170% ( $p = 0,006$ ) по сравнению с животными, которым вводили суспензионную основу, и на 80% ( $p < 0,001$ ) относительно уровня контроля; в митохондриях головки эпидидимиса — на 82,8% ( $p = 0,006$ ) относительно серии с введением метионина и на 31% ( $p < 0,001$ ) относительно контрольных значений. В хвосте придатка яичка статистически значимых изменений содержания метаболитов NO не выявлено.

При моделировании гипергомоцистеинемии на фоне введения L-аргинина также отмечалось статистически значимое снижение общей площади под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации

белков в обеих исследуемых фракциях эпидидимиса. Также при сочетанном назначении L-аргинина и метионина не происходило значительного снижения резервно-адаптационного потенциала, как в серии с гипергомоцистеинемией (рис. 3).

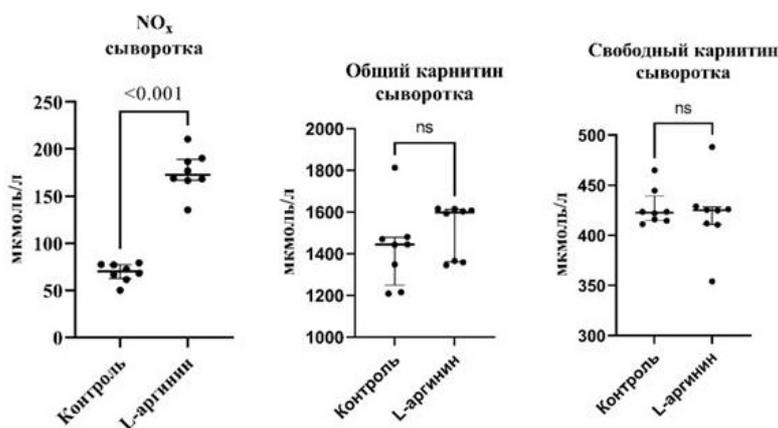
Наряду с этим при назначении L-аргинина животным на фоне моделирования гипергомоцистеинемии активность СДГ и  $H^+$ -АТФазы не отличалась от серии животных с тяжелой формой ГГЦ и была ниже уровня контрольных значений.

Для более объективной оценки роли L-аргинина на ткани эпидидимиса крыс-самцов были исследованы аналогичные биохимические показатели в условиях отсутствия окислительного стресса, вызванного избыточной нагрузкой метионина, для этого использовали серию животных с назначением L-аргинина в течение того же времени и той же дозы, что и здоровым животным (рис. 6).

