

Нарушение метаболизма аминоктиолов при односторонней ишемии почки крысы

¹ Отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. акад. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

e-mail: alexandroval@spmu.rssi.ru

Реферат

Методом ВЭЖХ-анализа изучали содержание общего гомоцистеина (Гци), цистеина (Цис) и глутатиона (Глу) в плазме крови и в тканях крыс в условиях ишемии одной почки. Исследование проводилось на модели «две почки — один зажим», калибром 0,13 мм. В плазме крови опытных крыс концентрация Гци была на 36 %, а концентрация Цис — на 14 % выше, чем у ложнопериоперированных крыс. Содержание оГци как в интактных, так и клипированных почках опытных крыс было примерно на 40 % выше контрольного уровня, но различий по уровню Гци в ишемизированной и интактной почках опытных животных не наблюдали. Содержание Цис в почке после клипирования было ниже, чем в интактной почке, в 1,6 раза и в 1,48 раза ниже, чем в почках контрольных животных. Содержание Глу в ишемизированной почке оставалось в пределах контрольных величин. В печени животных опытной и контрольной групп по уровню аминоктиолов различий не было выявлено. Предполагается нарушение катаболизма Гци по пути транссульфирования при угнетении функции одной почки.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, цистеин, глутатион, экспериментальная ишемия, почки, крысы.

Kuzmenko N. V.¹, Alexandrova L. A.^{1, 2}, Chifu S. G.^{1, 2},
Blashko E. L.^{1, 2}, Zhloba A. A.^{1, 2}, Cirilin. V. A.^{1, 2}

Derangement of aminothiols metabolism under the rat renal ischemia

¹The Saint Petersburg State Pavlov Medical University, SC Department of Biochemistry

²V. A. Almasov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint Petersburg

e-mail: alexandroval@spmu.rssi.ru

Abstract

The levels of endogenous plasma and tissues aminothiols were studied after ischemia of rat kidney. An experimental model of hypertension in rats according to Goldblatt was used in the study. The levels of plasma total homocysteine and cystein of the experimental rats were increased about 36 % and 13 % respectively as compared to control group of rats. Total homocysteine level was increased by appproximately in 40 % both in intact kidney and in ischemic kidney as compared to that in control group. The level of cystein in the ischemic kidney was lower in 1,6 times, as compared to intact kidney, and in 1,5 times in comparison with control rats kidney. It is concluded that ischemia of one of kidney led to stable intermediate hyperhomocysteinemia owing to deranged of homocysteine transsulphuration pathway.

Keywords: hyperhomocysteinemia, cystein, ischemia, kidney.

Введение

Важную роль в регуляции уровня артериального давления играют почки. Общеизвестно, что стойкое нарушение баланса между ренин-ангиотензин-альдостероновой и калликреин-кининовой системами может являться причиной развития артериальной гипертензии [2]. Одной из причин, приводящих к усилению прессорного влияния почек, является одно- или двухстороннее сужение просвета почечной артерии, вследствие которого развивается ишемия почки. Многочисленные исследования на различных животных по изучению патогенеза реноваскулярной

гипертензии (РВГ) с наложением зажимов на одну или обе почечные артерии показали, что выраженность гипертензии зависит от степени сужения просвета почечной артерии [7].

В связи с этим в патогенетический механизм РВГ могут вовлекаться разные пути метаболизма с различной степенью выраженности нарушений и развития осложнений. У больных РВГ наиболее часто встречается одностороннее поражение почечной артерии [2], поэтому была выбрана экспериментальная модель, основанная на наложении зажима на одну

Таблица 1

Показатель	оГци	Цис	Глу
Правая почка (n=8)	0,091±0,009	4,10±0,04	0,049±0,006
Левая почка (n=8)	0,082±0,010	4,0±0,12	0,050±0,004
Почки суммарно (n=16)	0,087±0,008	4,09±0,06	0,050±0,003
Плазма крови (n=8)	4,7±0,9	192,4±6,3	44,6±4,9

Содержание (мкмоль/г ткани) оГци, Цис и Глу в клипированной и интактной почке и плазме крови (мкмоль/л) опытных крыс

Таблица 2

Показатель	оГци	Цис	Глу
Клипированная почка (n=11)	0,127±0,0039, P ₁ <0,05	2,72±0,42, P ₁ <0,05, P ₂ <0,001	0,049±0,006
Интактная почка (n=11)	0,116±0,0028, P ₁ <0,05	4,57±0,35	0,047±0,005
Плазма крови (n=11)	6,39±0,29, P ₁ <0,05	219,6±11,8, P ₁ <0,05	42,0±4,2

Примечание: P₁ – уровень достоверности различий по сравнению с контролем (ложнооперированные животные); P₂ – уровень достоверности различий по сравнению с интактной почкой.

