

На правах рукописи

ЗВЯГИНА ВАЛЕНТИНА ИВАНОВНА

**РОЛЬ КАРНИТИНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МИТОХОНДРИЙ
В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДЕФИЦИТА NO (II) И
ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Рязань – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор биологических наук **Шумаев Константин Борисович**

Официальные оппоненты:

Синицкий Антон Иванович, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии имени Р.И. Лифшица, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

Терехина Наталья Александровна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биологической химии

Котова Юлия Александровна, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, к. 2) и на сайте www.rzgtmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Н.В. Короткова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Митохондрии являются жизненно важными органеллами эукариотических клеток. Помимо производства энергии и клеточного дыхания, они выполняют и другие ключевые функции, в том числе сигнальные. Митохондрии модулируют клеточный метаболизм, генез активных форм кислорода (АФК), апоптоз, обеспечивают адаптацию к различным стрессам и участие в процессе роста, деления и гибели клеток (Goldenthal M.J. et al., 2004; Manoli I. et al., 2007; Anderson A.J. et al., 2019). Нарушения в регуляции данных процессов может приводить к возникновению митохондриальной дисфункции. При этом изучение митохондриальной биологии в нативных физиологических или патологических контекстах, а не в клеточных культурах остается актуальным вопросом (Rossmann M.P. et al., 2021).

Накопившиеся научные данные свидетельствуют о том, что активность митохондрий может модулироваться как АФК, так и оксидом азота (NO) (Figueira T.R. et al., 2013; Sies H. et al., 2017). При окислительном же или нитрозативном стрессе уровни АФК и активных форм азота (АФА) выходят за пределы физиологического диапазона, что приводит к нарушению редокс-сигналикации и изменению основных функций как митохондрий, так и клетки в целом (Lacza Z. et al., 2006; Andreev A.I. et al., 2015; Peoples J.N. et al., 2019; Zhao R.Z. et al., 2019).

Для более полного изучения регуляторной роли NO в митохондриях важным является исследование факторов, способных оказывать влияние на уровень генерации NO. Одним из них является повышенный уровень гомоцистеина, повреждающее действие которого связывают с активацией окислительного стресса, ведущего к повреждению эндотелия и развитию эндотелиальной дисфункции (Stühlinger M.C. et al., 2001; Jin L. et al., 2007). При этом системные эффекты, связанные с гомоцистеин - индуцированной митохондриальной дисфункцией в других типах клеток и тканях остаются малоизученными (Kaplan P. et al., 2020).

Содержание фракций карнитина (общего, свободного и связанного с различными ацильными остатками) представляет собой компонент, имеющий важное значение для поддержания нормального функционирования митохондрий, и участвующий в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма к неблагоприятным воздействиям (Lohninger A. et al., 2005; Adeva-Andany M.M. et al., 2017). К основным функциям L-карнитина принято относить транспорт остатков жирных кислот внутрь митохондрий (Rebouche C.J., 2004). Наряду с этим, недавно установлено, что L-карнитин может предупреждать развитие митохондриальной дисфункции, ассоциированной с оксидативным стрессом, вызванным различными повреждающими агентами, однако, механизмы этого остаются не изученными (Ng C.M. et al., 2004; Surai P.F. et al., 2015, 2019; Wang Z.Y. et al., 2018).

В последние годы появились экспериментальные работы, демонстрирующие взаимосвязь между нарушением NO-сигнализации и развитием митохондриальной дисфункции в условиях изменения гомеостаза карнитина (Sharma S. et al., 2013), но данные результаты требуют дальнейшего изучения с целью уточнения роли L-карнитина в функционировании митохондрий и перспектив целенаправленного его использования в фармакотерапии заболеваний.

Таким образом, исследование взаимосвязи активности митохондриальных ферментов, характеризующих функциональный статус митохондрий, содержания карнитина, окислительно-модифицированных белков с уровнем продукции оксида азота (II) при состояниях, ассоциированных с индуцированным окислительным стрессом, а также поиск факторов, способных оказывать корректирующее воздействие на указанные патологические процессы, представляется актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение. Разработка данного направления способна расширить понимание механизмов действия карнитина и демонстрирует перспективность изучения возможностей его применения в митохондриально-ориентированной терапии.

Степень разработанности темы

Поскольку митохондрии являются местом производства и утилизации АФК и АФА, они могут одновременно быть источником и мишенью АФК. При умеренной или низкой концентрации АФК оказывают благотворное воздействие и участвуют в различных физиологических функциях (Sena L.A. et al., 2012; Ježek P. et al., 2020), а при более высокой концентрации как АФК, так и АФА вызывают потенциальное повреждение биомолекул и развитие заболеваний (Lankin V., Tikhaze A., 2017; Suomalainen A. et al., 2018; Lankin V. et al., 2022). Белки являются одной из главных мишеней для окислительного повреждения, а остатки цистеина особенно чувствительны к обратимому и необратимому окислению (Levine R.L., 2002; Kehm R. et al., 2021). Коллективом авторов кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Короткова Н.В., 2018) был разработан метод оценки уровня карбонильных производных белков и изучено изменение их количества в различных экспериментальных условиях в качестве наиболее стабильных и удобных маркеров выраженности окислительного стресса (Арапова А.И., 2017; Ильичева А.С., 2017; Кудлаева А.М., 2018), однако окислительная модификация белков (ОМБ) митохондрий остается недостаточно изученной.

Большое значение в регуляции функций митохондрий придается оксиду азота (NO) (Le H. et al., 2011; Figueira T.R. et al., 2013; Radi R. et al., 2018). В этом отношении представляется перспективным исследование функций митохондрий в условиях, связанных с изменением биодоступности NO (NO₂). Среди факторов, нарушающих регуляторные эффекты NO (NO₂) в настоящее время установлена роль гомоцистеина для митохондрий эндотелия (Jin L. et al., 2007; Esse R. et al., 2019). Показано, что митохондрии являются одной из первых мишеней для прямого повреждающего действия этой аминокислоты (Медведев Д.В., 2018). При этом системные эффекты, связанные с гомоцистеин-индуцированной митохондриальной дисфункцией, остаются малоизученными.

Концептуальный интерес представляет и ряд работ (Sharma S. et al., 2012), посвященных моделированию легочной гипертензии на животных, продемонстрировавших связь между нарушением NO-сигнализации и развитием митохондриальной дисфункции в условиях изменения гомеостаза карнитина, что стало предпосылкой для исследования роли карнитина в функционировании митохондрий и перспектив целенаправленного его использования в фармакотерапии заболеваний, в частности при сердечно-сосудистой патологии, метаболически ассоциированной жировой болезни печени и нарушениях фертильности в рамках данного исследования.

Цель исследования: изучить состояние и механизмы изменения митохондриальной активности и оценить роль карнитина в различных тканях в условиях экспериментально измененной генерации оксида азота и повышенного содержания гомоцистеина.

Задачи исследования:

1. Исследовать изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс в условиях дефицита NO, вызванного метиловым эфиром N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME) и его коррекции субстратом NO-синтаз – L-аргинином.

2. Оценить содержание общего эндогенного карнитина и его фракций в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени, эпидидимиса при экспериментальном дефиците NO и на фоне совместного применения L-аргинина и L-NAME.

3. Изучить влияние экзогенного карнитина на биохимические показатели сыворотки крови, митохондрий и цитоплазмы клеток сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота.

4. Оценить изменения биохимических показателей в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени и эпидидимиса крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии, вызванной длительным введением метионина и проанализировать влияние L-аргинина в этих условиях.

5. Исследовать содержание фракций эндогенного карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток сердца, печени, эпидидимиса при экспериментальной гипергомоцистеинемии, а также воздействие на него L-аргинина.

6. Изучить влияние экзогенного карнитина на биохимические показатели сыворотки крови, митохондрий и цитоплазмы клеток сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

7. Сопоставить изменения изучаемых показателей в митохондриях тканей сердца, печени и эпидидимиса, происходящие при экспериментальном ингибировании NO-синтаз и гипергомоцистеинемии. Провести анализ взаимосвязи между уровнем карнитина и метаболитов оксида азота, а также содержанием гомоцистеина в сыворотке крови в исследуемых экспериментальных моделях.

Научная новизна исследования

Установлено, что дефицит NO, опосредованный введением L-NAME, сопровождается снижением активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах: СДГ и H⁺-АТФазы, что наиболее выражено при использовании высокой дозы L-NAME – 200 мг/кг и развитием окислительного стресса.

Впервые выявлено, что подавление генерации NO ведет к снижению общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов крыс, в митохондриях подобные изменения были зафиксированы только в головке эпидидимиса; введение L-аргинина совместно с L-NAME предупреждает снижение эндогенного уровня общего карнитина, что было более выражено на фоне использования L-NAME в дозе 200 мг/кг.

Впервые обнаружен ранее неизвестный феномен того, что назначение карнитина хлорида в условиях экспериментального L-NAME-опосредованного дефицита NO приводит к снижению уровня молочной кислоты в цитоплазме клеток печени, головки эпидидимиса, при дозе L-NAME 200 мг/кг также и в сердце. При этом уровень лактата в митохондриальной фракции возрастает в

сердце, печени и головке эпидидимиса. Карнитина хлорид способствует повышению концентрации лактата в митохондриях головки эпидидимиса и в условиях гипергомоцистеинемии.

Показано, что экзогенный L-карнитин уменьшает дефицит синтеза NO при совместном введении с L-NAME и предотвращает истощение резервно-адаптационного потенциала (РАП) ОМБ митохондрий сердца и хвоста эпидидимиса, однако значительно не влияет на суммарное изменение окислительной модификации белков.

Выявлено, что гипергомоцистеинемия приводит к снижению концентрации NO_x как в сыворотке крови, так и в митохондриях исследуемых органов, а также сопровождается повышением уровня ОМБ с сопутствующим увеличением активности СОД в митохондриях сердца, печени, головки и хвоста эпидидимиса крыс.

Получены новые данные о возможности L-аргинина уменьшать степень выраженности гипергомоцистеинемии и корректировать вызванное индукторами окислительного стресса нарастание ОМБ митохондрий.

Впервые обнаружено, что при тяжелой форме гипергомоцистеинемии происходит значительное снижение всех фракций карнитина в исследуемых органах.

Впервые продемонстрировано, что назначение карнитина хлорида на фоне моделируемой гипергомоцистеинемии предупреждает повышение уровня гомоцистеина в сыворотке крови и сопровождается нарастанием концентрации метаболитов оксида азота во всех исследуемых фракциях и органах, за исключением хвостовой части эпидидимиса.

Обнаружено наличие сильной положительной взаимосвязи между уровнем NO и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, между содержанием NO и концентрацией свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме клеток головки эпидидимиса. Выявлено, что между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови и в митохондриальной фракции сердца и головки эпидидимиса обнаружена сильная,

а в печени и хвосте средняя отрицательная корреляционная связь.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленные в процессе данного исследования результаты расширяют фундаментальные знания о биологической роли L-карнитина в условиях сниженной генерации NO, индуцированной применением конкурентного ингибитора NO-синтаз - L-NAME и гипергомоцистеинемией, вызванной метиониновой нагрузкой.

Выявленные в исследовании схожие паттерны изменений активности митохондриальных ферментов и содержания карнитина, лактата и окислительно-модифицированных белков под действием неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME и гомоцистеина позволяют предположить, что изменение метаболизма NO создает предпосылки для нарушения редокс-регуляции митохондрий различных тканей.

Описанные протективные эффекты L-карнитина, связанные с его способностью уменьшать степень выраженности гипергомоцистеинемии и увеличивать утилизацию лактата в качестве энергосубстрата митохондриями в условиях ограничения β -окисления жирных кислот, возможностью повышать уровень метаболитов NO на фоне экспериментального снижения генерации NO, способностью уменьшать окислительную модификацию белков и повышать активность СОД дополняют представления о его биологической роли и могут быть использованы для разработки новых подходов терапевтической коррекции различных патологических состояний.

Полученные в ходе диссертационного исследования данные указывают на то, что L-аргинин также способен уменьшать повышенный уровень гомоцистеина, опосредованный длительным введением метионина в высокой дозе, и проявлять антиоксидантные свойства, уменьшая выраженность окислительного дистресса.

Таким образом, выявлены убедительные предпосылки для изучения возможности использования L-карнитина в качестве терапевтического средства, при состояниях, связанных с развитием вторичной митохондриальной

дисфункции, ассоциированной с дефицитом синтеза NO (II).

Методология и методы исследования

Исследование носило экспериментальный характер и выполнялось путем моделирования патологий, сопровождающихся снижением генерации NO (II) и гипергомоцистеинемией с последующим развитием окислительного стресса. В дальнейшем была выполнена оценка состояния энергетического обмена, маркеров интенсивности окислительной модификации белков, баланса карнитина и уровня метаболитов оксида азота. Также в работе назначался L-аргинин в качестве субстрата NO-синтазы для возможного повышения генерации NO. Для уточнения роли L-карнитина на фоне моделей экспериментального дефицита оксида азота и гипергомоцистеинемии применялся карнитина хлорид. Объектом исследования являлись конвенциональные половозрелые крысы Wistar. Содержание животных, постановка и выведение из эксперимента, а также получение материалов для исследований полностью соответствовало нормативным документам, принятым комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 16 от 08.12.2018). При выполнении работы использовались биохимические методы: колориметрия, спектрофотометрия, иммунохимические методы, применялось дифференциальное центрифугирование. Обработка полученных результатов проводилась с использованием современных методов статистического анализа.