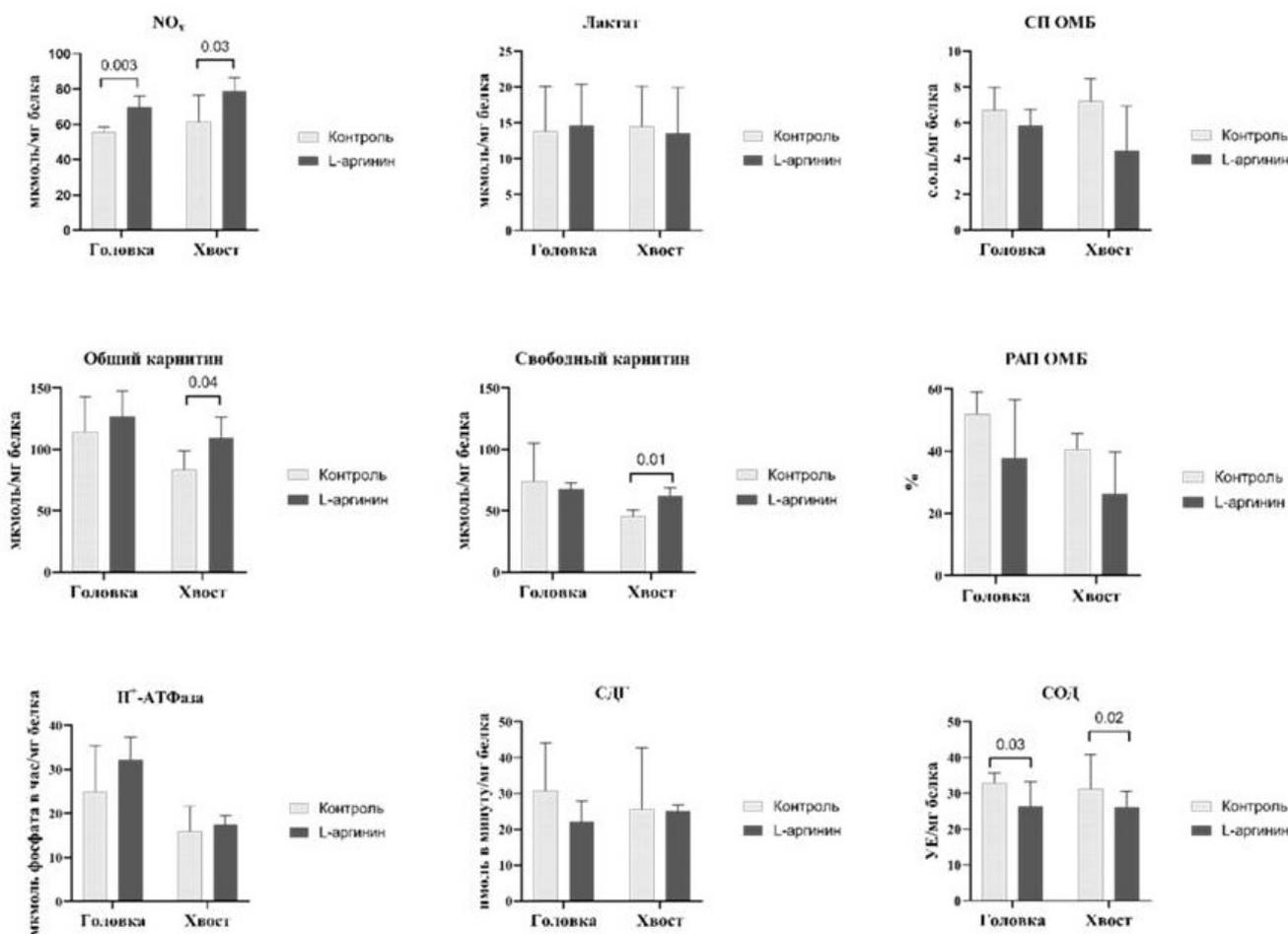
Было обнаружено статистически значимое увеличение концентрации метаболитов NO в сыворотке крови (на 150%,  $p < 0,001$ ), митохондриях хвоста (на 28,6%,  $p = 0,03$ ) и головки (на 25,75%,  $p = 0,003$ ) эпидидимиса.

Отмечалось повышение уровня общего и свободного карнитина в хвосте придатка яичка на 31,3% ( $p = 0,04$ ) и 37,7% ( $p = 0,01$ ) соответственно. Также имело

место снижение активности СОД в головке на 20,0% (p = 0,03) и хвосте на 17,8% (p = 0,02). Другие исследуемые биохимические показатели статистически значимо не изменялись (рис. 7).



**Рис. 6.** Уровни метаболитов NO (II) и карнитина в сыворотке крови интактных животных и на фоне введения L-аргинина, Me(Q1; Q3). *Примечание:* L-аргинин — группа животных 4, Контроль — группа животных 5 (контроль для группы 4). Значения p с точностью до тысячных долей приведены над графиками.



**Рис. 7.** Изменения исследуемых показателей митохондрий головки и хвоста эпидидимиса на фоне назначения L-аргинина, Me(Q1; Q3). *Примечание:* L-аргинин — группа животных 4, Контроль — группа животных 5 (контроль для группы 4). Значения p с точностью до тысячных долей приведены над графиками.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженные в серии сочетанного назначения L-аргинина и метионина изменения уровней ОМБ в совокупности со статистически значимым приростом активности СОД как в хвосте, так и головке позволяют предположить протективный эффект L-аргинина, связанный со снижением интенсивности окислительного повреждения белков эпидидимиса у крыс.

Была выявлена различная реакция со стороны митохондрий тканей эпидидимиса головки и хвоста на фоне назначения L-аргинина. Так, в хвосте эпидидимиса наблюдалось повышение уровня активности ЛДГ и снижение концентрации лактата относительно серии животных с ГГЦ, при этом в головке наблюдалось увеличение содержания общего карнитина преимущественно за счет свободной фракции (рис. 2, 4).

В отличие от серии с введением L-аргинина здоровым животным, в условиях гипергомоцистеинемии L-аргинин статистически значимо не изменял уровень общего карнитина в митохондриях головки и хвоста эпидидимиса за счет того, что карнитин, возможно, используется для выведения метаболитов метионина в виде короткоцепочечных эфиров карнитина [23–25]. В этом случае удаление избытка метионина будет предотвращать развитие осложнений, связанных с нарушением его метаболизма, однако физиологическая концентрация карнитина недостаточна для полной элиминации всего поступающего метионина.