из почечных артерий при сохранении обеих почек «две почки—один зажим» (модель Голдблатта). Исследования последнего десятилетия указывают на тот факт, что повышенный уровень гомоцистеина (Гци) в крови является независимым фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний [4, 6, 8]. Известно, что почки, наряду с печенью, метаболизируют значительные количества Гци, образуя метионин в организме, в основном посредством реметилирования и цистатионинового путей метаболизма. Избыточное поступление в организм незаменимой аминокислоты метионина сопровождается повышением количества Гци, образуя метионин Гци и цистеина (Цис). Аминотиол Гци является промежуточным метаболитом многочисленных реакций трансметилирования, протекающих в тканях организма. Достаточно полное реметилирование Гци не может быть обеспечено в тканях и завершается в печени и почках, дополняясь преобразованием по цистатионинному пути, в котором образуется Цис. Из последнего образуются таурин и сульфаты. Гци в больших концентрациях начинают играть роль существенного фактора развития неблагоприятного ремоделирования сосудистой стенки [5]. Роль почек при ослаблении функции одной из них в формировании гипергомоцистеинемии изучена недостаточно.

Цель исследования

Цель настоящего исследования заключалась в выяснении изменений в содержании Гци и основных аминотиолов в тканях и крови в условиях односторонней ишемии почек крысы.

Материалы и методы исследования

Работа была проведена на лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 200–250 г. Крысы со-

держались в условиях свободного доступа к пище и воде. Исследование проводилось на модели «две почки один зажим» калибром 0,13 мм (*Kent Scientific Corporation*). Контролем служила группа ложно оперированных крыс. Операция по установке зажима на правую почечную артерию и ложнооперативное вмешательство проводились по стандартной методике [3]. Ежедневно в течение двух месяцев у бодрствующих животных проходила регистрация систолического артериального давления на хвостовой артерии крысы, с использованием компьютерной программы Chart на NIBP системе неинвазивного измерения кровяного давления (*AD Instruments Pty Ltd*). Через два месяца всем крысам в условиях свободного поведения проводилась прямая регистрация среднего артериального давления с использованием автоматической установки и программы Kardio plus [1].

В условиях эфирного наркоза у крыс извлекали почки, печень и кровь (плазму отделяли с использованием цитрата натрия в качестве стабилизатора) и хранили в холодильнике при –80 °С до начала анализа. Биохимические исследования проводили в плазме крови и в 10 % гомогенатах органов, приготовленных в 0,154 М растворе KCl. Уровень общего Гци (оГци), Цис и глутатиона (Глу) определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1100 по методу [9]. Статистическую обработку данных проводили по программе SPSS 17,0 для Windows.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментальная модель, основанная на наложении зажима на одну из почечных артерий при сохранении одной из почек крыс (2K1C-модель Голдблатта), представляет собой модель РВГ, вызванной стенозом почечной артерии. В данном исследовании с использованием зажима калибром 0,13 мм, РВГ раз-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

вилась на 3–4 неделю после операции в 30 % случаев. Согласно литературным данным [7], при использовании данной модели гипертензии с зажимом калибра 0,20 мм у 10–20 % крыс уровень артериального давления оставался в норме. Максимальной величины гипертензия достигала на 4 неделе после постановки зажима, уровень систолического артериального давления поднимался до $172,1 \pm 20$ мм рт. ст. при средних показателях $119,6 \pm 7,54$ в контрольной группе.

По содержанию оГци, Цис и Глу в правой и левой почках крыс контрольной группы статистически значимых различий не было (табл. 1), поэтому соответствующие данные были объединены.

В плазме крови опытных крыс (табл. 2) концентрация оГци была на 36 %, а концентрация Цис на 14 % выше, чем у ложнопериоперированных крыс. Различий в концентрации Глу в плазме не было.

В группе опытных животных (табл. 2) наблюдалось повышение, примерно на 40 % содержания оГци как в интактных, так и клипированных почках по сравнению с его уровнем в контрольной группе. При этом в опытной группе различий по уровню оГци в ишемизированной и интактной почках не наблюдали. Содержание Цис в интактной почке животных опытной группы существенно не изменялось по сравнению с данными контрольной группы.