Внедрение результатов работы

Результаты исследования используются в учебном процессе кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, применяются в работе Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница № 11», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница», а также внедрены в

производство ЗАО «ЭКОлаб».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспериментальная модель снижения генерации NO, опосредованная индуцированным L-NAME ингибированием NO-синтаз у крыс, связана с увеличением окислительного повреждения белков и уменьшением интенсивности тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца, головки и хвоста эпидидимиса; введение L-аргинина на фоне L-NAME препятствует накоплению окислительно модифицированных белков и способствует сохранению интенсивности тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях исследуемых органов.

2. При опосредованном L-NAME дефиците NO снижается содержание общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов, в митохондриях - снижение уровня карнитина отмечаются только в головке эпидидимиса. Введение аргинина предупреждает снижение общего карнитина в сыворотке крови, цитоплазме клеток и митохондриях всех исследуемых органов.

3. Использование L-карнитина на фоне экспериментального дефицита NO, вызванного L-NAME в дозе 200 мг/кг, приводит к повышению уровня метаболитов NO в митохондриях всех исследуемых органов и способствует росту концентрации лактата в митохондриях сердца и печени.

4. Экспериментальная модель тяжелой гипергомоцистеинемии, развивающаяся при метиониновой нагрузке, сопровождается уменьшением уровня метаболитов NO и увеличением содержания окислительно модифицированных белков в митохондриях сердца, печени и головки эпидидимиса. Введение L-аргинина снижает степень выраженности гипергомоцистеинемии и предупреждает окислительную модификацию белков митохондрий исследуемых органов крыс.

5. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается значительным уменьшением уровня общего, свободного и связанного карнитина во всех исследуемых фракциях и органах. Применение L-аргинина на фоне

сниженной генерации NO при гипергомоцистеинемии предотвращает снижение уровня эндогенного общего карнитина в сыворотке крови и митохондриальной фракции изучаемых органов.

6. Применение экзогенного L-карнитина в условиях тяжелой формы экспериментальной гипергомоцистеинемии, приводит к уменьшению ее выраженности и увеличению содержания метаболитов NO в изучаемых тканях, при сопутствующем повышении уровня митохондриального лактата в головке эпидидимиса.

7. Между уровнем метаболитов NO и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, содержанием метаболитов NO и концентрацией свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме клеток головки эпидидимиса существует сильная положительная корреляционная взаимосвязь. Между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови, митохондриях сердца и головки эпидидимиса обнаружена сильная отрицательная корреляционная связь.

8. На основании проведенных исследований выдвигается предположение о протекторной роли L-карнитина, способствующей как поддержанию уровня метаболитов NO в условиях модели L-NAME-опосредованного дефицита NO и гипергомоцистеинемии, так и снижению содержания гомоцистеина в модели гипергомоцистеинемии, вызванной метиониновой нагрузкой.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов работы обусловлена достаточным количеством экспериментальных наблюдений, корректностью выполнения моделирования, применением классических биохимических методов исследования. Статистическая обработка данных произведена с использованием лицензионного программного обеспечения и адекватных статистических критериев.

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на IX Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины

в решении актуальных проблем здравоохранения» (Астрахань, 2013); Международной научно-практической конференции «Медицинские науки: прошлое, настоящее, будущее» (Уфа, 2014); 10-й юбилейной Международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Абхазия, 2014); XXIII Международной конференции и дискуссионном научном клубе «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Крым, Ялта-Гурзуф, 2015); XIV Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при патологии и адаптации. Дни молекулярной медицины на Дону» (Ростов-на-Дону, 2015); Всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием, посвященная 150-летию акад. Н.П. Кравкова «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2015); «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2015); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: Новое в коагулологии. Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); VII Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2015); Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика Е.А. Строева» (Рязань, 2016); Межрегиональной научно-практической конференции: «Мужское здоровье: новые аспекты актуальной медицинской проблемы» (Рязань, 2017); 11-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук – основа формирования современной медицины» (Астрахань, 2018); X Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Витебск 2018); V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Орехово-Зуево, 2018); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований и клинической практике.

Традиции и перспективы» (Тюмень, 2019); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященная Году науки и технологий «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Электрогорск, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященная Году педагога и наставника «Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее» (Орехово-Зуево, 2023).

Личный вклад соискателя

Участие автора представленной работы заключалось в формировании идеи, анализе литературных данных по планируемой теме, организации исследования, создании дизайна исследования, постановке целей и задач, выполнении экспериментальной части работы, статистической обработке полученных данных, интерпретации результатов, подготовке публикаций по диссертационной работе, формулировке научных положений и выводов. В целом, личное участие автора составляет около 90%. Соавторы исследований указаны в публикациях.

Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ за счет бюджета ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Иных финансовых и других конфликтных интересов, получения вознаграждения ни в какой форме от фирм-производителей лабораторного и диагностического оборудования нет.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 40 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 14 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 7 – в изданиях, индексируемых в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus.

Объём и структура диссертации

Диссертация представлена на 270 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, практических рекомендаций, выводов, списка условных сокращений, списка литературы, содержит 78 рисунков и 35 таблиц. Список литературы включает 364 источника, из них 34 отечественных и 330 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 185 конвенциональных половозрелых крысах-самцах сток Wistar массой 230-350 г. Для анализа использовали сыворотку крови, а также цитоплазматическую и митохондриальную фракции, полученные методом дифференциального центрифугирования из гомогенатов левого желудочка сердца, печени, головки и хвоста эпидидимиса.

Экспериментальные модели

Экспериментальное моделирование дефицита синтеза оксида азота осуществляли путем внутрибрюшинного введения неселективного ингибитора NO-синтазы - метилового эфира L-N^ω-нитроаргинина (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 25 мг/кг - экспериментальная группа 1 (n=8) и дозе 200 мг/кг - экспериментальная группа 2 (n=8).

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота (II) субстратом NO-синтазы, осуществлялось внутрижелудочным введением раствора L - аргинина («Sigma», США) в 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг в течение 10 дней - экспериментальная группа 3 (n=8).

Для изучения положительного эффекта L-аргинина на фоне назначения ингибитора NO-синтаз - L-NAME проводилось внутрибрюшинное введение раствора L-NAME в физиологическом растворе в дозах 25 - экспериментальная группа 4 (n=8) и 200 мг/кг - экспериментальная группа 5 (n=8) в течение 7 дней с 3-х по 10-е сутки на фоне перорального назначения L-аргинина по схеме, описанной выше.

Моделирование тяжелой формы гипергомоцистеинемии – экспериментальная группа 6 (n=8) осуществляли путем внутрижелудочного введения крысам 2 раза в день суспензии метионина в дозе 1,5 г на кг массы тела в течение 3 недель. Суспензия включала (по массе): 25% метионина («Sigma-Aldrich», США), 65% 1%-го водного раствора крахмала (ЗАО «Вектон», Россия) и 10% твина 80 (ЗАО «Вектон», Россия). Дополнительно данная группа животных получала 1%-ный раствор метионина вместо питьевой воды при свободном доступе к поилкам. Крысам контрольной группы 6 (n=8) подобным образом вводилась суспензия, не содержащая метионин, и, состоящая из 10% твина 80, 90% 1%-го водного раствора крахмала (по массе) в течение 21 дня.

Для исследования эффектов L-аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии крысам самцам внутрижелудочно вводили раствор L-аргинина («Sigma», США) per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг в 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше (с 12 по 21 сутки введения метионина). Животные контрольной группы 7 (n=8) получали per os 1 раз в сутки 0,9% раствор NaCl в соответствующем расчетном объеме в течение 10 суток одновременно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контрольная группа 6.

Для изучения влияния L-карнитина крысам самцам внутрижелудочно вводили раствор карнитина хлорида (ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России – ЭПМБП) per os 1 раз в сутки в дозе 300 мг/кг, разведенный 1:1 физиологическим раствором в течение 21 дня – экспериментальная группа 8 (n=8).

Для исследования корригирующего воздействия карнитина хлорида в условиях экспериментального подавления синтеза оксида азота проводилось внутрибрюшинное введение раствора L-NAME в физиологическом растворе в дозах 25 и 200 мг/кг в течение 7 дней с 14-х по 21-е сутки на фоне перорального назначения карнитина хлорида – экспериментальные группы 9 и 10 (n=8).

Для изучения эффектов L-карнитина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии крысам самцам между приемами метионина внутрижелудочно вводили раствор карнитина хлорида per os 1 раз в сутки в дозе 300 мг/кг, разведенный 1:1 физиологическим раствором в течение 21 дня - экспериментальная группа 11 (n=8). Животные контрольной группы 11 (n=8) получали per os 1 раз в сутки 0,9% раствор NaCl в соответствии с расчетным объемом в течение 3 недель одновременно с введением суспензии, не содержащей метионин, по схеме, описанной выше – контрольная группа 2.

Контрольные группы 1-5, 8-10 (n=8 для каждой группы) были сопоставимы по условиям содержания с экспериментальными особями, возрасту, массе тела и формировались для каждой серии эксперимента. Самцам крыс контрольных групп вводился физиологический раствор, при этом вариант введения, его кратность, объемы раствора и продолжительность совпадали с таковыми для соответствующей экспериментальной группы.

В качестве группы сравнения использовался также материал, полученный от интактных животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями (n=8).

Методы исследования

Содержание белка в исследуемом материале определяли методом Лоури с использованием коммерческого набора НПЦ «Эко-сервис» (Санкт-Петербург, Россия); суммарную концентрацию нитратов и нитритов (содержание метаболитов оксида азота) определяли спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса; концентрацию общего и свободного карнитина определяли по методу L.Wan и R.W.Hubbard, основанному на реакции L-карнитина с ацетил-КоА, катализируемой карнитинацетилтрансферазой, протекающей с образованием ацетилкарнитина и свободного КоASH, реагирующего неэнзиматически с 5,5-дителиобис-2-нитробензоатом (DNTB) и образующего окрашенный продукт - 5-тио-2-нитробензоат, интенсивность которого, пропорциональна содержанию L-карнитина. Содержание связанного

карнитина рассчитывали по разности между уровнем общего и свободного карнитина; определение содержания лактата проводили с использованием коммерческого набора для определения концентрации лактата в биологических жидкостях (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, ФРГ); определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) осуществляли с помощью коммерческого набора LDH FS (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, ФРГ); определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) определяли по методу, основанному на восстановлении феррицианида калия ($K_3[Fe(CN)_6]$), имеющего желтую окраску, в бесцветный ферроцианид калия ($K_4[Fe(CN)_6]$) янтарной кислотой под действием СДГ; определение активности супероксиддисмутазы (СОД) осуществляли по методу, основанному на способности кверцетина подвергаться аутоокислению при $pH=10,0$ в присутствии тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) в аэробных условиях, что сопровождается образованием $O_2^{\cdot-}$, который в присутствии СОД подвергается дисмутации с образованием перекиси водорода. Это проявляется в торможении реакции окисления кверцетина. Об активности фермента H^+ -АТФазы судили по скорости накопления неорганического фосфата, определяемой по образованию фосфомолибдата аммония, восстанавливаемого аскорбиновой кислотой в молибденовую синь, об активности H^+ -АТФ-азы судили по разнице между накопившимся неорганическим фосфатом за период инкубации и его исходным уровнем в суспензии митохондрий. Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови экспериментальных животных определяли методом иммуноферментного анализа коммерческим набором Axis[®] HomocysteineEIA («Axis-Shield Diagnostics Ltd», Великобритания). Определение синтазы оксида азота I измеряли методом иммуноферментного анализа с помощью набора IK 100 Human/Rat NO-Synthase I EIA Kit (Япония). Для оценки окислительной модификации белков (ОМБ) определяли уровень карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Анализ количества карбонильных производных проводили посредством расчета площади под кривой абсорбции света, также

рассчитывали доли ранних и поздних маркеров окислительной деструкции белков – альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) нейтрального и основного характера. АДНФГ нейтрального характера имеют максимумы поглощения при 230, 254, 270, 280, 356 нм, а основного – при 428 и 430 нм. Максимумы абсорбции света для КДНФГ нейтрального характера наблюдаются при 363 и 370 нм, а для основных – при 434, 520, 535 нм. АДНФГ являются маркерами фрагментации белков, а КДНФГ – их агрегации. Кроме того, рассчитывался резервно-адаптационный потенциал митохондриальных белков как доля в % суммарной площади под спектром абсорбции света спонтанной ОМБ к площади ОМБ, индуцированной с помощью реакции Фентона (последняя принималась за 100%). Чем ниже доля продуктов спонтанного окисления, тем выше резервно-адаптационный потенциал.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась прикладных программ: Microsoft Office Excel 2013, «StatSoft Statistica 10.0», «GraphPad Prism 9.0». Подготовка иллюстраций и графиков осуществлялась с помощью интернет-ресурса «BioRender.com», приложения «GraphPad Prism 9.0».

Для проверки наличия отклонений распределения от нормального использовали многосторонний критерий Шапиро-Уилка (W-критерий) согласно ГОСТ Р ИСО 5479-2002. Так как распределение полученных данных отличались от нормального, для описания показателей использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q_1 и Q_3), результаты представляли в форме Me [Q_1 , Q_3]. Для анализа статистической значимости различий независимых выборок по количественному признаку использовали критерий Краскела-Уоллиса и U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений или U-критерий Манна-Уитни при сравнении 2 групп. Анализ корреляционных взаимосвязей осуществлялся с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали отличия, вероятность которых

при условии справедливости нулевой гипотезы (гипотезы об отсутствии различий) составляет менее 5% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние экспериментального дефицита NO, вызванного введением L-NAME в дозах 25 мг/кг и 200 мг/кг, на изменения биохимических показателей исследуемых органов изолированно и на фоне назначения L-аргинина

В рамках поставленных задач была получена и подтверждена модель L-NAME-опосредованного дефицита синтеза NO (II), который был выявлен как в сыворотке крови, так и в митохондриях гомогенатов тканей. При назначении высокой дозы L-NAME - 200 мг/кг эффект ингибирования NO-синтазы был выражен сильнее, при этом наиболее чувствительными к воздействию L-NAME оказались ткани головки эпидидимиса.