При длительном введении метионина (донора метильных групп) создаются условия усиленного образования диметиларгининов (ADMA, SDMA). Эти метилированные производные аргинина, с одной стороны, способны ингибировать клеточное поглощение L-аргинина при участии катионных транспортеров (CAT) [26], за счет чего, предположительно, концентрация метаболитов NO в сыворотке крови возрастает более выражено, чем в митохондриях эпидидимиса. С другой стороны, диметиларгинины, в первую очередь ADMA, являются ингибитором NO-синтазы (КФ 1.14.13), при разобщении которой интенсифицируется процесс образования АФК [27, 28]. В связи с этим мы, вероятно, наблюдаем более значительное повышение активности митохондриальной СОД, фермента антиоксидантной защиты, чем при введении только метионина, также АФК способны стимулировать активность аргининметилтрансфераз (КФ 2.1.1.321) и вновь усиливать синтез диметиларгининов [29, 30].

Из литературных источников известно также, что гомоцистеин ингибирует активность фермента диметиларгининдиметиламиногидролазы (DDAH, КФ 3.5.3.18), который метаболизирует ADMA до неактивных продуктов, вызывая тем самым накопление ADMA и ингибирование синтеза оксида азота [31, 32].

Мы можем предположить, что снижение уровня гомоцистеина и уменьшение степени гипергомоцистеинемии

происходило за счет конкурентного транспорта аргинина и метионина. Так, J. W. Robinson, et al. выявили, что поглощение L-метионина сильно ингибируется L-аргиномом и цитруллином [33, 34]. Таким образом, уменьшается ингибирующее действие ADMA на NO-синтазу вследствие элиминации ADMA при реактивации DDAH.

На основе результатов исследования и обзора литературы нами предлагается схема, обобщающая представления о механизмах снижения уровня гомоцистеина на фоне назначения L-аргинина (рис. 8).

Интересен и тот факт, что при назначении L-аргинина крысам группы 4 отмечено снижение активности митохондриальной СОД в эпидидимисе самцов крыс. При сочетанном же введении L-аргинина и метионина имело место выраженное статистически значимое увеличение активности данного фермента, а определение зависимости показателей метаболитов NO и активности СОД в митохондриальной фракции показало наличие прямых, умеренных статистически значимых корреляционных связей между данными показателями в исследуемых отделах эпидидимиса:

- головка эпидидимиса:  $r = 0,46$ ;  $p = 0,023$ ;

- хвост эпидидимиса:  $r = 0,46$ ;  $p = 0,018$ .

Хотя L-аргинин обладает прямым антиоксидантным действием [35], не исключено, что в данном случае его антиоксидантное свойство связано с увеличением продукции NO и его последующим участием в инактивации свободных радикалов. Такое антиоксидантное действие NO может быть связано с формированием, в том числе в митохондриях, динитрозильных комплексов железа [36]. Известно, что эти комплексы NO эффективно ингибируют процессы свободнорадикального окисления и окислительной модификации биополимеров [36, 37]. Вместе с тем при взаимодействии супероксидного радикала с NO продуцируется очень сильный окислитель пероксинитрит, который может опосредовать развитие окислительного стресса и приводить к усилению экспрессии СОД [30, 36, 37].

## ВЫВОД

Таким образом, L-аргинин уменьшает степень выраженности гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина в высокой дозе, вероятно, за счет ингибирования транспорта метионина в клетки и, как следствие, увеличения концентрации метаболитов оксида азота. В свою очередь, некоторые метаболиты NO, как и сам L-аргинин, проявляют протективные антиоксидантные свойства, препятствуя развитию окислительного стресса, вызванного гиперпродукцией гомоцистеина.

Каудальная часть эпидидимиса оказалась более устойчивой к окислительному повреждению, вызванному длительной метиониновой нагрузкой. Также продемонстрированы различия в адаптивном ответе при моделировании тяжелой гипергомоцистеинемии на фоне применения экзогенного L-аргинина.



