

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2014

УДК: 577.1+578

**СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ
ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ У КРЫС**

Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

На сегодняшний день доказано, что у человека повышенный уровень гомоцистеина в крови является независимым фактором риска ряда заболеваний. Для изучения аспектов участия гомоцистеина в повреждении органов и тканей при различных заболеваниях может потребоваться моделирование на животных столь редко встречающейся у человека тяжелой формы гипергомоцистеинемии, при которой эффекты этого патогенетического фактора будут наиболее выражены. В данной статье описана методика моделирования на самцах крыс линии Wistar тяжелой формы гипергомоцистеинемии путём трёхнедельного внутрижелудочного введения суспензии метионина с добавлением этой аминокислоты в питьевую воду.

Ключевые слова: гомоцистеин, тяжёлая гипергомоцистеинемия, моделирование.

Гомоцистеин представляет собой непротеиногенную аминокислоту, образующуюся при метаболизме метионина. Интерес к этому соединению резко возрос, начиная с 60-х гг. XX века, когда появились первые сообщения о наличии определённой корреляции между концентрацией гомоцистеина в плазме крови и частотой развития сердечно-сосудистых заболеваний. Ещё в 1964 году S.H. Mudd et al. продемонстрировали, что причиной гомоцистеинурии может являться наследственная недостаточность фермента цистатионин-бета-синтазы. Было обнаружено, что эта патология сопровождается атеросклеротическим поражением сосудов и часто встречающимися тромбозами и часто встречающимися осложнениями [7]. В дальнейшем McCully обнаружил, что поражения артерий при наследственном дефекте цистатионин-бета-синтазы аналогичны таковым у пациентов с гипергомоцистеинемией, вызванной другими причинами. Так как больных объединял только высокий уровень гомоцистеина, это позволило исследователю предположить, что именно гомоцистеин или один из продуктов

его метаболизма является причиной поражения сосудов и повышенного тромбообразования [7].

На сегодняшний день повышенный уровень гомоцистеина в плазме считается независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний: ишемической болезни сердца (в т.ч. инфаркта миокарда), церебрального ишемического инсульта, облитерирующего атеросклероза нижних конечностей, тромбоза артерий и вен [5], хронической сердечной недостаточности [9] и ухудшает прогноз при этих патологиях [12]. Сформулирована гомоцистеиновая теория развития атеросклероза. Кроме того, имеются данные об участии гомоцистеина в патогенезе заболеваний других органов: неалкогольной жировой болезни печени [4], остеопороза [2], осложнений при беременности [3].

Течение перечисленных заболеваний и их исход во многом зависят от степени тяжести гипергомоцистеинемии. Нормальный уровень гомоцистеина в плазме крови человека составляет 5-15 мкмоль/л. Различают лёгкую (15-30 мкмоль/л), среднюю (30-100 мкмоль/л) и тяжёлую (>100

мкмоль/л) форму гипергомоцистеинемии [1, 7]. Наиболее часто встречаются лёгкая (10% населения), реже умеренная (1%) и совсем редко – тяжёлая форма данной патологии (0,02%) [7]. Основной причиной тяжёлой гипергомоцистеинемии является наследственная недостаточность цистатионин-бета-синтазы.

Несмотря на большой объём исследований, посвящённых гипергомоцистеинемии, до сих пор остаются невыясненными механизмы повреждения органов и тканей под действием высоких концентраций гомоцистеина. В целом отрицательный эффект гомоцистеина можно объяснить с позиции трёх гипотез: стрессовой (оксидативный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума), гипотезы молекулярных мишеней (основана на способности гомоцистеина связываться со свободными остатками цистеина или разрушать дисульфидные связи, изменяя таким образом структуру и функции белков) и гипотезы, основанной на нарушении процессов метилирования ДНК, РНК, белков и других метаболитов [10].

Скорее всего остальные аспекты негативного действия этой аминокислоты (снижение действия оксида азота, угнетение продукции простациклина на фоне увеличения образования тромбосана A₂, усиление синтеза жирных кислот, триацилглицеринов и холестерина, развитие вторичной митохондриальной дисфункции и др.) являются следствием трёх вышеуказанных.

Таким образом, для изучения аспектов участия гомоцистеина в повреждении органов и тканей при различных заболеваниях может потребоваться моделирование столь редко встречающейся тяжёлой формы гипергомоцистеинемии, при которой эти аспекты будут наиболее выражены.