Наряду с ингибированием синтеза NO (II), назначение L-NAME вызывало торможение процессов аэробного окисления и окислительного фосфорилирования, о чем свидетельствовало снижение активности СДГ, H^+ -АТФазы при дозе L-NAME 25 мг/кг в гомогенате ткани эпидидимиса, при увеличении дозы L-NAME до 200 мг/кг активность вышеназванных ферментов угнеталась также и в тканях сердца (Таблица 1).

Таблица 1 – Влияние L-NAME на биохимические показатели активности СДГ и H^+ -АТФазы в митохондриях исследуемых органов, Me[Q1;Q3]

Показатели	Серии		
	Контроль Физраствор (1)	L-NAME 25 мг/кг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)
Митохондрии сердца			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	285,11 [203,71; 391,74]	182,22 [133,54; 222,26] $p_{1-2}=0,2313$	91,46 [83,47; 109,36]** $p_{1-3}=0,00034; p_{2-3}=0,1195$
Активность H^+ -АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	14,42 [11,97; 18,61]	8,39 [7,65; 9,16] $p_{1-2}=0,1016$	7,59 [7,16; 7,99]** $p_{1-3}=0,0125; p_{2-3}=1,0000$
Митохондрии печени			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	48,39 [39,51; 65,06]	53,62 [38,57; 77,74] $p_{1-2}=1,0000$	49,95 [26,54; 53,68] $p_{1-3}=1,0000; p_{2-3}=1,0000$
Активность H^+ -АТФазы, мкмольфосфата на мг белка в час	1,85 [1,09; 3,14]	1,90 [1,45; 2,81] $p_{1-2}=1,0000$	1,85 [1,09; 3,14] $p_{1-3}=1,0000; p_{2-3}=1,0000$

<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	35,03 [22,07; 42,70]	18,89 [15,59; 21,25]* p ₁₋₂ =0,0074	17,74 [16,31; 25,38]** p ₁₋₃ = 0,0136; p ₂₋₃ =0,8748
Активность Н ⁺ -АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	22,82 [21,51; 30,39]	8,20 [6,63; 8,96]* p ₁₋₂ =0,00094	9,13 [6,16; 10,78]** p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,8748
<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>			
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в минуту	27,10 [25,20; 34,05]	11,17 [7,53; 13,36]* p ₁₋₂ =0,00094	9,16 [7,96; 11,90]** p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,6365
Активность Н ⁺ -АТФазы, мкмоль фосфата/ мг белка в час	17,57 [12,02; 20,10]	1,13 [0,40; 1,49]* p ₁₋₂ =0,00094	3,66 [3,38; 4,28]**▲ p ₁₋₃ = 0,0009; p ₂₋₃ =0,0009

Примечание – символом * с учетом поправки Бонферрони показаны статистически значимые изменения в серии L-NAME 25 мг/кг относительно контрольной группы при p<0,017; ** - статистически значимые изменения в серии L-NAME 200 мг/кг относительно контроля (p<0,017); ▲ - статистически значимые изменения в серии L-NAME 25 мг/кг относительно серии L-NAME 200 мг/кг (p<0,017)

Экспериментальное снижение генерации NO сопровождалось развитием окислительного стресса, что подтверждалось увеличением уровня спонтанных ОМБ в митохондриях всех исследуемых тканей (Таблица 2). В митохондриях головки и хвоста эпидидимиса выявлено значительное снижение активности митохондриальной СОД, что в сочетании со значительным приростом РАП ОМБ свидетельствовало о нарушении в данном органе механизмов антиоксидантной защиты. Данный факт говорит о важной роли оксида азота в процессах редокс регуляции клеток.

Пероральное введение L-аргинина самцам крыс на фоне моделирования экспериментального дефицита генерации NO способствовало увеличению уровня метаболитов оксида азота (II) на 81,6% (p=0,010) в сыворотке крови только при дозе L-NAME 200 мг/кг. При этом отмечалось повышение содержания метаболитов NO относительно серии с введением только L-NAME в митохондриях сердечной мышцы 58,9 [54,65; 68,11] против 43,25[32,36; 47,27] (p=0,0053) при дозе L-NAME 25 мг/кг и 48,79 [44,31; 49,94] против 19,60 [8,64; 28,01] (p=0,0009) при дозе L-NAME 200 мг/кг; головке эпидидимиса 52,95 [44,55; 67,02] против 32,36 [21,11; 50,00] (p=0,0031) и 66,12 [55,03; 82,52] против 22,68

[18,23;25,84] ($p=0,0009$) соответственно. В печени - 37,08 [35,4; 39,8] против 23,60 [19,19; 27,31] ($p=0,0013$) только при дозе L-NAME 200 мг/кг. В хвосте придатка яичка статистически значимых изменений содержания метаболитов оксида азота не обнаружено.

Таблица 2 – Изменение маркерных показателей окислительного стресса в митохондриях исследуемых органов при введении L-NAME, Ме [Q₁; Q₃]

Показатели/ Группы	Физ. Раствор (1)	L-NAME 25 мг/кг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)
<i>Сердце</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	0,93 [0,77;1,37]	2,65 [2,39; 3,63] $p_{1-2} = 0,08513$	11,51[7,54;13,66]**▲ $p_{1-3}=0,00021$; $p_{2-3} = 0,0125$
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	6,03 [3,8; 7,09]	10,09 [8,05; 13,31]* $p_{1-2} = 0,010$	10,2 [8,12; 13,68]** $p_{1-3}=0,0136$; $p_{2-3} = 1,000$
S ОМБ, СП/МК (РАП %)	56,25 [39,112; 60,45]	77,45 [63,98; 86,64]* $p_{1-2} = 0,0136$	68,21 [55,58; 90,41] $p_{1-3}= 0,04412$; $p_{2-3} = 0,7928$
<i>Печень</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	6,76 [5,80; 9,21]	11,92[9,90; 15,66] $p_{1-2} = 0,03272$	6,03[4,74; 7,30]▲ $p_{1-3} = 1,0000$; $p_{2-3} = 0,00206$
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	3,77 [3,18; 4,12]	9,55[7,21; 10,78]* $p_{1-2} = 0,0013$	9,17[8,20; 15,41]** $p_{1-3}=0,00031$; $p_{2-3} = 0,7928$
S ОМБ, СП/МК (РАП %)	40,58 [33,22; 46,87]	53,46 [28,12; 64,78] $p_{1-2} = 0,4308$	58,24[54,19; 83,20] $p_{1-3}= 0,1562$; $p_{2-3} = 0,8314$
<i>Митохондрии головки эпидидимиса</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	34,37 [32,68; 38,84]	3,80 [1,61; 9,88]* $p_{1-2}=0,00094$	6,17 [4,45; 8,54]** $p_{1-3} = 0,00094$; $p_{2-3}=0,6365$
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	7,23 [6,23; 8,69]	13,38 [11,70; 14,53]* $p_{1-2}=0,00094$	23,36 [13,93;27,10]** $p_{1-3} = 0,00094$; p_{2-3}
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	33,12 [27,34; 46,12]	80,83[62,22; 95,52]* $p_{1-2}=0,00191$	76,67[68,41; 86,67]** $p_{1-3} = 0,0013$; $p_{2-3}=0,7928$
<i>Митохондрии хвоста эпидидимиса</i>			
Активность СОД, УЕ/мг белка	30,89 [28,10; 43,66]	5,54[3,99; 10,51]* $p_{1-2}=0,00094$	5,44[3,81; 9,08]** $p_{1-3} = 0,00094$; $p_{2-3}=0,7131$
S общ. СП ОМБ, е.о.п. на мг/белка	7,12 [5,41;8,07]	9,30 [8,09; 10,34]* $p_{1-2}=0,0136$	10,55[9,15; 12,07]** $p_{1-3} = 0,00094$; $p_{2-3}=0,1562$
S ОМБ, СП/МК (РАП), %	41,06 [35,57; 47,21]	64,36[52,72; 72,12]* $p_{1-2}=0,0074$	78,93[75,56; 83,12]**▲ $p_{1-3} = 0,0013$; $p_{2-3}=0,0136$

Примечание – символом * с учетом поправки Бонферрони показаны статистически значимые изменения в серии L-NAME 25 мг/кг относительно контрольной группы при $p<0,017$; ** - статистически значимые изменения в серии L-NAME 200 мг/кг относительно контроля ($p<0,017$); ▲ - статистически значимые изменения в серии L-NAME 25 мг/кг относительно серии L-NAME 200 мг/кг ($p<0,017$)

Одновременно усиливался метаболизм митохондрий, о чем свидетельствовало повышение активности Н⁺-АТФазы (Таблица 3). Активность СДГ увеличивалась в митохондриях сердца, печени и головке эпидидимиса при одновременном назначении с ингибитором в дозе 200 мг/кг.

Таблица 3 – Влияние L-аргинина на биохимические показатели, ассоциированные с функцией митохондрий исследуемых органов, на фоне введения L-NAME, Me[Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг +Арг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг +Арг (4)
Митохондрии сердца				
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	182,22 [133,54;122,26]	146,75 [123,22;166,06] p ₁₋₂ =0,3184	91,46 [83,47;109,36]	235,09 [204,88; 267,0]** p ₃₋₄ = 0,000939
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмольфосфата / мг белка в час	8,39 [7,65; 9,16]	11,07 [9,53; 15,27]* p ₁₋₂ = 0,0239	7,59 [7,16; 7,99]	12,46 [10,75; 13,71]** p ₃₋₄ = 0,0038
Митохондрии печени				
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	53,62 [38,57; 77,74]	22,84 [16,15; 28,14]* p ₁₋₂ =0,00094	49,95 [26,54; 53,83]	121,71 [106,11;134,39]** p ₃₋₄ = 0,00136
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмольфосфата/мг	1,9 [1,45; 2,81]	7,44 [5,28; 8,26]* p ₁₋₂ = 0,00094	1,85 [1,09; 3,14]	8,01 [7,83; 9,89]** p ₃₋₄ = 0,00094
Митохондрии головки эпидидимиса				
Активность СДГ, нмоль сукцината/ мг белка в мин	18,89 [15,59; 21,26]	21,22 [17,78; 22,63] p ₁₋₂ =0,3720	17,74 [16,31; 25,38]	27,89 [25,93; 35,28]** p ₃₋₄ = 0,0023
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмольфосфата/ мг	8,2 [6,63; 8,96]	14,92 [10,15; 16,51]* p ₁₋₂ = 0,0027	9,13 [6,16; 14,18]	12,01 [9,61; 14,18] p ₃₋₄ = 0,0660
Митохондрии хвоста эпидидимиса				
Активность СДГ, нмоль сукцината/мг белка в мин	11,17 [7,54; 13,36]	16,08 [12,48; 20,82] p ₁₋₂ =0,1562	9,17 [7,96; 11,9]	4,08 [3,22; 5,02]** p ₃₋₄ = 0,00136
Активность Н ⁺ - АТФазы, мкмольфосфата/мг	1,13 [0,4; 1,49]	11,34 [9,04; 15,72]* p ₁₋₂ = 0,00094	3,66 [3,38; 4,28]	13,08 [10,4; 16,11]** p ₃₋₄ = 0,00094

Введение L-аргинина совместно с L-NAME способствовало коррекции показателей содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в кардиомиоцитах, гепатоцитах в обеих выбранных дозах ингибитора, головке

придатка яичка при совместном назначении аргинина и L-NAME в дозе 200 мг/кг и хвосте эпидидимиса в условиях назначения L-NAME 25 мг/кг

Таблица 4 – Влияние L-NAME на показатели общей площади спонтанных ОМБ (е.о.п. на мг/белка) в митохондриях исследуемых органов изолированно и в сочетании с L-аргинином, Me[Q₁;Q₃]

	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг +Арг (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг +Арг (4)
Мх сердце	10,88[8,19; 13,02]	6,30[5,11; 6,83]* p ₁₋₂ = 0,00538	9,21[8,16; 13,69]	7,34[5,12; 8,42]* p ₃₋₄ = 0,0239
Мх печень	9,55[4,97; 10,78]	4,8[2,26; 7,44]* p ₁₋₂ = 0,0038	9,17[8,20; 15,41]	4,51[3,82; 5,33]* p ₃₋₄ = 0,0028
Мх головка	13,38 [11,70; 14,53]	10,05[7,92; 12,72] p ₁₋₂ = 0,0831	23,36[13,93;27,10]	11,64[9,57; 16,46]* p ₃₋₄ = 0,0239
Мх хвост	9,30[8,09; 10,34]	5,57[4,79; 7,4]* p ₁₋₂ = 0,0038	10,55[9,15; 12,07]	9,53[8,57; 9,77] p ₃₋₄ = 0,3184

Активность СОД в головке придатка яичка при дозе L-NAME 25 мг/кг возрастала в 6,4 раза (p=0,0009), при дозе 200 мг/кг - в 4,7 раза (p=0,0009) с одновременным улучшением РАП ОМБ, соответственно, на 35,3% (p=0,0054) и 50,2% (p=0,0009). В хвосте эпидидимиса активность СОД также увеличивалась в 3,1 раза (p=0,0009) при дозе L-NAME 25 мг/кг и 3,5 раза (p=0,0009) при дозе 200 мг/кг. При этом РАП ОМБ статистически значимо не изменялся.

Содержание фракций карнитина в исследуемых тканях при экспериментальном дефиците оксида азота изолированно и в сочетании с L-аргинином

Карнитин может присутствовать в организме в свободной и связанной этерифицированной форме (ацилкарнитин). Перераспределение между пулами карнитина и ацилкарнитина способно происходить в пораженных тканях после любых метаболических нарушений. В связи с этим, для определения роли карнитина в моделируемых патологиях было важно оценить уровень общего карнитина и его фракций во всех исследуемых тканях.