**Рис. 8.** Схема возможных механизмов снижения уровня гомоцистеина на фоне назначения L-аргинина.

*Примечание:* АДМА — асимметричный диметиларгинин, СДМА — симметричный диметиларгинин, SAM (S-adenosylmethionine) — S-аденозилметионин, SAH (S-adenosylhomocysteine) — S-аденозилгомоцистеин, Homocysteine — гомоцистеин, PRMTs (Protein arginine methyltransferases) — протеин-аргининметилтрансферазы, AGXT-2 (Alanine-Glyoxylate Aminotransferase 2) — аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2, KAT II — карнитинацилтрансфераза II, DDAH (Dimethylarginine dimethylaminohydrolase) — диметиларгининдиметиламиногидролаза, NOS (nitric oxide synthase) — синтаза оксида азота. НАД<sup>+</sup> (Никотинамидадениндинуклеотид) окисленный; НАДН<sup>+</sup> (Никотинамидадениндинуклеотид) — восстановленный; АФК — активные формы кислорода, NO — оксид азота (II). NOS (Nitric Oxide Synthase) — синтаза оксида азота. Красные стрелки указывают на процессы, связанные с повышением уровня гомоцистеина. Зеленые стрелки указывают на возможные механизмы снижения уровня гомоцистеина.

В связи с вышеизложенным можно утверждать, что существуют убедительные предпосылки для изучения фармакотерапии нарушенных процессов фертильности у мужчин с включением в их состав L-аргинина, способного усиливать вазодилатирующие эффекты, блокировать процессы перекисного окисления липидов и избыточного образования АФК, а также восстанавливать активность ферментов митохондрий, корректируя развитие митохондриальной дисфункции, вызванной избыточной метиониновой нагрузкой.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке гранта Президента РФ МК-4805.2022.3.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Вклад авторов:** Звягина В. И. — разработка концепции и дизайна, подготовка рукописи, анализ данных, проведение биохимических исследований, окончательное утверждение для публикации рукописи; Шумаев К. Б. — разработка концепции, редактирование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания; Бельских Э. С. — анализ данных, подготовка рукописи, работа над рисунками; Урясьев О. М. — разработка концепции, редактирование рукописи; Ахмедова С. Р. — анализ данных, работа над рисунками; Марсянова Ю. А. — подготовка

рукописи, проведение биохимических исследований, воспроизведение экспериментальных моделей на крысах; Шитикова А. М. — подготовка рукописи, проведение биохимических исследований, воспроизведение экспериментальных моделей на крысах; Сучкова О. Н. — проведение биохимических исследований. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

**Funding.** The study was supported by the grant of the President of the Russian Federation МК-4805.2022.3.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflicts of interests.