На сегодняшний день известны способы моделирования гипергомоцистеинемии у крыс путём внутрибрюшинного введения гомоцистеина в дозе 1 мкг/мл ОЦК в течение 10 суток [6]. Несомненным преимуществом такой модели является исключение иных факторов влияния кроме гипергомоцистеинемии. Однако введение гомоцистеина в указанной дозе

вызывает развитие умеренной формы гипергомоцистеинемии ($39,1 \pm 1,34$ мкмоль/л). К тому же, гомоцистеин не производится в РФ и весьма дорог. В связи с этим актуальным становится использование моделей гипергомоцистеинемии, основанных на введении высоких доз метионина. Метионин можно добавлять в пищу и питьевую воду [11]. Но при этом невозможно рассчитывать на сколько-нибудь точное дозирование препарата. Поэтому интерес представляет моделирование гипергомоцистеинемии путём внутрижелудочного введения суспензии метионина. Одна из таких моделей запатентована в РФ и позволяет достичь умеренной гипергомоцистеинемии [8].

С учётом сказанного выше, нами была поставлена цель разработать методику моделирования тяжёлой формы гипергомоцистеинемии, основанной на внутрижелудочном введении суспензии метионина.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 36 самцов крыс линии Wistar массой 250-300 г. Работа с животными проводилась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и приказом Минздрава СССР от 12.08.1977г № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Крысы были разделены на 6 групп по 6 животных. Трёх экспериментальным группам моделировали гипергомоцистеинемия путём ежедневного 2 раза в сутки внутрижелудочного введения суспензии метионина в дозе 1,5 г на кг массы тела животного; первой группе в течение 1 недели, второй – 2 недели, третьей – 3 недели. Состав суспензии (по массе): 25% метионина, 65% 1%-ного водного раствора крахмала и 10% твина 80. Помимо суспензии крысы третьей группы получали

1%-ный раствор метионина вместо питьевой воды. Каждой экспериментальной группе соответствовала контрольная. Крысам контрольных групп по аналогичной схеме вводился растворитель указанной суспензии без метионина.

На следующий день по истечении срока эксперимента крыс обескровливали под эфирным рауш-наркозом путём пересечения брюшного отдела аорты. Кровь отбирали в центрифужную пробирку, давали ей свернуться и центрифугировали. Полученную сыворотку использовали для определения концентрации общего гомоцистеина. Определение проводили с помощью набора для иммуноферментного анализа производства «Axis Shield». Метод позволяет суммарно определить свободный, связанный с белком гомоцистеин и гомоцистин.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ MS Excel 2007 и StatPlus 2009 Portable 5.8.3. Соответствие распределения нормальному проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как в 4 группах из 6 групп распределение уровня общего гомоцистеина в сыворотке отличалось от нормального, для оценки статистической значимости отличий независимых групп использовали критерий Крускала-Уоллиса (H), а для последующего сравнения групп – непараметрический аналог критерия Ньюмена-Кейлса. Отличия считали статистически значимыми при вероятности нулевой гипотезы (p) < 0,05.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Концентрация общего гомоцистеина в сыворотке крови контрольных крыс и крыс, получавших метионин, в мкмоль/л ($H=28,01$; $p<0,001$)

Группа животных	Медиана	Первый квартиль	Третий квартиль	p при попарном сравнении групп
1) Суспензия метионина внутрижелудочно 1,5 г/кг 2 р. д. 7 сут.	10,7	10,0	12,2	$p_{1-2}<0,01$ $p_{1-3}>0,05$ $p_{1-4}<0,01$ $p_{1-5}<0,05$ $p_{1-6}<0,01$
2) Растворитель суспензии внутрижелудочно 6 мл/кг 2 р. д. 7 сут.	6,9	6,7	7,2	$p_{2-3}<0,01$ $p_{2-4}>0,05$ $p_{2-5}<0,01$ $p_{2-6}>0,05$
3) Суспензия метионина внутрижелудочно 1,5 г/кг 2 р. д. 14 сут.	11,1	8,3	13,7	$p_{3-4}<0,05$ $p_{3-5}<0,01$ $p_{3-6}<0,05$
4) Растворитель суспензии внутрижелудочно 6 мл/кг 2 р. д. 14 сут.	6,8	6,5	7,2	$p_{4-5}<0,01$ $p_{4-6}>0,05$
5) Суспензия метионина внутрижелудочно 1,5 г/кг 2 р. д. 21 сут. с добавлением 1% метионина в питьевую воду	283,1	225,8	334,4	$p_{5-6}<0,01$
6) Растворитель суспензии внутрижелудочно 6 мл/кг 2 р. д. 21 сут.	5,8	5,6	6,8	

Как видно из таблицы 1, показатели трёх контрольных групп почти не отличаются друг от друга (введение растворителя – водного раствора твина 80 и крахмала – приводит к незначительному и статистически недостоверному снижению концентрации гомоцистеина в сыворотке крови крыс).

В то же время, у всех животных, получавших метионин, уровень гомоцистеина статистически достоверно повысился относительно всех групп контроля. Внутрижелудочное введение суспензии метионина в течение одной и двух недель вызывает повышение уровня гомоцистеина соответ-

ственно на 55,1 и 63,2% относительно контрольных групп, но при двухнедельном введении наблюдался несколько больший разброс результатов по сравнению с группой, получавшей метионин 1 неделю, а значимых отличий между этими группами выявлено не было.