Обнаружено, что экспериментальный дефицит NO приводил к статистически значимому снижению уровня общего и свободного карнитина в сыворотке крови (Рисунок 1).

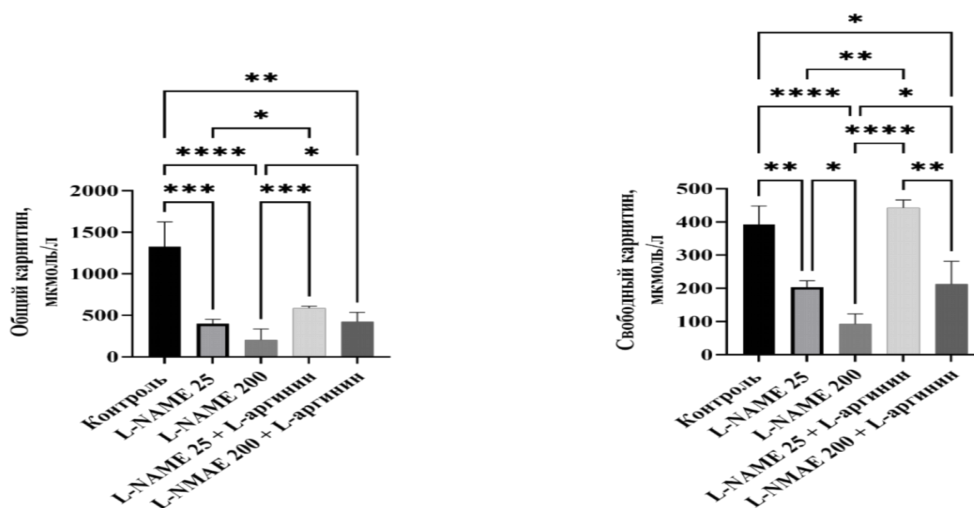


Рисунок 1 – Содержание фракций карнитина в сыворотке крови при введении L-NAME

Примечание – символом * в данном и последующих рисунках отмечены различия групп при $p < 0,05$; символом ** - различия групп при $p < 0,01$, символом *** - различия групп при $p < 0,001$. Значения представлены как Me[Q1;Q3]

В цитоплазме клеток исследуемых органов отмечено снижение содержания общего и свободного карнитина, причем, для большинства изучаемых органов характерен эффект нарастания снижения карнитина с повышением дозы L-NAME (Рисунок 2).

Интересен тот факт, что моделирование дефицита синтеза NO в двух выбранных дозах в митохондриях тканей сердца, печени и хвоста эпидидимиса не приводило к уменьшению содержания общего карнитина, и только в головке эпидидимиса его содержание снижалось на 16,3% ($p=0,0019$).

Модуляция генерации уровня NO с помощью L-аргинина на фоне L-NAME препятствовала снижению эндогенного уровня общего карнитина в сыворотке крови (Рисунок 1) и способствовало его повышению в митохондриях всех исследуемых органов, что более выражено на фоне применения L-NAME в дозе 200 мг/кг. Так, при совместном назначении аргинина и L-NAME в дозе 200 мг/кг содержание общего карнитина было выше относительно серии с введением L-NAME в сердце в 4,5 раз ($p=0,0009$), печени - 2,7 раза ($p=0,0009$), головке эпидидимиса - в 5,4 раза ($p=0,0009$), хвосте - в 1,8 раз ($p=0,0013$); свободного карнитина, соответственно, в 3,8 раз ($p=0,0009$), 4,5 раз ($p=0,0009$), 5,3 раза ($p=0,0009$) и 2,7 раз ($p=0,0009$).

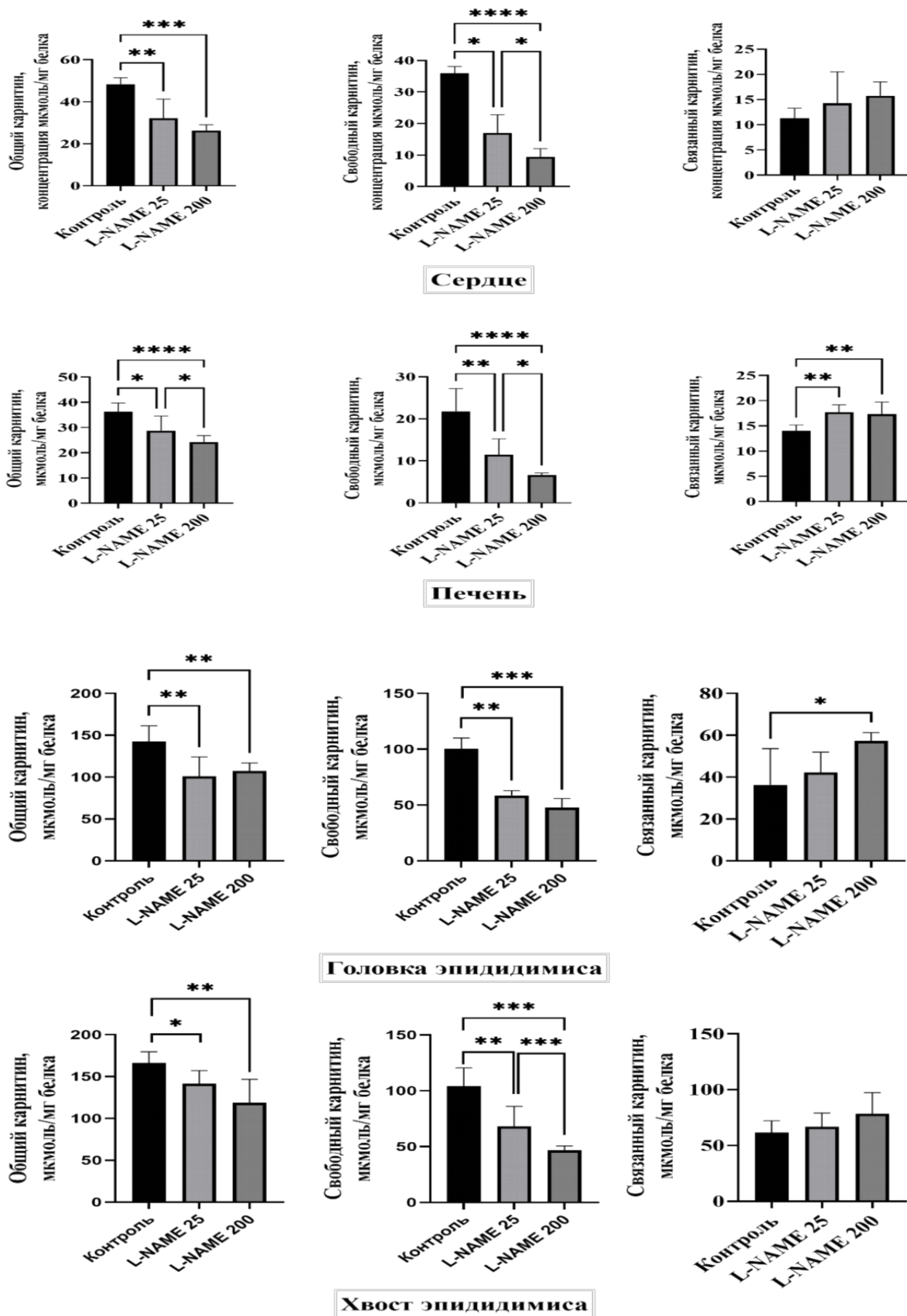


Рисунок 2 – Содержание фракций карнитина в цитоплазме клеток при введении L-NAME, Me [Q₁; Q₃]

Влияние экзогенного карнитина на биохимические показатели тканей сердца, печени и эпидидимиса при экспериментальном дефиците оксида азота

При введении карнитина хлорида в условиях экспериментального дефицита NO при дозе L-NAME 25 мг/кг уровень общего карнитина в сыворотке крови повышался на 17,4 % ($p=0,0031$), при увеличении дозы до 200 мг/кг - статистически значимо не изменялся.

В митохондриях исследуемых органов содержание эндогенного карнитина изменялось разнонаправленно: в печени наблюдалось повышение уровня общего карнитина в 1,3 раза ($p=0,0135$) при дозе L-NAME 25 мг/кг и в 2,5 раза ($p=0,0009$) при дозе 200 мг/кг, при этом в митохондриях сердца и головки эпидидимиса уровень общего карнитина статистически значимо не отличался от серии с введением ингибитора L-NAME.

Назначаемый животным карнитина хлорид на фоне ингибирования NO-синтаз предотвращал снижение уровня NO_x и приводил к статистически значимому их повышению в сыворотке крови относительно серии с введением только ингибитора (Рисунок 3).

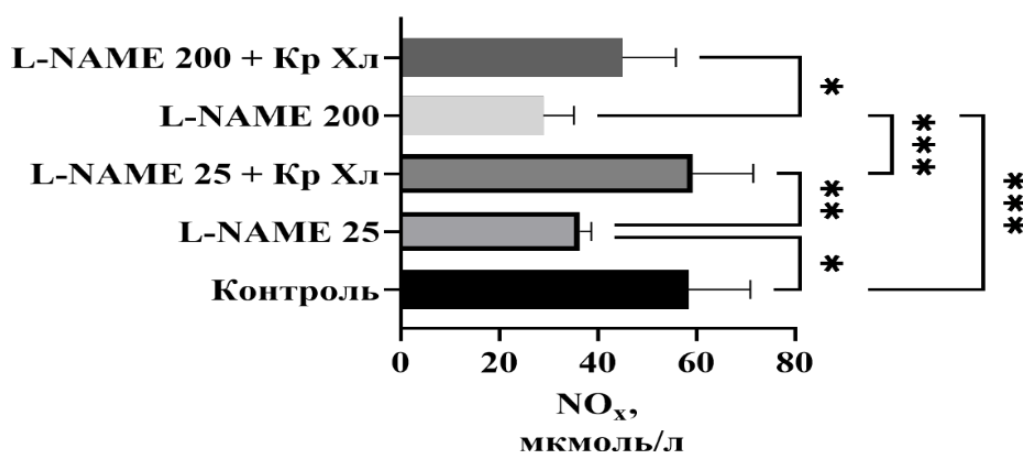


Рисунок 3 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на содержание NO_x в сыворотке крови на фоне введения L-NAME, Ме [Q₁; Q₃]

При использовании дозы ингибитора - L-NAME 200 мг/кг совместно с карнитина хлоридом этот эффект был статистически значимо более выражен: концентрация метаболитов оксида азота сохранялась на уровне животных

контрольной группы в сыворотке крови, митохондриях всех исследуемых органов (Рисунок 4).

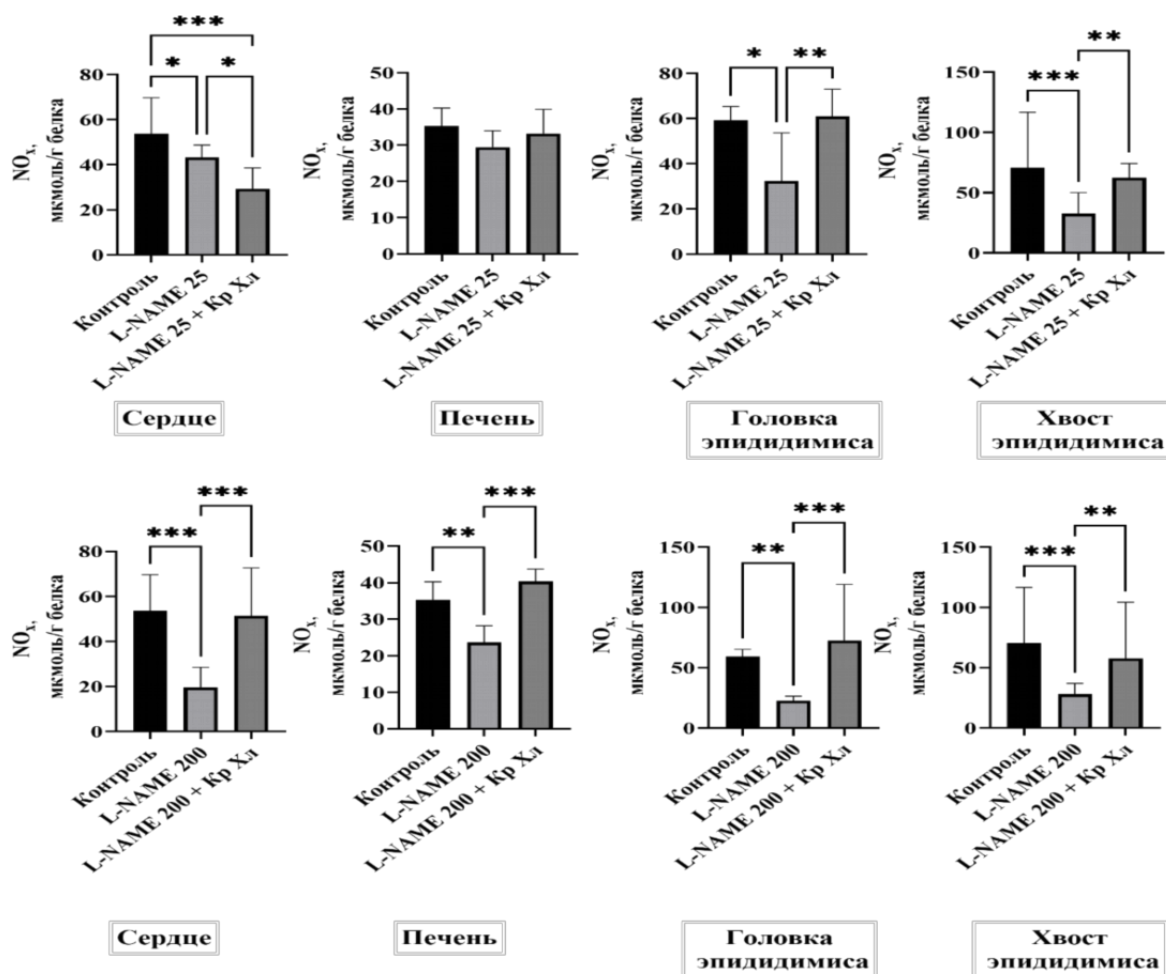


Рисунок 4 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на содержание NO_x в митохондриях исследуемых органов на фоне введения L-NAME, Me [Q₁; Q₃]

В работе важно обратить внимание на обнаруженный феномен того, что при моделировании экспериментального дефицита синтеза NO в дозе L-NAME 25 мг/кг совместно с карнитина хлоридом, наблюдалось снижение уровня молочной кислоты в цитоплазме клеток печени и головки эпидидимиса без изменения активности ЛДГ (Таблица 5).