**Contribution of the authors:** V. I. Zvyagina — concept and design development, manuscript preparation, data analysis, biochemical studies, final approval for manuscript publication; K. B. Shumayev — concept development, manuscript editing, critical intellectual content verification; E. S. Bel'skikh — data analysis, preparation of the manuscript, work on drawings; O. M. Uryas'yev — concept development, manuscript editing; S. R. Akhmedova — data analysis, student; Yu. A. Marsyanova — manuscript preparation, conduction of biochemical studies, reproduction of experimental models in rats; A. M. Shitikova — manuscript preparation, conduction of biochemical studies, reproduction of experimental models in rats; O. N. Suchkova — carrying out biochemical researches. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., et al. A unique view on male infertility around the globe // *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015. Vol. 13. P. 37. doi: [10.1186/s12958-015-0032-1](https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1)
2. Datta J., Palmer M.J., Tanton C., et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men // *Human Reproduction*. 2016. Vol. 31, № 9. P. 2108–2118. doi: [10.1093/humrep/dew123](https://doi.org/10.1093/humrep/dew123)
3. Aitken R.J., Baker M.A. The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility—A Unifying Hypothesis? // *Frontiers in Endocrinology*. 2020. Vol. 11. P. 581838. doi: [10.3389/fendo.2020.581838](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.581838)
4. Aitken R.J., Flanagan H.M., Connaughton H., et al. Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function // *Andrology*. 2016. Vol. 4, № 2. P. 345–360. doi: [10.1111/andr.12157](https://doi.org/10.1111/andr.12157)
5. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2020. Vol. 21, № 7. P. 363–383. doi: [10.1038/s41580-020-0230-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3)
6. Ramalho-Santos J., Varum S., Amaral S., et al. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells // *Human Reproduction Update*. 2009. Vol. 15, № 5. P. 553–572. doi: [10.1093/humupd/dmp016](https://doi.org/10.1093/humupd/dmp016)
7. Бельских Э.С., Звягина В.И., Урясьев О.М. Современные представления о патогенезе и подходах к коррекции митохондриальной дисфункции // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2016. № 1. С. 104–112.
8. Smits R.M., Mackenzie-Proctor R., Yazdani A., et al. Antioxidants for male subfertility // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019. Vol. 3, № 3. P. CD007411. doi: [10.1002/14651858.CD007411.pub4](https://doi.org/10.1002/14651858.CD007411.pub4)
9. Jung J.H., Seo J.T. Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: Promise or panacea? // *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2014. Vol. 41, № 3. P. 108–114. doi: [10.5653/cerm.2014.41.3.108](https://doi.org/10.5653/cerm.2014.41.3.108)
10. Agarwal A., Leisegang K., Majzoub A., et al. Utility of Antioxidants in the Treatment of Male Infertility: Clinical Guidelines Based on a Systematic Review and Analysis of Evidence // *The World Journal of Men's Health*. 2021. Vol. 39, № 2. P. 233–290. doi: [10.5534/wjmh.200196](https://doi.org/10.5534/wjmh.200196)
11. West S.G., Likos-Krick A., Brown P., et al. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men // *The Journal of Nutrition*. 2005. Vol. 135, № 2. P. 212–217. doi: [10.1093/jn/135.2.212](https://doi.org/10.1093/jn/135.2.212)
12. Lee S.J., Park S.H., Chung J.F., et al. Homocysteine-induced peripheral microcirculation dysfunction in zebrafish and its attenuation by L-arginine // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 35. P. 58264–58271. doi: [10.18632/oncotarget.16811](https://doi.org/10.18632/oncotarget.16811)
13. Elbashir S., Magdi Y., Rashed A., et al. Epididymal contribution to male infertility: An overlooked problem // *Andrologia*. 2021. Vol. 53, № 1. P. e13721. doi: [10.1111/and.13721](https://doi.org/10.1111/and.13721)