В ишемизированной почке концентрация Цис была ниже, чем в интактной почке, в 1,6 раза ($p < 0,05$) и в 1,5 раза ниже, чем в почках контрольных животных ($p < 0,05$).

Несмотря на снижение уровня Цис, предшественника Глу, в ишемизированной почке, содержание Глу в ней оставалось в пределах контрольных величин. По содержанию Глу в интактной почке опытных и почках контрольных крыс статистически значимых различий также не было. Корреляции показателей артериального давления и содержания аминокислот в почках и плазме крови не выявлено.

Расчет коэффициента корреляции Спирмана ($r = 0,865$) показал существенную ($p < 0,01$) двустороннюю связь показателей концентрации оГци и

Цис в почках ложнопериоперированных крыс. В опытной группе, как в интактной, так и клипированной почках этой связи не выявлено. Учитывая тот факт, что в норме около 80 % Гци распадается в почках по пути транссульфирования с образованием цистатионина и цистеина, можно предположить, что отсутствие корреляции оГци и Цис в почках опытных крыс свидетельствует о существенном нарушении этого пути катаболизма Гци. На это косвенно указывает высокое значение коэффициента двусторонней корреляции Спирмана ($r = 0,758$) между уровнем оГци в плазме и интактной почке опытных животных.

В исследованиях, проведенных на больших группах обследуемых, было показано, что ухудшение функций почек, в частности, снижение клубочковой фильтрации, сопровождается нарастанием оГци крови [6]. Было также установлено, что основным местом метаболизма Гци в почках является тубулярный аппарат [5]. Таким образом, нарушения функции почек могут быстро формировать гипертензивное состояние и позднее, могут приводить к устойчивой гипергомоцистеинемии с возможным ускорением атерогенеза.

Выводы

1. Пережатие почечной артерии крыс зажимом 0,13 мм (модель Гольтблатта 2K1C) приводит к устойчивой умеренной гипергомоцистеинемии спустя 2 месяца после операции и не отражается на уровне другого аминокислоты — глутатиона.

2. В ишемизированной и интактной почках повышение уровня оГци, вероятно обусловлено нарушением его катаболизма по пути транссульфирования, что сопровождается снижением уровня цистеина в клипированной почке.

3. В условиях данной модели РВГ прямой взаимосвязи между подъемом АД и нарушением метаболизма аминокислот не установлено.

4. Модель Гольтблатта 2K1C (зажим калибра — 0,13 мм) может быть использована для как создания РВГ, так и умеренной гипергомоцистеинемии.

Литература

1. Королёв, Д. В. Программный комплекс для исследования зависимости артериального, перфузионного давления и сигнала ЭКГ от различных воздействий / Д. В. Королёв [и др.] // Математ. методы в технике и технологиях ММТТ – XV: сб. научн. тр. — Тамбов: Тамбов. гос. техн. ун-т. — 2002. — Т. 7. — С. 155–156.
2. Чиж, А. С. Нефрология в терапевтической практике / А. С. Чиж. — М.: Высшая школа, 1998. — 557 с.
3. Hell, F. Angiotensin II-induced calcium signaling in the afferent arteriole from rats with two-kidney, one-clip hypertension / F. Hell [et al] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2006. — Vol. 291. — № 1. — P. 140–147.
4. House, J. D. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney / J. D. House, M. E. Brosnan, J. T. Brosnan // *Biochem J.* — 1997. — Vol. 328 (Pt 1). — P. 287–292.
5. Graham, M. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European concerted action project / M. Graham [et al] // *JAMA.* — 1997. — Vol. 277. — № 22. — P. 1775–1781.
6. Kielsteina, J. T. Two cardiovascular risk factors in one? Homocysteine and its relation to glomerular filtration rate a meta-analysis of 41 studies with 27,000 participants / J. T. Kielsteina [et al] // *Kidney Blood Press Res.* — 2008. — Vol. 31. — P. 259–267.
7. Leenen, F. Pressor mechanisms in renovascular hypertensive rats / F. Frans, H. H. Leenen, Martin G. Myers // *Handbook of Hypertension. Vol. 4: Experimental and genetic models of hypertension* / eds by W. de Jong. — Elsevier Science Publishers B. V., 1984. — P. 24–27.
8. Muntner, P. The prevalence of nontraditional risk factors for coronary heart disease in patients with chronic kidney disease / P. Muntner [et al] // *Ann. Intern. Med.* — 2004. — Vol. 140. — № 1. — P. 9–17.
9. Zhloba, A. A. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection / A. A. Zhloba, E. L. Blashko // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2004. — Vol. 800. — № 1–2. — P. 275–280.