Увеличение дозы L-NAME до 200 мг/кг имело в цитоплазме клеток схожую тенденцию и также приводило к снижению концентрации лактата в клетках сердца, печени и головки эпидидимиса.

Таблица 5 – Влияние карнитина хлорида на активность ЛДГ и содержание лактата в цитоплазме клеток исследуемых органов на фоне введения L-NAME, Me [Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг + Карнитина хлорид (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг + Карнитина хлорид (4)
Сердце				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	315,84 [273,93; 368,32]	239,27 [230,33;284,56] p ₁₋₂ = 0,1035	231,72 [197,62;255,26]	231,76 [198,25;248,79] p ₃₋₄ = 0,7928
Лактат, мкмоль/г белка	8,41 [7,94; 9,34]	7,46 [5,21; 8,19] p ₁₋₂ = 0,08312	11,0 [9,37; 12,98]	6,14 [5,43; 8,39]** p ₃₋₄ = 0,00740
Печень				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	1475,0 [1217,75; 1541,31]	1272,11 [1096,91;1425,3] p ₁₋₂ = 0,1892	982,81 [932,07;1419,38]	1056,6 [956,21;1146,06]
Лактат, мкмоль/г белка	10,25 [8,22; 12,19]	6,67 [5,85; 8,46]* p ₁₋₂ = 0,0136	11,0 [9,37; 12,98]	6,51 [4,84; 9,22]** p ₃₋₄ = 0,02394
Головка эпидидимиса				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	131,16 [96,95; 145,85]	127,69 [111,84;143,66] p ₁₋₂ = 0,8748	107,41 [97,62;113,43]	102,82 [72,82;114,98] p ₃₋₄ = 0,7131
Лактат, мкмоль/г белка	40,39 [35,3; 44,05]	27,11 [25,72; 32,21]* p ₁₋₂ = 0,0239	43,44 [37,06; 50,65]	34,29 [26,85; 38,79]** p ₃₋₄ = 0,04902
Хвост эпидидимиса				
Активность ЛДГ, Ед/г белка	48,74 [43,61; 54,52]	46,75 [40,38; 55,49] p ₁₋₂ = 0,7928	41,44 [37,93;46,09]	45,08 [34,94;53,61] p ₃₋₄ = 0,5635
Лактат, мкмоль/г белка	30,53 [24,9; 36,32]	22,25 [20,11; 26,59] p ₁₋₂ = 0,0831	34,66 [29,56; 37,25]	30,93 [24,11; 32,21] p ₃₋₄ = 0,0831

Примечание – * изменения в серии «L-NAME 25 мг/кг» статистически значимы (p<0,05) относительно группы «L-NAME 25 мг/кг+Карнитина хлорид»; ** - изменения в серии «L-NAME 200 мг/кг» статистически значимы (p<0,05)относительно «L-NAME 200 мг/кг + Карнитина хлорид»

В то же время в митохондриальной фракции доза L-NAME 25 мг/кг, назначаемая совместно с карнитином хлоридом, способствовала увеличению содержания молочной кислоты в сердце с одновременным повышением активности ЛДГ (Рисунок 5).

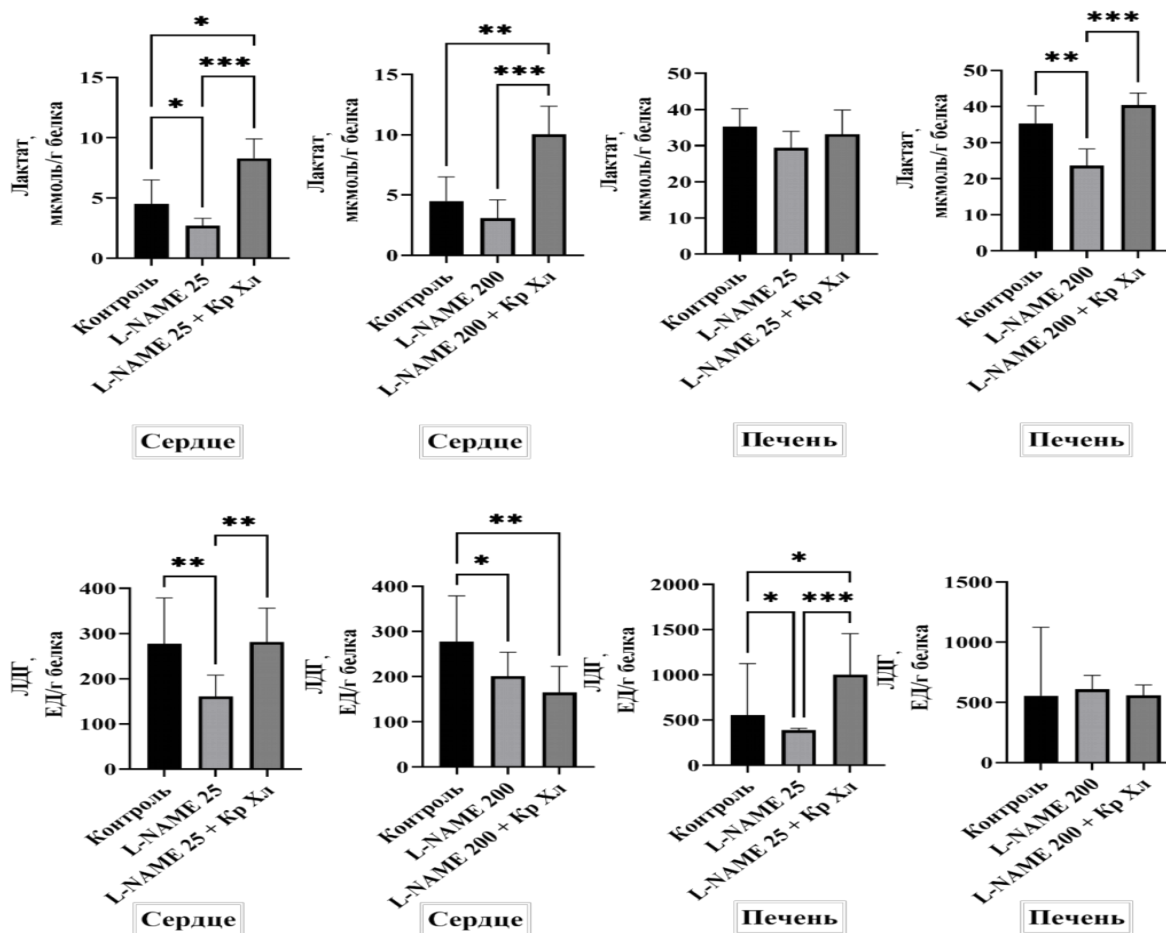


Рисунок 5 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на активность ЛДГ и содержание лактата в митохондриях сердца и печени на фоне введения L-NAME

Назначение L-NAME в дозе 200 мг/кг одновременно с карнитина хлоридом приводило к увеличению уровня лактата в митохондриях сердца и печени без нарастания активности ЛДГ. Этот феномен можно рассматривать как возможную адаптивную реакцию, направленную на использование лактата в качестве энергосубстрата, в условиях ограниченного использования жирных кислот либо подключения других пусковых механизмов метаболической гибкости митохондрий.

Анализ площадей под кривой абсорбции света показал, что назначение карнитина хлорида статистически значимо не повлияло на суммарное изменение количества карбонильных производных относительно группы с изолированным введением L-NAME, в то же время анализ РАП ОМБ митохондрий исследуемых органов показал, что и у животных, получавших L-NAME совместно с карнитином хлоридом, не происходило его истощения в сердце в обеих дозах и

хвосте эпидидимиса при дозе L-NAME 200 мг/кг относительно групп, принимавших только ингибитор NO-синтаз (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние карнитина хлорида на показатели РАП ОМБ (%) в митохондриях исследуемых органов на фоне введения L-NAME, Ме [Q₁;Q₃]

Показатели	Серии			
	L-NAME 25 мг/кг (1)	L-NAME 25 мг/кг +КрХл (2)	L-NAME 200 мг/кг (3)	L-NAME 200 мг/кг +КрХл (4)
Мх сердца	77,45 [63,98; 86,64]	40,57 [33,22; 49,22]* p ₁₋₂ = 0,0013	78,20 [55,58;70,41]	51,04 [39,51; 54,91]* p ₃₋₄ = 0,0191
Мх печени	53,45 [28,12; 64,78]	57,96 [55,61;61,29] p ₁₋₂ = 0,5635	63,26 [54,19;83,19]	52,27 [43,17; 56,77] p ₃₋₄ = 0,1278
Мх головки эпидидимиса	80,83 [62,22; 95,52]	58,27 [41,87; 68,92] p ₁₋₂ = 0,05208	76,67 [68,41; 86,67]	54,8 [45,4; 72,54] p ₃₋₄ = 0,0660
Мх хвоста эпидидимиса	64,36 [52,72; 72,12]	57,59 [24,94; 69,97] p ₁₋₂ = 0,3720	78,93 [75,56; 83,12]	35,39 [28,86; 43,66]* p ₃₋₄ = 0,00136

Изменения функционирования митохондрий при гипергомоцистеинемии

Превалирующей точкой зрения о повреждающем действии гомоцистеина в настоящее время является гипотеза об активации окислительного стресса, ведущего к нарушению функционирования эндотелия и развитию эндотелиальной дисфункции, проявлением которой является снижение генерации и биодоступности NO. Поэтому для дальнейшего исследования потенциального корригирующего действия L-карнитина, обладающего антиоксидантными свойствами и возможностью повышать уровень метаболитов NO, была выбрана модель гипергомоцистеинемии (ГГЦ).

При моделировании данной экспериментальной патологии обнаружено снижение суммарной концентрации NO_x в сыворотке крови на 31% (p=0,0073). В субклеточных фракциях сердца, печени, головки эпидидимиса также выявлено уменьшение уровня NO_x (Таблица 7). При этом наблюдаемое снижение содержания NO_x при гипергомоцистеинемии не сопровождалось статистически значимым изменением экспрессии NO-синтазы I ни в одном из исследуемых органов.

Таблица 7 – Концентрация метаболитов NO_x в клетках тканей крыс при гипергомоцистеинемии, мкмоль/г белка, Me [Q₁; Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
<i>Цитоплазма</i>				
Суспензионная основа (контроль1)	45,53 [34,0; 53,1]	76,99 [70,04;82,29]	46,19 [36,25; 48,61]	59,84 [57,29;75,57]
Суспензия метионина (ГГЦ)	28,85 [23,95;34,34]* p=0,01008	29,41 [26,94;32,66]* p=0,00094	32,14 [27,25; 34,09]*	59,97 [52,35;66,56] p=0,6365
<i>Митохондрии</i>				
Суспензионная основа (контроль1)	59,60 [55,34;79,11]	38,03 [34,46; 9,68]	42,29 [37,77; 8,75]	41,79 [30,65; 3,03]
Суспензия метионина (ГГЦ)	44,25 [33,38;56,09]* p=0,02394	27,49 [22,01;30,93]* p=0,01008	31,11 [26,51; 2,32]* p=0,0135	43,2 [83,1; 47,34] p=0,9593

Экспериментальная гипергомоцистеинемия способствовала развитию окислительного стресса в митохондриях органов, выражающегося в увеличении количества карбонильных производных аминокислотных остатков в белках митохондрий сердца в 2 раза (p=0,0013), печени в 3,7 раза (p=0,0009), головке эпидидимиса в 3,8 раз (p=0,010) и хвосте эпидидимиса в 4,4 раза (p=0,0009).

Одновременно с повышенной продукцией АФК наблюдалось усиление антиоксидантной защиты: активность общей митохондриальной СОД возрастала: в сердце в 5,6 раза (p=0,0013), в печени в 2,87 (p=0,0013), в головке в 3,26 (p=0,0027) и хвосте – в 3,35 раза (p=0,0013).

Следует отметить, что при анализе зависимости показателей содержания продуктов окислительной модификации белков от концентрации гомоцистеина выявлены статистически значимые прямые корреляционные связи в головке (r=0,63, p=0,0085) и хвосте (r=0,75, p=0,0007) придатка яичка, что предполагает наличие у гомоцистеина прооксидантных свойств в отношении протеинов эпидидимиса. Обнаруженные изменения согласуются с представлениями о возможности гипергомоцистеинемии изменять структуру и функцию белков, а также являться предиктором для развития ряда заболеваний, в том числе нарушений мужской репродуктивной системы.