14. Park Y.-J., Pang M.-G. Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization // *Antioxidants*. 2021. Vol. 10, № 1. P. 98. doi: [10.3390/antiox10010098](https://doi.org/10.3390/antiox10010098)
15. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2014. № 4. С. 42–46.
16. Sun X., Sharma S., Fratz S., et al. Disruption of endothelial cell mitochondrial bioenergetics in lambs with increased pulmonary blood flow // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013. Vol. 18, № 14. P. 1739–1752. doi: [10.1089/ars.2012.4806](https://doi.org/10.1089/ars.2012.4806)
17. Прохорова М.И., Золотова Л.А., Флеров М.А., и др.; Прохорова М.И., ред. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)*. Л.: Издательство Ленинградского государственного университета; 1982.
18. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2005. № 6. С. 15–17.
19. Серебров В.Ю., Суханова Г.А., ред. *Биоэнергетика клетки*. Томск: Сибирский государственный медицинский университет; 2008. С. 79–82.
20. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопросы медицинской химии*. 1990. Т. 36, № 2. С. 88–91.
21. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота. М.: ГЗОТАР-Медиа; 2018.
22. Wan L., Hubbard R.W. Determination of free and total carnitine with a random-access chemistry analyzer // *Clinical Chemistry*. 1998. Vol. 44, № 4. P. 810–816.
23. Звягина В.И., Бельских Э.С., Урясьев О.М., и др. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2018. Т. 13, № 1-1. С. 78–81. doi: [10.14300/mnnc.2018.13022](https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13022)
24. Zvyagina V.I., Belskikh E.S. Carnitine Chloride Reduces the Severity of Experimental Hyperhomocysteinemia and Promotes Lactate Utilization by the Mitochondrial Fraction of the Rat Epididymis // *Biochemistry (Moscow). Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021. Vol. 15. P. 326–336. doi: [10.1134/S1990750821040119](https://doi.org/10.1134/S1990750821040119)
25. Zvyagina V.I., Belskikh E.S. Comparative Assessment of the Functional Activity of Rat Epididymal Mitochondria in Oxidative Stress Induced by Hyperhomocysteinemia and L-NAME Administration // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022. Vol. 58. P. 364–379. doi: [10.1134/S0022093022020065](https://doi.org/10.1134/S0022093022020065)
26. Banjarnahor S., Rodionov R.N., König J., et al. Transport of L-Arginine Related Cardiovascular Risk Markers // *Journal of Clinical Medicine*. 2020. Vol. 9, № 12. P. 3975. doi: [10.3390/jcm9123975](https://doi.org/10.3390/jcm9123975)
27. Liu X., Hou L., Xu D., et al. Effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on heart failure development // *Nitric Oxide*. 2016. Vol. 54. P. 73–81. doi: [10.1016/j.niox.2016.02.006](https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.006)
28. Урясьев О.М., Шаханов А.В., Канатбекова Ж.К. Оксид азота и регуляторы его синтеза при хронической обструктивной болезни легких // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2021. Т. 29, № 3. С. 427–434. doi: [10.17816/PAVLOVJ62681](https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ62681)
29. Tain Y.-L., Hsu C.-N. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA) // *Toxins*. 2017. Vol. 9, № 3. P. 92. doi: [10.3390/toxins9030092](https://doi.org/10.3390/toxins9030092)
30. Tain Y.-L., Hsu C.-N. Interplay between Oxidative Stress and Nutrient Sensing Signaling in the Developmental Origins of Cardiovascular Disease // *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, № 4. P. 841. doi: [10.3390/ijms18040841](https://doi.org/10.3390/ijms18040841)
31. Fulton M.D., Brown T., Zheng Y.G. The Biological Axis of Protein Arginine Methylation and Asymmetric Dimethylarginine // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, № 13. P. 3322. doi: [10.3390/ijms20133322](https://doi.org/10.3390/ijms20133322)
32. Robinson J.W., Felber J.P. A survey of the effect of other amino-acids on the absorption of L-arginine and L-lysine by the rat intestine // *Gastroenterologia*. 1964. Vol. 101. P. 330–338. doi: [10.1159/000202330](https://doi.org/10.1159/000202330)