Пролонгирование введения суспензии метионина до 3 недель с добавлением этой аминокислоты в питьевую воду вызвало резкое увеличение уровня гомоцистеина не только по сравнению с контрольной группой (в 48,8 раз), но и по сравнению с животными, получавшими суспензию метионина 1 и 2 недели.

Обобщая вышесказанное, можно отметить, что внутрижелудочное введение суспензии метионина в течение 1 и 2 недель повышает концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови крыс, но не вызывает развития гипергомоцистеинемии характерной для человека (уровень гомоцистеина не достигает 15 мкмоль/л). Трёхнедельное внутрижелудочное введение суспензии метионина с добавлением его в питьевую воду в 1%-ной концентрации приводит к многократному увеличению уровня гомоцистеина до концентраций, соответствующих у человека тяжёлой форме гипергомоцистеинемии (>100 мкмоль/л).

Выводы

Предложенная экспериментальная модель, включающая трёхнедельное внутрижелудочное введение суспензии метионина и замену питьевой воды на 1%-ный раствор метионина может использоваться для воспроизведения у крыс гипергомоцистеинемии с концентрацией гомоцистеина, превышающей 100 мкмоль/л, что для человека соответствует тяжёлой форме этого патологического состояния.

Литература

1. Баранова Е.И. Клиническое значение гомоцистеинемии / Е.И. Баранова, О.О. Большакова // Артериальная гипертензия. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 12-15.
2. Венозные тромбоэмболические осложнения после тотального эндопротезирования коленного сустава у пациентов с остеопорозом / Н.А. Вархушев [и

др.] // Тихоокеанский мед. журн. – 2014. – №2. – С. 14-17.

3. Гипергомоцистеинемия и фолиевая кислота при невынашивании беременности / Ю.Э. Доброхотова [и др.] // Рос. вестн. акушера-гинеколога. – 2007. – №5. – С. 9-12.
4. Глущенко С. В. Патогенетические механизмы развития неалкогольной жировой болезни печени / С. В. Глущенко // Новости медицины и фармации. – 2012. – № 414: Гастроэнтерология. – С. 48-49.
5. Костюченко Г.И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция / Г.И. Костюченко // Клинич. геронтология. – 2007. – Т. 13, №4. – С. 32-40.
6. Кривошеева Е.М. Спектр фармакологической активности растительных адаптогенов / Е.М. Кривошеева, Е.В. Фёфелова, С.Т. Кохан // Фундаментальные исследования. – 2011. – №6. – С. 85-88.
7. Лебедева А.Ю. Гипергомоцистеинемия: современный взгляд на проблему / А.Ю. Лебедева, К.В. Михайлова // Рос. кардиол. журн. – 2006 (Внеочередной вып.). – С. 149-157.
8. Пат. 2414755 РФ, МПК ¹¹ G09B23/28. Способ моделирования гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции / С.Г. Емельянов [и др.]; патентообладатель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Юго-Западный государственный университет» (ЮЗГУ) (RU); №2009138639/14; заявл. 19.10.2009; опубл. 20.03.2011, Бюл. 8.
9. A review of homocysteine and heart failure / M. Herrmann [et al.] // European Journal of Heart Failure. – 2006. – Vol. 8, Issue 6. – P. 571-576.
10. Converging evidence of mitochondrial dysfunction in a yeast model of homocysteine metabolism imbalance / K. Arun [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 286, №24. – P. 21779-21795.

11. Dayal S. Murine Models of Hyperhomocysteinemia and Their Vascular Phenotypes / S. Dayal // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2008. – Vol. 28. – P. 1596-1605.
12. Nonfasting plasma total homocysteine level and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem / J. Kark [et al.] // *Ann Int Med*. – 1999. – Vol. 131, №5. – P. 321-330.

MODELING OF SEVERE HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN RATS

D.V. Medvedev, V.I. Zvyagina, M.A. Fomina

To date it's proved that the elevated homocysteine levels in the blood is an independent risk factor for a number of diseases. The animal model of rare severe form of hyperhomocysteinemia may be necessary to study aspects of homocysteine participation in damage of organs and tissues in various diseases because the effects of this pathogenetic factor will be most pronounced in such conditions. This article describes a technique for modeling in male Wistar rats a severe form of hyperhomocysteinemia by a three-week intragastric administration of methionine suspension with the addition of this amino acid in the drinking water.

Keywords: *homocysteine, severe form of hyperhomocysteinemia, modeling.*

Медведев Д.В. – ассист. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9.
E-mail: meddmit@mail.ru.

Звягина В.И. – к.б.н., доц. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9.
E-mail: vizvyagina@yandex.ru.

Фомина М.А. – к.м.н., доц. кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9.
E-mail: marya.fom@yandex.ru.