Нарушение NO-регуляции в условиях окислительного дистресса сопровождается снижением активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки: СДГ - в сердце с 276,12 [235,26; 298,63] до 109,02 [69,19; 191,42] ($p=0,0135$), головке эпидидимиса с 70,30 [32,72; 93,09] до 20,79 [11,15; 24,44] ($p=0,0054$) и хвосте эпидидимиса с 56,38 [39,34; 93,56] до 14,77 [10,03; 21,48] ($p=0,0054$). Активность H^+ -АТФазы также снижалась - в головке эпидидимиса с 26,23 [21,43; 44,40] до 14,77 [11,51; 18,58] ($p=0,0010$) и хвосте эпидидимиса с 20,13 [15,58; 27,18] до 9,52 [6,90; 11,13] ($p=0,0014$), причем в преобладающей степени митохондриальная дисфункция выражена в митохондриях сердца и головки придатка яичка, в то же время наибольшие адаптационные возможности отмечались в печени и хвосте эпидидимиса.

Введение L-аргинина, как донора NO, крысам на фоне моделирования гипергомоцистеинемии приводило к меньшему повышению концентрации сывороточного гомоцистеина относительно модели животных с гипергомоцистеинемией.

Предположение о возможности L-аргинина оказывать корригирующее действие на содержание метаболитов NO, окислительную модификацию белков в данной работе нашло свое подтверждение: уровень метаболитов оксида азота (II) возрастал в сыворотке крови по сравнению с животными, которым вводили суспензию метионина (Рисунок 6).

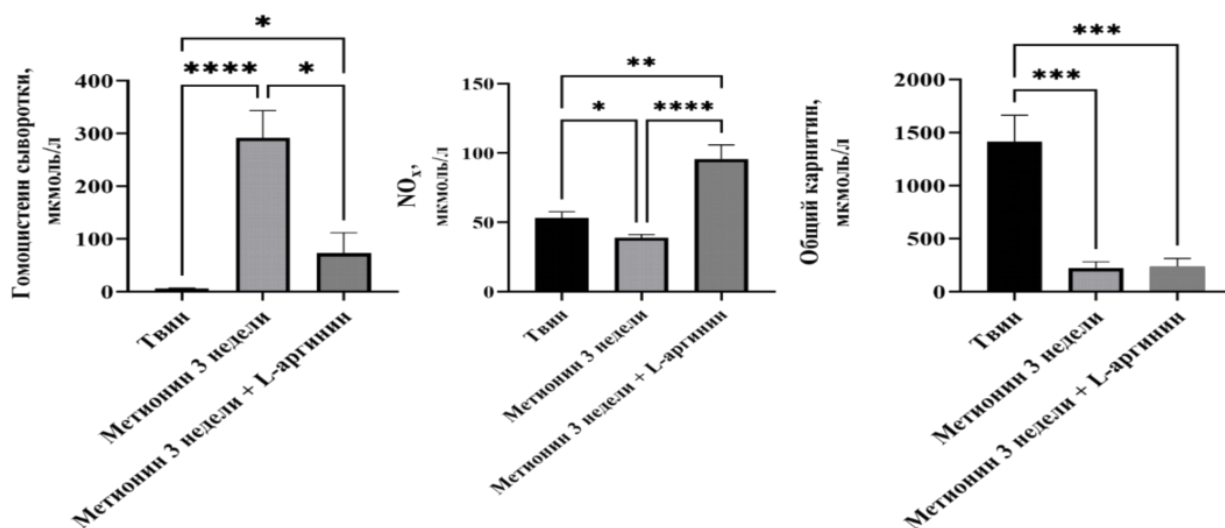


Рисунок 6 – Концентрация гомоцистеина, NO_x и общего карнитина в сыворотке крови исследуемых групп животных

В цитоплазме клеток сердца содержание NO_x на фоне назначения L-аргинина повышалось относительно серии с ГГЦ в 1,7 раза ($p=0,0009$), печени – 1,5 раза ($p=0,0135$), головки эпидидимиса – 1,8 раза ($p=0,0054$); в митохондриях печени – в 1,7 раза ($p=0,0054$) и головки эпидидимиса – в 1,8 раза ($p=0,0009$).

При введении L-аргинина на фоне ГГЦ отмечалось статистически значимое уменьшение продуктов ОМБ в печени в 2,3 раза ($p=0,0136$) и обоих исследуемых отделах эпидидимиса: головке в 2,4 раза ($p=0,0009$), хвосте в 2,6 раза ($p=0,0019$).

Параллельно наблюдалось повышение активности СОД в печени в 1,5 раза ($p=0,0136$), головке эпидидимиса в 2,2 раза и хвосте придатка яичка в 1,8 раз ($p=0,0074$).

И хотя у L-аргинина известно прямое антиоксидантное действие, не исключено, что в данном случае его антиоксидантное свойство связано с увеличением продукции NO и его последующим взаимодействием со свободными радикалами.

Воздействие экспериментальной гипергомоцистеинемии на содержание фракций карнитина изолированно и в комбинации с L-аргинином

Анализ пула карнитина при моделировании тяжелой формы гипергомоцистеинемии показал выраженное снижение его содержания в сыворотке крови (Рисунок 6), митохондриях клеток всех изучаемых органов (Таблица 8). Предположительно карнитин в условиях метиониновой нагрузки, может участвовать в утилизации излишков данной аминокислоты, однако, по всей видимости, физиологической концентрации карнитина недостаточно для полной экскреции всего поступающего метионина.

При моделировании гипергомоцистеинемии на фоне назначения животным L-аргинина выявлено повышение отдельных фракций карнитина (общий карнитин в митохондриях сердца увеличивался в 1,5 раза ($p=0,0074$), печени - в 2,3 раза ($p=0,0070$), головке эпидидимиса - в 1,4 раза ($p=0,0074$); свободный карнитин - в митохондриях головки придатка яичка - в 1,4 раза

($p=0,0138$), но тем не менее содержание эндогенного карнитина оставалось ниже уровня контрольных значений.

Таблица 8 – Содержание L-карнитина (мкмоль/мг белка) в митохондриях клеток исследуемых органов при гипергомоцистеинемии, Me[Q₁;Q₃]

Группа животных	Сердце	Печень	Головка эпидидимиса	Хвост эпидидимиса
Контроль Твин				
Карнитин общ.	47,04 [42,25; 60,07]	47,47 [45,09; 51,83]	86,61 [86,91;102,54]	85,20 [74,77;94,13]
Карнитин своб.	22,99 [18,89;26,40]	11,97 [10,72; 15,21]	46,41 [41,30;64,39]	48,21 [44,06;54,70]
Карнитин связ.	28,29 [19,55; 34,12]	35,09 [32,35; 38,9]	45,61 [31,66;49,59]	37,42 [33,84;42,68]
Гипергомоцистеинемия				
Карнитин общ.	5,22 [4,37; 6,52]* $p=0,00094$	5,37 [4,21; 6,03]* $p=0,00094$	24,89 [22,93;26,00]* $p=0,00094$	21,05 [20,88;24,45]* $p=0,00094$
Карнитин своб.	2,68 [1,96; 3,90]* $p=0,00094$	2,61 [1,78; 4,21]* $p=0,00094$	13,52 [11,72;15,19]* $p=0,00094$	9,70 [8,97;10,74]* $p=0,00094$
Карнитин связ.	2,08 [0,88; 3,0]* $p=0,00094$	2,03 [1,65;3,21]* $p=0,00094$	12,20 [9,37;12,34]* $p=0,00136$	11,81 [11,37;14,12]* $p=0,00194$

При моделировании гипергомоцистеинемии на фоне назначения животным L-аргинина выявлено повышение отдельных фракций карнитина (общий карнитина в митохондриях сердца увеличивался в 1,5 раза ($p=0,0074$), печени - в 2,3 раза ($p=0,0070$), головке эпидидимиса - в 1,4 раза ($p=0,0074$); свободный карнитин - в митохондриях головки придатка яичка - в 1,4 раза ($p=0,0138$), но тем не менее содержание эндогенного карнитина оставалось ниже уровня контрольных значений.

Воздействие карнитина хлорида на функционирование митохондрий при экспериментальной гипергомоцистеинемии

Назначение карнитина хлорида на фоне гипергомоцистеинемии сопровождалось снижением уровня гомоцистеина сыворотки крови в 4 раза ($p=0,0009$), однако, его содержание по-прежнему было выше значений контрольной группы животных (Рисунок 7).

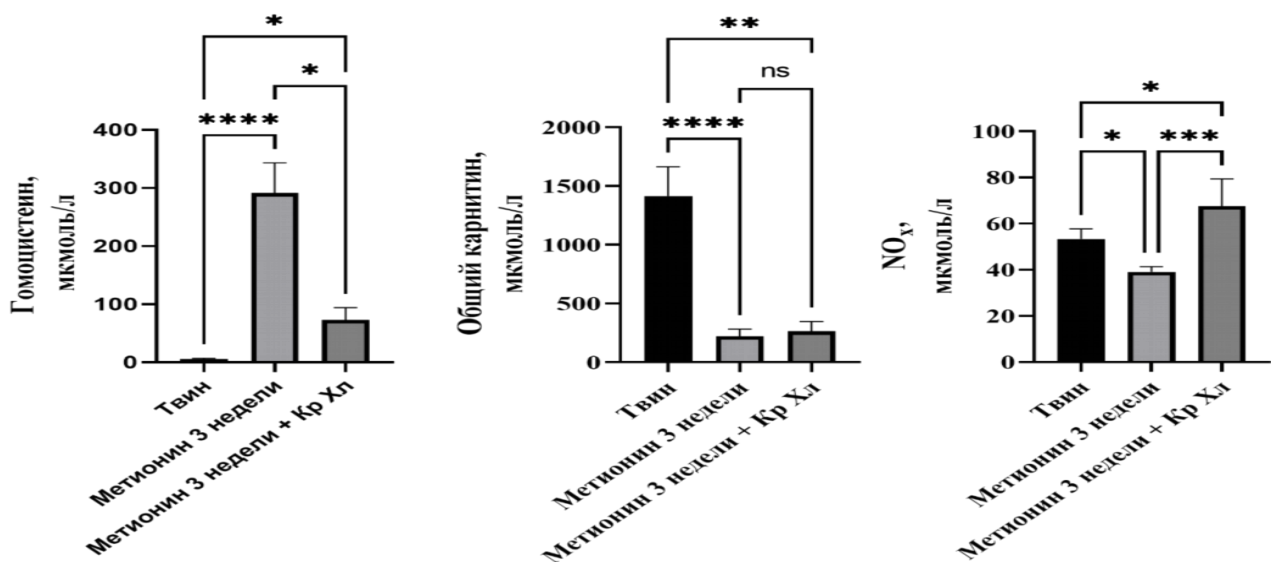


Рисунок 7 – Влияние карнитина хлорида на уровень гомоцистеина, общего карнитина и NO_x в сыворотке крови при гипергомоцистеинемии

Еще одним важным аспектом является тот факт, что в митохондриях головки эпидидимиса на модели тяжелой гипергомоцистеинемии был выявлен схожий с моделью L-NAME характер изменений в виде повышения уровня лактата (41,88 [35,09; 47,10] против 29,60 [25,40; 31,17] ($p=0,0054$)) под действием L-карнитина при сопутствующем увеличении активности ЛДГ (34,13 [29,99; 37,56] против 19,19 [13,27; 25,57] ($p=0,0039$)).

Предположение о положительном влиянии карнитина хлорида на генерацию NO нашло свое подтверждение и в условиях моделируемой гипергомоцистеинемии: содержание метаболитов NO повышалось во всех субклеточных фракциях исследуемых органов, за исключением каудального отдела эпидидимиса (Рисунок 8).

На следующем этапе был измерен уровень pNOS в митохондриальной фракции исследуемых органов. Экспериментальная гипергомоцистеинемия статистически значимо не влияла на содержание pNOS, при этом назначение карнитина хлорида на фоне гипергомоцистеинемии способствовало повышению ее уровня в 2,7 раза ($p=0,0108$) в головке придатка яичка, в каудальной части эпидидимиса содержание pNOS увеличивалось в 11,6 раз ($p=0,0009$).

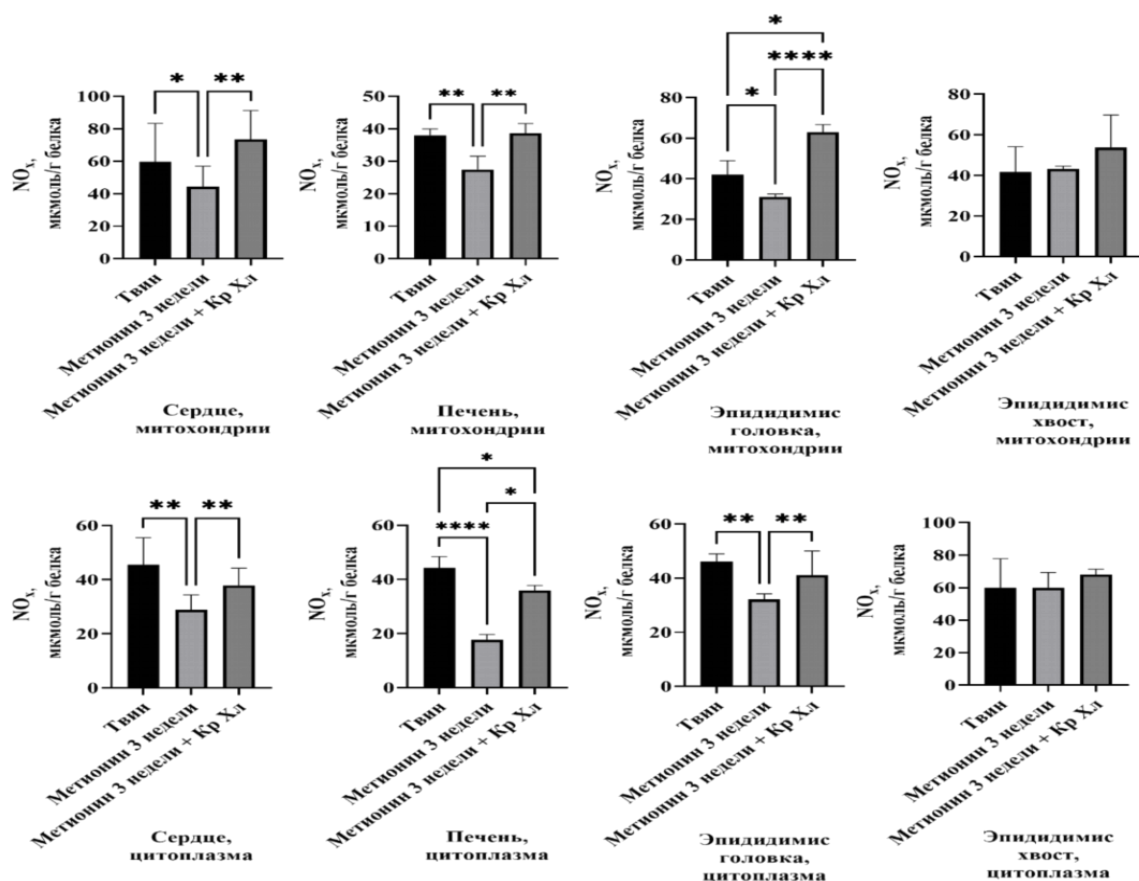


Рисунок 8 – Влияние карнитина хлорида (КрХл) на уровень NO_x в митохондриях и цитоплазме клеток исследуемых органов при гипергомоцистеинемии

Также были обнаружены положительные корреляционные взаимосвязи между уровнями карнитина и NO_x в сыворотке крови, цитоплазме клеток и митохондриях исследуемых органов на фоне применения L-NAME в дозе 25 мг/кг и 200 мг/кг и гипергомоцистеинемии (Таблица 9).