33. Robinson J.W. Interactions between neutral and dibasic amino acids for uptake by the rat intestine // *European Journal of Biochemistry*. 1968. Vol. 7, № 1. P. 78–89. doi: [10.1111/j.1432-1033.1968.tb19577.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb19577.x)

34. Stühlinger M.C., Tsao P.S., Her J.H., et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine // *Circulation*. 2001. Vol. 104, № 21. P. 2569–2575. doi: [10.1161/hc4601.098514](https://doi.org/10.1161/hc4601.098514)

35. Liang M., Wang Z., Li H., et al. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway // *Food and Chemical*

*Toxicology*. 2018. Vol. 115. P. 315–328. doi: [10.1016/j.fct.2018.03.029](https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.029)

36. Shumayev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., et al. Possible mechanism of antioxidant action of dinitrosyl iron complexes // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021. Vol. 15. P. 313–319. doi: [10.1134/S1990750821040090](https://doi.org/10.1134/S1990750821040090)

37. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumayev K.B., et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes Bound with Hemoglobin on Oxidative Modification by Peroxynitrite // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 24. P. 13649. doi: [10.3390/ijms222413649](https://doi.org/10.3390/ijms222413649)

## REFERENCES

1. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, et al. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015;13:37. doi: [10.1186/s12958-015-0032-1](https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1)
2. Datta J, Palmer MJ, Tanton C, et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human Reproduction*. 2016;31(9):2108–18. doi: [10.1093/humrep/dew123](https://doi.org/10.1093/humrep/dew123)
3. Aitken RJ, Baker MA. The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility—A Unifying Hypothesis? *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11:581838. doi: [10.3389/fendo.2020.581838](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.581838)
4. Aitken RJ, Flanagan HM, Connaughton H et al. Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function. *Andrology*. 2016;4(2): 345–60. doi: [10.1111/andr.12157](https://doi.org/10.1111/andr.12157)
5. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2020;21(7):363–83. doi: [10.1038/s41580-020-0230-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3)
6. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, et al. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*. 2009;15(5):553–72. doi: [10.1093/humupd/dmp016](https://doi.org/10.1093/humupd/dmp016)
7. Belskikh ES, Zvyagina VI, Uryas'ev OM. Modern concepts of the pathogenesis and approaches to correction of mitochondrial dysfunction. *Nauka Molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2016;(1):104–12. (In Russ).
8. Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, et al. Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;3(3):CD007411. doi: [10.1002/14651858.CD007411.pub4](https://doi.org/10.1002/14651858.CD007411.pub4)
9. Jung JH, Seo JT. Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: Promise or panacea? *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2014;41(3):108–14. doi: [10.5653/cepm.2014.41.3.108](https://doi.org/10.5653/cepm.2014.41.3.108)
10. Agarwal A, Leisegang K, Majzoub A, et al. Utility of Antioxidants in the Treatment of Male Infertility: Clinical Guidelines Based on a Systematic Review and Analysis of Evidence. *The World Journal of Men's Health*. 2021;39(2):233–90. doi: [10.5534/wjmh.200196](https://doi.org/10.5534/wjmh.200196)
11. West SG, Likos-Krick A, Brown P, et al. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. *The Journal of Nutrition*. 2005;135(2):212–7. doi: [10.1093/jn/135.2.212](https://doi.org/10.1093/jn/135.2.212)
12. Lee SJ, Park SH, Chung JF, et al. Homocysteine-induced peripheral microcirculation dysfunction in zebrafish and its attenuation by L-arginine. *Oncotarget*. 2017;8(35):58264–71. doi: [10.18632/oncotarget.16811](https://doi.org/10.18632/oncotarget.16811)
13. Elbashir S, Magdi Y, Rashed A, et al. Epididymal contribution to male infertility: An overlooked problem. *Andrologia*. 2021;53(1):e13721. doi: [10.1111/and.13721](https://doi.org/10.1111/and.13721)
14. Park Y–J, Pang M–G. Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization. *Antioxidants*. 2021;10(1):98. doi: [10.3390/antiox10010098](https://doi.org/10.3390/antiox10010098)
15. Medvedev DV, Zvyagina VI, Fomina MA. Modeling of severe hyperhomocysteinemia in rats. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2014;(4):42–6. (In Russ).
16. Sun X, Sharma S, Fratz S, et al. Disruption of endothelial cell mitochondrial bioenergetics in lambs with increased pulmonary blood flow. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(14):1739–52. doi: [10.1089/ars.2012.4806](https://doi.org/10.1089/ars.2012.4806)
17. Prokhorova MI, Zolotova LA, Flerov MA, et al.; Prokhorova MI, editor. *Metody biokhichimicheskikh issledovaniy (lipidnyy i energeticheskoy obmen)*. Leningrad: Izdatel'stvo Leningradskogo gosudarstvennogo universiteta; 1982. (In Russ).
18. Metelskaya VA, Gumanova NG. Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2005;(6):15–7. (In Russ).
19. Serebrov VYu, Sukhanova GA, editors. *Bioenergetika kletki*. Tomsk: Sibirskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2008. P. 79–92. (In Russ).
20. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Voprosy Meditsinskoi Khimii*. 1990;36(2):88–91. (In Russ).
21. Fomina MA, Abalenikhina YuV. *Okislitel'naya modifikatsiya belkov tkaney pri izmenenii sinteza oksida azota*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (In Russ).
22. Wan L, Hubbard RW. Determination of free and total carnitine with a random-access chemistry analyzer. *Clinical Chemistry*. 1998;44(4):810–6.
23. Zvyagina VI, Belskikh ES, Uryasev OM, et al. Influence of carnitine chloride on mitochondria of the heart of rats during the modeling of hyperhomocysteinemia. *Medical News of the North Caucasus*. 2018; 13(1):78–81. doi: [10.14300/mnnc.2018.13022](https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13022)
24. Zvyagina VI, Belskikh ES. Carnitine Chloride Reduces the Severity of Experimental Hyperhomocysteinemia and Promotes Lactate Utilization by the Mitochondrial Fraction of the Rat Epididymis. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021;15:326–36. doi: [10.1134/S1990750821040119](https://doi.org/10.1134/S1990750821040119)
25. Zvyagina VI, Belskikh ES. Comparative Assessment of the Functional Activity of Rat Epididymal Mitochondria in Oxidative Stress Induced by Hyperhomocysteinemia and L-NAME Administration. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022;58:364–79. doi: [10.1134/S0022093022020065](https://doi.org/10.1134/S0022093022020065)