В условиях L-NAME - опосредованного дефицита NO были обнаружены: сильная положительная зависимость между NO_x и содержанием общего карнитина в сыворотке крови, между NO_x и уровнем свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме клеток головки эпидидимиса. Выявлена умеренная положительная взаимосвязь - между NO_x и содержанием общего и свободного карнитина выявлена в цитоплазме и в митохондриях клеток сердца, цитоплазме клеток печени; в митохондриях головки эпидидимиса - между NO_x и содержанием общего карнитина.

Таблица 9 – Корреляционная взаимосвязь между фракциями карнитина и NO_x в сыворотке крови и исследуемых органах

Исследуемые параметры	Коэффициент корреляции Спирмена	p	Коэффициент корреляции Спирмена	p
Физ. раствор – L-NAME 25 – L-NAME 200			Твин - ГГЦ	
Сыворотка крови				
NO _x – Карнитин общий	0,76	0,000015	0,31	0,2390
NO _x – Карнитин свободный	0,68	0,00024	0,39	0,1284
Цитоплазматическая фракция сердца				
NO _x – Карнитин общий	0,56	0,00428	0,68	0,00339
NO _x – Карнитин свободный	0,59	0,0023	0,60	0,01342
Митохондриальная фракция сердца				
NO _x – Карнитин общий	0,60	0,001727	0,81	0,000109
NO _x – Карнитин свободный	0,71	0,000077	0,74	0,000948
Цитоплазматическая фракция печени				
NO _x – Карнитин общий	0,58	0,00252	0,67	0,00471
NO _x – Карнитин свободный	0,62	0,00125	0,61	0,01127
Митохондриальная фракция печени				
NO _x – Карнитин общий	0,47	0,01906	0,75	0,000761
NO _x – Карнитин свободный	0,41	0,0453	0,77	0,000477
Цитоплазматическая фракция головки эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,60	0,00179	0,68	0,00358
NO _x – Карнитин свободный	0,73	0,000037	0,66	0,00496
Митохондриальная фракция головки эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,66	0,00039	0,38	0,1415
NO _x – Карнитин свободный	0,4	0,8369	0,44	0,0834
Цитоплазматическая фракция хвоста эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,32	0,1263	0,32	0,2171
NO _x – Карнитин свободный	0,40	0,05203	0,19	0,4644
Митохондриальная фракция хвоста эпидидимиса				
NO _x – Карнитин общий	0,40	0,8306	0,13	0,6251
NO _x – Карнитин свободный	0,40	0,0498	0,12	0,6328

Между уровнем NO_x и общего карнитина в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии в сыворотке крови не обнаруживается статистически значимых корреляционных взаимосвязей. При этом в митохондриях сердца и печени выявлены сильные положительные корреляционные связи, а в цитоплазме клеток сердца, печени и головки эпидидимиса - умеренные корреляционные связи, что говорит о системном характере взаимосвязи изучаемых показателей.

Между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови обнаружена сильная отрицательная связь. В митохондриях исследуемых

органов также выявлены статистически значимые отрицательные корреляционные связи между уровнем гомоцистеина и содержанием общего карнитина: сердца $r = -0,72$, $p = 0,001436$; печени $r = -0,69$, $p = 0,003204$; головки эпидидимиса $r = -0,74$, $p = 0,001006$; хвоста эпидидимиса $r = -0,61$, $p = 0,01178$.

Комплекс проведенных исследований позволил предположить наличие протективного эффекта L-карнитина, заключающегося в выведении токсичных интермедиатов метаболизма метионина и неселективного ингибитора NO-синтаз L-N^o-нитроаргинина метилового эфира (L-NAME). Это косвенно подтверждено меньшей выраженностью дефицита NO и гипергомоцистеинемии в условиях исследуемых экспериментальных моделей на фоне введения L-карнитина (Рисунок 10). Зафиксированное увеличение активности супероксиддисмутазы митохондрий и уменьшение соотношения спонтанных карбонилированных белков к металл-индуцированным позволило подтвердить наличие антиоксидантного эффекта L-карнитина как при L-NAME опосредованном дефиците синтеза NO, так и в модели тяжелой гипергомоцистеинемии. Предполагаемые механизмы протективного эффекта L-карнитина в исследуемых экспериментальных моделях схематично представлены на Рисунке 9.



Рисунок 9 – Возможные механизмы протективного эффекта L-карнитина при введении L-NAME и гипергомоцистеинемии

Примечание – SAM – S- аденозилметионин, SAH- S-аденозилгомоцистеин, DDAH-1,2 – N^G,N^G диметиларгининдиметиламиногидролазы-1,2, NOS - NO-синтазы. Рисунок выполнен с помощью BioRender.com.(Лицензионное соглашение KG25GW2NXE)

Таким образом, обобщая вышеприведенные результаты исследования, можно утверждать о роли L-карнитина как протективного фактора для функционирования митохондрий, способствующего как поддержанию уровня NO, так и снижению содержания гомоцистеина при экспериментальных моделях L-NAME-индуцированного дефицита NO и гипергомоцистеинемии, вызванной метиониновой нагрузкой.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальный дефицит NO, индуцированный введением метилового эфира L-N^o-нитроаргинина (L-NAME) в митохондриях сердца, головки и хвоста эпидидимиса крыс приводит к снижению активности ферментов, участвующих в тканевом дыхании и окислительном фосфорилировании - СДГ и Н⁺-АТФазы. Данный эффект более выражен при использовании высокой дозы ингибитора (200 мг/кг). Также в этих условиях развивается окислительный стресс и уменьшается активность супероксиддисмутазы (СОД) митохондрий эпидидимиса.

2. Использование субстрата NO-синтаз L-аргинина совместно с L-NAME в дозе 200 мг/кг уменьшает степень окислительной модификации белков в митохондриях кардиомиоцитов, гепатоцитов и головке эпидидимиса, предотвращает снижение как активности СОД в обоих отделах эпидидимиса, так и активности ферментов, участвующих в тканевом дыхании и окислительном фосфорилировании в митохондриях сердца, печени и головке эпидидимиса.

3. Экспериментальный дефицит NO сопровождался снижением общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов, в митохондриях подобные изменения были зафиксированы только в головке эпидидимиса. Введение L-аргинина совместно с L-NAME предупреждало снижение эндогенного уровня общего карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток исследуемых органов, что было более выражено на фоне применения L-NAME в дозе 200 мг/кг.

4. Экзогенный L-карнитин уменьшает дефицит синтеза NO на фоне введения L-NAME. При его введении происходит снижение уровня молочной

кислоты в цитоплазме клеток печени, головки эпидидимиса, при дозе L-NAME 200 мг/кг и в сердце, при этом содержание лактата возрастает в митохондриях сердца, печени. L-карнитин предотвращает истощение резервно-адаптационного потенциала в митохондриях сердца и хвоста эпидидимиса, однако значимо не влияет на суммарное изменение количества карбонильных производных.

5. Тяжелая форма гипергомоцистеинемии сопровождается снижением уровня метаболитов NO в сыворотке крови, цитоплазме клеток и митохондриях сердца, печени и головки эпидидимиса и способствует развитию окислительного стресса, повышению активности СОД в митохондриях всех исследуемых тканей. Отмечается снижение активности ферментов, участвующих в биоэнергетических процессах клетки: СДГ - в сердце и H^+ -АТФазы - в головке и хвосте эпидидимиса.

6. Введение L-аргинина на фоне гипергомоцистеинемии приводит к увеличению концентрации метаболитов NO, уменьшению степени выраженности гипергомоцистеинемии и окислительной модификации белков.

7. При тяжелой форме гипергомоцистеинемии происходит значительное уменьшение уровня общего, свободного и связанного карнитина во всех субклеточных фракциях исследуемых органов. Применение L-аргинина на фоне сниженной генерации NO при экспериментальной гипергомоцистеинемии вызывает повышение уровня эндогенного общего карнитина в сыворотке крови и митохондриальной фракции изучаемых органов.

8. Применение L-карнитина в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии предупреждает повышение уровня гомоцистеина в сыворотке крови и увеличивает содержание метаболитов NO в изучаемых тканях. В митохондриях головки эпидидимиса обнаружен схожий с моделью L-NAME характер изменений в виде повышения уровня лактата под действием L-карнитина при сопутствующем увеличении активности ЛДГ.

9. Экспериментальные модели дефицита NO и гипергомоцистеинемии ассоциируются с развитием окислительного стресса, выражающегося в усилении окислительной модификации белков митохондрий изучаемых тканей,

снижением уровня метаболитов оксида азота и уменьшением содержания общего и свободного карнитина.

10. Между уровнем метаболитов NO и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, содержанием метаболитов NO и концентрацией свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме клеток головки эпидидимиса существует сильная положительная корреляционная взаимосвязь. Между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови, митохондриях сердца и головки эпидидимиса обнаружена сильная, а в печени и хвосте эпидидимиса умеренная отрицательная корреляционная связь.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ДАЛЬНЕЙШАЯ РАЗРАБОТКА ТЕМЫ

В данном диссертационном исследовании проведено комплексное изучение влияния L-карнитина на процессы коррекции митохондриальной дисфункции, вызванной нарушением редокс регуляции и сопровождающейся изменением NO сигнализации. Обнаружены и ранее неизвестные их свойства, одновременно с этим появились вопросы и предположения, требующие дальнейших подтверждений. Разработка этих вопросов может стать основой будущих научных исследований данной темы.

1. Проверка гипотезы о возможности снижения L-карнитином степени выраженности гипергомоцистеинемии, вызванной избыточным потреблением метионина, на модели животных с введением непосредственно гомоцистеина позволит внести вклад в определение биологического значения L-карнитина для функционирования организма животных и человека.

2. Обнаружение феномена повышения уровня лактата под влиянием карнитина хлорида внутри митохондрий в изучаемых патологических ситуациях может иметь важное значение для биохимии и клинической медицины, но требуется дальнейшее подтверждение системности этого эффекта в других органах, других патологических моделях и оценка биологической значимости данного явления.

3. Продемонстрированное в диссертационной работе повышение уровня метаболитов NO (II) под воздействием карнитина хлорида подтверждает наличие взаимосвязи между NO-сигнализацией и карнитиновым гомеостазом, дальнейшие исследования с включением в них определения активности ферментов транспорта карнитина внесет вклад в развитие исследований в этой области.

4. Выявленная способность L-аргинина снижать содержание гомоцистеина и увеличивать концентрацию экзогенного уровня карнитина в условиях L-NAME-индуцированного снижения уровня оксида азота требует целого комплекса исследований для подтверждения предполагаемых механизмов.

5. Результаты данной работы позволяют углубить представления о терапевтическом потенциале L-карнитина и стать основой для дальнейших исследований его применения с целью коррекции процессов, ассоциированных с нарушением редокс-регуляции, сопровождающейся изменением NO-опосредованной регуляции митохондрий и способностью выводить токсические метаболиты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленный в работе дефицит NO, опосредованный введением L-NAME в дозах 25 и 200 мг/кг, сопровождался накоплением окислительно модифицированных белков и снижением содержания L-карнитина в митохондриях тканей головки и хвоста эпидидимиса, что указывает на важную роль NO для митохондрий придатка яичка и позволяет рекомендовать данную экспериментальную модель для исследования значения NO при нарушениях фертильности.

2. Разработанная модель метиониновой нагрузки у крыс может быть предложена для изучения токсических эффектов повышенного уровня гомоцистеина и возможностей их коррекции.

3. Обнаруженное снижение уровня эндогенного L-карнитина в изучаемых экспериментальных моделях позволяет рекомендовать оценку уровня общего L-карнитина сыворотки крови для выявления и коррекции его дефицита при

патологических состояниях и заболеваниях, сопровождающихся дефицитом выработки NO.

4. Выявленная в работе сильная положительная связь между содержанием общего карнитина и метаболитов NO в митохондриях гомогенатов сердца, печени и головки эпидидимиса позволяет рассматривать карнитина хлорид в качестве потенциального терапевтического средства, улучшающего функциональный статус митохондрий при состояниях, связанных с нарушением генерации NO.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России

1. Воздействие донора оксида азота (II) L-аргинина на активность митохондриальных оксидоредуктаз и окислительные процессы в ткани сердца крыс в условиях дефицита оксида азота / **В.И. Звягина**, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // **Фундаментальные исследования**. – 2013. – №8. – С.1087 - 1091.

2. Медведев, Д.В. Изучение окислительных процессов в ткани сердца крыс при моделировании дефицита оксида азота / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // **Сибирский медицинский журнал**. – 2013. – Т.28, № 2. – С.92-96.

3. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**, М.А. Фомина. – Текст : непосредственный // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова**. – 2014. – №4. – С. 42-46.

4. Влияние карнитина хлорида на функциональное состояние митохондрий в условиях дефицита синтеза оксида азота (II) / **В.И. Звягина**, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // **Пермский медицинский журнал**. – 2015. – Т.32, №2. – С. 108-114.

5. Изучение функционального состояния митохондрий придатка яичка крыс в условиях изменения синтеза оксида азота (II) / **В.И. Звягина**, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // **Казанский медицинский журнал**. – 2015. – Т.96, №5. – С. 814-818.

6. Медведев, Д.В. Изучение дисфункции митохондрий кардиомиоцитов в условиях гипергомоцистеинемии и дефицита оксида азота / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // **Казанский медицинский журнал**. – 2015. – Т.96, №5. – С. 837-843.

7. Медведев, Д.В. Метаболизм митохондрий клеток сердца при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // **Фундаментальные исследования**. – 2015. – №2-4. – С. 734-739.

8. Медведев, Д.В. Изучение биохимических механизмов развития дисфункции митохондрий гепатоцитов при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В.

Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // **Вопросы питания**. – 2016. – Т.85, №1. – С. 29-35.

9. **Звягина, В.И.** Биохимические изменения, возникающие в митохондриях придатка яичка крыс на фоне назначения карнитина хлорида, при экспериментальной гипергомоцистеинемии / В.И. Звягина, Э.С.Бельских, Д.В. Медведев. – Текст : непосредственный // **Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле**. – 2017. – Т. 27, вып.3. – С.344-350.

10. Медведев, Д.В. Молекулярные механизмы токсического действия гомоцистеина / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // **Кардиологический вестник**. – 2017. – Т.12, №1. – С. 52-57.

11. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии / **В.И. Звягина**, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // **Медицинский вестник Северного Кавказа**. – 2018. – №1. – С.78-81.

12. **Звягина, В.И.** Карнитина хлорид снижает степень выраженности экспериментальной гипергомоцистеинемии и способствует утилизации лактата митохондриальной фракцией эпидидимиса крыс / В.И. Звягина, Э.С. Бельских. – Текст : непосредственный // **Биомедицинская химия**. – 2021. – Т. 67, вып.4. – С.338-346.

13. Протективные эффекты L-аргинина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой / **В.И. Звягина**, К.Б. Шумаев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова**. – 2022. – №4. – С. 457-470.

14. **Zvyagina, V.I.** Comparative assessment of the functional activity of rat epididymal mitochondria in oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia and L-NAME administration / V.I. Zvyagina, E.S. Belskikh. – Text: visual // **Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii**. – 2022. – Vol. 58, № 2. – P.126–140.

Публикации в других изданиях

15. Воздействие L- аргинина и L-карнитина на активность митохондриальных ферментов сердца крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота / **В.И. Звягина**, Э.С. Бельских, Д.В. Фрольцов [и др.]. – Текст : непосредственный // Российская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицинской биохимии и клинической лабораторной диагностики», посвященная памяти проф. Д.М.Зубаирова: сборник научных статей / под общ. ред. проф. И.Г. Мустафина. – Казань: Изд-во «Отечество», 2013. – С.73-78.

16. **Звягина, В.И.** Изменения активности митохондриальных ферментов ткани сердца в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота (II) / В.И. Звягина, Э.С. Бельских, Д.В. Фрольцов. – Текст : непосредственный // Материалы IX Междунар. науч.-практ. конф. «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем практического здравоохранения». – Астрахань, 2013. – С. 40-42.

17. **Звягина, В.И.** Изучение активности ферментов митохондрий ткани печени в условиях моделирования снижения синтеза оксида азота (II) / В.И. Звягина, Э.С. Бельских, Д.В. Фрольцов. – Текст : непосредственный // Материалы XII региональной науч.-практ. конф. «Обмен веществ при адаптации и повреждении». – Ростов-на-Дону, 2013. – С. 22-25.

18. Коррекция метаболических нарушений в митохондриях печени крыс L-карнитином в условиях дефицита синтеза оксида азота (II) / **В.И. Звягина**, Э.С. Бельских, Д.В. Фрольцов [и др.]. – Текст : непосредственный // Российская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицинской биохимии и клинической лабораторной диагностики», посвященная памяти проф. Д.М.Зубаирова: сборник научных статей / под общ. ред. проф. И.Г. Мустафина. – Казань: Изд-во «Отечество», 2013. – С.79-84.
19. Медведев, Д.В. Влияние модификации интенсивности синтеза оксида азота с помощью L-NAME и аргинина на активность ферментов митохондрий клеток печени крыс / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология: науч. чтения: сб. тезисов Всерос. науч. конф., посвящ. 90-летию со дня рождения проф. А.А.Никулина / под общ. ред. Е.Н.Якушевой. – Рязань: РИОРязГМУ, 2013. – С.61-65.
20. Медведев, Д.В. Влияние повышенного уровня гомоцистеина в сыворотке крови на метаболизм митохондрий сердца крыс / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // Биохимия – основа наук о жизни: Междунар. симпозиум, посвящ. 150-летию образования кафедры биохимии Казанского университета: сборник трудов / ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». – Казань, 2013. – С. 95-96.
21. **Звягина, В.И.** Значение оксида азота в изменении метаболизма митохондрий ткани сердца крыс при повышенном уровне гомоцистеина в сыворотке крови / В.И. Звягина, Д.В. Медведев. – Текст : непосредственный // Вестник Московского государственного областного гуманитарного института. Серия: Медико-биологические науки. – 2014. – №2. – С.95-105.
22. **Звягина, В.И.** Изучение протективного эффекта карнитина хлорида на активность митохондриальных оксидоредуктаз эпидидимиса крыс в условиях L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции / В.И. Звягина, Д.В.Медведев. – Текст : непосредственный // Сборник материалов Междунар. науч.-практ. конф. «Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации» / под общ. ред М.А. Ханиной, отв. ред. В.А. Киселева. – Орехово-Зуево: МГОГИ, 2014. – С.39-46.
23. Изменение активности митохондриальных ферментов тканей добавочных половых желез в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота (II) / **В.И. Звягина**, Э.С. Бельских, Д.В. Фрольцов [и др.]. – Текст : непосредственный // Материалы XIII Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении». – Ростов-на-Дону, 2014. – С. 39-42.
24. Медведев, Д.В. Воздействие карнитина хлорида на функциональное состояние митохондрий сердца крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота / Д.В.Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // X юбил. междунар.я конф. «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии»: программа и тезисы докладов. – Пицунда, 2014. – С. 19.
25. **Звягина, В.И.** Значение оксида азота в изменении метаболизма митохондрий ткани сердца крыс при повышенном уровне гомоцистеина в сыворотке крови / В.И. Звягина, Д.В. Медведев. – Текст : непосредственный // Сборник материалов II Междунар. науч.-практ. конф. «Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации». – Орехово-Зуево: МГОГИ, 2015. – С.224-230.
26. **Звягина, В.И.** Изучение протективного эффекта карнитина хлорида на функциональную активность митохондрий эпидидимиса крыс в условиях L-NAME-индуцированного синтеза оксида азота (II) / В.И. Звягина, Д.В.Медведев. – Текст : непосредственный // Достижения современной фармакологической науки : сборник

материалов Всерос. конф. молодых ученых с Междунар. участием, посвящ. 150-летию со дня рождения акад. Н.П. Кравкова. – Рязань, 2015. – С.118-122.

27. Изучение карнитинового гомеостаза митохондрий ткани сердца крыс в условиях L-NAME индуцированного изменения синтеза оксида азота / **В.И. Звягина**, Д.В.Медведев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Междунар. конф. IT + M&Eс'2015. Весенняя сессия. – Гурзуф, 2015. – С.23.

28. Исследование функционального состояния митохондрий кардиомиоцитов в условиях L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции / **В.И. Звягина**, О.М.Урясьев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // Материалы ежегодной науч. конф. Рязанского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова, посвящ. 65-летию работы университета на Рязанской земле. – Рязань, 2015. – С. 243-245.

29. Медведев, Д.В. Карбонилирование белков митохондрий кардиомиоцитов в условиях гипергомоцистеинемии / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // Материалы XIV регион. науч.-практ. конф. с Междунар. участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении. Дни молекулярной медицины на Дону». – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 28-32.

30. Оценка протективного влияния карнитина хлорида на функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов в условиях L-NAME-индуцированного синтеза оксида азота (II) / **В.И. Звягина**, О.М. Урясьев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // Сборник материалов X Национального конгресса терапевтов, посвящ. 140-летию со дня рождения М.П. Кончаловского. – Москва, 2015. – С.168-169.

31. Бельских, Э.С. Современные представления о патогенезе и подходах к коррекции митохондриальной дисфункции / Э.С. Бельских, **В.И. Звягина**, О.М.Урясьев. – Текст : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2016. – №1. – С.103-112.

32. **Звягина, В.И.** Значение оксида азота в изменении метаболизма митохондрий ткани сердца крыс при повышенном уровне гомоцистеина в сыворотке крови / В.И. Звягина, Д.В. Медведев, М.А. Киселев. – Текст : непосредственный // Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации: сборник материалов заочной науч.-практ. конф. с Междунар. участием / под общ. ред. С.Г. Марданлы, В.В. Помазанова. - Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ, 2016.– С. 61-68.

33. **Звягина, В.И.** Изменения биохимических показателей в митохондриях эпидидимиса крыс при экспериментальном снижении синтеза NO(II) / В.И. Звягина, Э.С. Бельских, Д.В. Медведев. – Текст : непосредственный // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А.Строева: материалы Всерос. науч. - практ. конф. студентов и молодых специалистов с междунар. участием.– Рязань: РязГМУ, 2016. – С.25-30.

34. **Звягина В.И.** Особенности энергетического обмена кардиомиоцитов при тяжёлой форме гипергомоцистеинемии у крыс / В.И. Звягина, Д.В. Медведев. – Текст : непосредственный // Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации: сборник материалов заочной науч.-практ. конф. с Междунар. участием / под общ. ред. С.Г. Марданлы, В.В. Помазанова. – Орехово-Зуево: РИО ГГТУ, 2016. – С. 68-70.

35. Медведев, Д.В. Возможности прямого токсического действия гомоцистеина на митохондрии в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии / Д.В.Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст : непосредственный // Материалы ежегодной науч. конф. Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова / редкол.: Р.Е. Калинин, В.А. Кирюшин, И.А. Сучков; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань: РИО РязГМУ, 2016. – С. 398-400.

36. Медведев, Д.В. Распределение гомоцистеина в организме крысы при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Д.В. Медведев, **В.И. Звягина**. – Текст (визуальный): непосредственный // Свободные радикалы, антиоксиданты и старение: сборник статей III Всерос. науч. конф. с Междунар. участием, посвящ. юбилею засл. работника высш. шк. РФ, д-ра биол. наук, проф. Д.Л. Теплового (Астрахань, 2-3 ноября 2016 г.) / сост.: Е.И. Кондратенко, Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев [и др.]. – Астрахань : Издат. дом «Астраханский университет», 2016. – С. 72-75.

37. **Звягина, В.И.** Изменения уровня метаболитов NO в сыворотке крови и митохондриях сердца, легких при гипергомоцистеинемии и при дефиците NO, вызванном L-NAME / В.И. Звягина, Д.В. Медведев, О.Н. Сучкова. – Текст : непосредственный // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: материалы X Междунар. науч. - практ. конф. – Витебск, 2018. – С.36-40.

38. **Звягина, В.И.** Воздействие карнитина хлорида на степень выраженности гипергомоцистеинемии / В.И. Звягина, Э.С.Бельских. – Текст : непосредственный // Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований и клинической практике. Традиции и перспективы». – Тюмень, 2019. – С. 35-39.

39. **Звягина, В.И.** Влияние карнитина хлорида на метаболизм лактата в эпидидимисе крыс при гипергомоцистеинемии / В.И. Звягина, Э.С.Бельских. – Текст : непосредственный // Материалы VIII Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием, посвящ. году науки и технологий «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации», сборник материалов заочной науч.-практ. конф. с Междунар. участием / под общ. ред. С.Г. Марданлы, В.В. Помазанова. - Орехово-Зуево: РИО ГГТУ, 2021. – С.38-40.

40. Баланс фракций эндогенного карнитина в тканях сердца при экспериментальном дефиците оксида азота изолированно и в сочетании с L-аргинином / **В.И. Звягина**, О.М. Урясьев, Э.С. Бельских [и др.]. – Текст : непосредственный // Сборник докладов VIII Всерос. науч. конф. молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» / под ред. Р.Е. Калинина, И.А. Сучкова; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань, 2022. – С.118-119.

Список сокращений и условных обозначений

АДМА – асимметричный диметиларгинин
АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны
АФА – активные формы азота
АФК – активные формы кислорода
ГГЦ – гипергомоцистеинемия
КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
H⁺-АТФаза – протонтранспортирующая двухсекторная АТФаза
ОМБ – окислительная модификация белков
РАП – резервно-адаптационный потенциал
СДГ – сукцинатдегидрогеназа
СОД – супероксиддисмутаза
L-NAME – метиловый эфир L-N^o-нитроаргинаина
NO_x – метаболиты оксида азота (II)
NOS – NO-синтаза