26. Banjarnahor S, Rodionov RN, König J, et al. Transport of L-Arginine Related Cardiovascular Risk Markers. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(12):3975. doi: [10.3390/jcm9123975](https://doi.org/10.3390/jcm9123975)
27. Liu X, Hou L, Xu D, et al. Effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on heart failure development. *Nitric Oxide*. 2016;54:73–81. doi: [10.1016/j.niox.2016.02.006](https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.006)
28. Uryas'yev OM, Shakhanov A, Kanatbekova ZK. Nitric oxide and regulators of its synthesis in chronic obstructive pulmonary disease. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2021;29(3):427–34. (In Russ). doi: [10.17816/PAVLOVJ62681](https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ62681)
29. Tain Y–L, Hsu C–N. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). *Toxins*. 2017;9(3):92. doi: [10.3390/toxins9030092](https://doi.org/10.3390/toxins9030092)
30. Tain Y–L, Hsu C–N. Interplay between Oxidative Stress and Nutrient Sensing Signaling in the Developmental Origins of Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(4):841. doi: [10.3390/ijms18040841](https://doi.org/10.3390/ijms18040841)
31. Fulton MD, Brown T, Zheng YG. The Biological Axis of Protein Arginine Methylation and Asymmetric Dimethylarginine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(13):3322. doi: [10.3390/ijms20133322](https://doi.org/10.3390/ijms20133322)
32. Robinson JW, Felber JP. A survey of the effect of other amino-acids on the absorption of L-arginine and L-lysine by the rat intestine. *Gastroenterologia*. 1964;101:330–8. doi: [10.1159/000202330](https://doi.org/10.1159/000202330)
33. Robinson JW. Interactions between neutral and dibasic amino acids for uptake by the rat intestine. *European Journal of Biochemistry*. 1968;7(1):78–89. doi: [10.1111/j.1432-1033.1968.tb19577.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb19577.x)
34. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001;104(21):2569–75. doi: [10.1161/hc4601.098514](https://doi.org/10.1161/hc4601.098514)
35. Liang M, Wang Z, Li H, et al. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;115:315–28. doi: [10.1016/j.fct.2018.03.029](https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.029)
36. Shumayev KB, Kosmachevskaya OV, Grachev DI, et al. Possible mechanism of antioxidant action of dinitrosyl iron complexes. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021;15:313–9. doi: [10.1134/S1990750821040090](https://doi.org/10.1134/S1990750821040090)
37. Kosmachevskaya OV, Nasybullina EI, Shumayev KB, et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes Bound with Hemoglobin on Oxidative Modification by Peroxynitrite. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(24):13649. doi: [10.3390/ijms222413649](https://doi.org/10.3390/ijms222413649)

## ОБ АВТОРАХ

**\*Звягина Валентина Ивановна**, к.б.н., доцент;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2800-5789>;  
eLibrary SPIN: 7553-8641; e-mail: vizvyagina@yandex.ru

**Шумаев Константин Борисович**, д.б.н.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8835-5188>;  
eLibrary SPIN: 7765-3295; e-mail: tomorov@mail.ru

**Бельских Эдуард Сергеевич**, к.м.н.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1803-0542>;  
eLibrary SPIN: 9350-9360; e-mail: ed.bels@yandex.ru

**Урясьев Олег Михайлович**, д.м.н., профессор;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8693-4696>;  
eLibrary SPIN: 7903-4609; e-mail: uvryasev08@yandex.ru

**Ахмедова Сабина Руслановна**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6437-8120>;  
e-mail: danfeyt@mail.ru

**Марсянова Юлия Александровна**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4948-4504>;  
eLibrary SPIN: 4075-3169; e-mail: yuliyamarsyanova@yahoo.com

**Шитикова Анна Михайловна**, к.б.н.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4004-9058>;  
eLibrary SPIN: 3416-3961; e-mail: anyakudlaeva@mail.ru

**Сучкова Ольга Николаевна**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5227-7288>;  
eLibrary SPIN: 2282-3653; e-mail: suchkovaon@gmail.com

## AUTHOR'S INFO

**\*Valentina I. Zvyagina**, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2800-5789>;  
eLibrary SPIN: 7553-8641; e-mail: vizvyagina@yandex.ru

**Konstantin B. Shumayev**, Dr. Sci. (Biol.);  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8835-5188>;  
eLibrary SPIN: 7765-3295; e-mail: tomorov@mail.ru

**Eduard S. Belskikh**, MD, Cand. Sci. (Med.);  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1803-0542>;  
eLibrary SPIN: 9350-9360; e-mail: ed.bels@yandex.ru

**Oleg M. Uryasyev**, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8693-4696>;  
eLibrary SPIN: 7903-4609; e-mail: uvryasev08@yandex.ru

**Sabina R. Akhmedova**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6437-8120>;  
e-mail: danfeyt@mail.ru

**Yuliya A. Marsyanova**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4948-4504>;  
eLibrary SPIN: 4075-3169; e-mail: yuliyamarsyanova@yahoo.com

**Anna M. Shitikova**, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4004-9058>;  
eLibrary SPIN: 3416-3961; e-mail: anyakudlaeva@mail.ru

**Ol'ga N. Suchkova**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5227-7288>;  
eLibrary SPIN: 2282-3653; e-mail: suchkovaon@gmail.com

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author