

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Направление: 020400.62 – Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ А И Е НА РАЗВИТИЕ КРЫС С
ГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

Работа завершена:

"30" мая 2016 г.  (А.И. Гильмутдинов)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

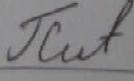
к.б.н., ст. преп. кафедры физиологии

человека и животных КФУ

"30" мая 2016 г.  (О.В. Яковлева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., проф.

"1" юн 2016 г.  (Г.Ф. Ситдикова)

Казань-2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Физико-химические свойства гомоцистеина	7
1.2 Метаболизм гомоцистеина в организме	7
1.3 Гипергомоцистеинемия	12
1.4 Влияние гомоцистеинемии на развитие плода	16
1.5 Функция нефронов у крыс с гипергомоцистеинемией	17
1.6. Роль антиоксидантов в развитии плода у беременных самок с гомоцистеинемией	19
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Объект исследования	23
2.1.1 Динамика общего развития крысят	25
2.1.2 Тесты исследования скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов у крысят	25
2.1.3 Ориентировочно-исследовательская деятельность и уровень тревожности у крысят с гомоцистеинемией	27
2.1.4 Статистическая обработка экспериментальных данных	29
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30
2.2.1 Оценка физического развития в первый месяц жизни крысят	30
2.2.2 Исследование скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов у крысят	32
2.2.3 Ориентировочно-исследовательская деятельность и уровень тревожности у крысят с гипергомоцистеинемией	35
ВЫВОДЫ	40

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ГЦ – гомоцистеин

ГГЦ – гипергомоцистеинемия (гомоцистеинемия)

Met – метионин

MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза

S-AH – S-аденозилгомоцистеина

GNMT – глицин N- метилтрансфераза

GPx – глутатион пероксидазы

MTA – метилтиоаденозин

SAHH – S- аденозил гомоцистеингидролазы

MTR – метионин-синтазы

SAM – S – аденозилметионин

SOD м супероксид дисмутаза

ICMT – изопренилцистеин карбоксиметилтрансферазы

АГ – артериальная гипертензия

АД – артериальное давление

ЛНП – липопротеиды низкой плотности

ОП – Открытое поле

СЭС - Стресс эндоплазматической сети

ВВЕДЕНИЕ

Гомоцистеинемия – это заболевание, связанное с повышенным содержанием гомоцистеина (более 15 мкм/л) в плазме крови. Гомоцистеин является производным превращения метионина, являющимся незаменимой кислотой. Из гомоцистеина в дальнейшем образуется цистеин – аминокислота, которая не входит в число незаменимых аминокислот. Повышенная доза гомоцистеина в крови может регулироваться тем, что он способен превращаться обратно в метионин, химизм которого обеспечивается высокой концентрацией фолиевой кислоты за счет ее перевода в активную форму 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктазой (MTHFR). Снижение активности этого фермента является одной из основных причин возникновения гипергомоцистеинемии [Скворцов *с соавт.*, 2011]. Гомоцистеин способен оказывать токсическое воздействие на клетку, поэтому существуют механизмы выведения его в кровь. И при избытке гомоцистеина в организме, он накапливается в крови, и основным местом повреждающего действия оказывается внутренняя стенка сосудов. В результате окисления гомоцистеина в плазме крови образуется большое количество радикалов, содержащих активный кислород [Чокинэ, 2011]. Одним из продуктов его окислительных превращений является гомоцистеиновая кислота, способная также вызвать рост активных форм кислорода и некротическую гибель клеток.

Также избыточная концентрация гомоцистеина способна вызывать нарушение когнитивных функций, которое так или иначе будет проявляться в ориентировочно-двигательной активности и мелкой моторике животного [Herrmann, 2006; West *et al.*, 2011]. Кроме этого, что гомоцистеин приводит к врожденным дефектам, вызванных тем, что гомоцистеин специфически ингибирует превращение ретиналя в ретиноевую кислоту. Она, в свою очередь, выполняет функцию морфогена у плода, регулируя гены, которые контролируют сегментацию тела у животных в процессе эмбрионального развития. В настоящее время является актуальным изучение влияния

повышенных доз гомоцистеина на развитие организма ввиду повседневного употребления продуктов, богатых метионином и для этого необходимо изучать токсичность, образующейся в избыточных количествах при его чрезмерном употреблении, а также механизмов, способствующих восстановлению и поддержанию гомеостаза после стрессовых нагрузок, вызванных данным веществом.

Для изучения компенсаторного механизма при гипергомоцистеинемии была применены антиоксиданты — вещества, ингибирующие окисление, которые поступают из рациона и могут нейтрализовать окислительное действие свободных радикалов и других веществ. В качестве этих соединений были выбраны Витамин А (ретинол) и Витамин Е (токоферол).

Целью данной работы является исследование влияния витаминов А и Е на физическое развитие, формирование рефлексов и ориентировочно-двигательной активности у крысят, родившихся от крыс с повышенным содержанием гомоцистеина в крови.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать изменения в физическом развитии крысят при витаминной диете, в условиях гомоцистеинемии и объединении этих факторов.
2. Выявить действие гомоцистеинемии и витаминной диеты на развитие сенсо-моторных двигательных рефлексов у крысят.
3. Исследовать ориентировочно-двигательную активность крысят в тесте «Открытое поле» при гомоцистеинемии, витаминной диете и объединении этих факторов.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Физико-химические свойства гомоцистеина

Гомоцистеин (ГЦ) — это серосодержащая аминокислота, не являющаяся структурным элементом белков с формулой $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-CO}_2\text{H}$. Она является гомологом цистеину, отличается от него на одну метиленовую группу. Гомоцистеин синтезируется из метионина за счет удаления терминальной C^ϵ метильной группы. Он способен обратно конвертировать в метионин с помощью витаминов В-группы и фолиевой кислоты.

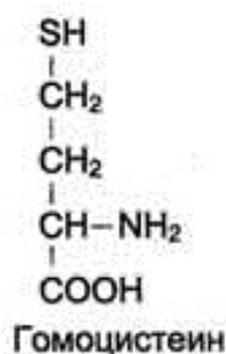


Рисунок 1 – Химическая формула гомоцистеина.

Гомоцистеин – это твердое вещество с молярной массой 135.18 г/моль и температурой плавления 232-233 °С, способное вступать в реакцию дегидратазное дезаминирование при участии фермента.

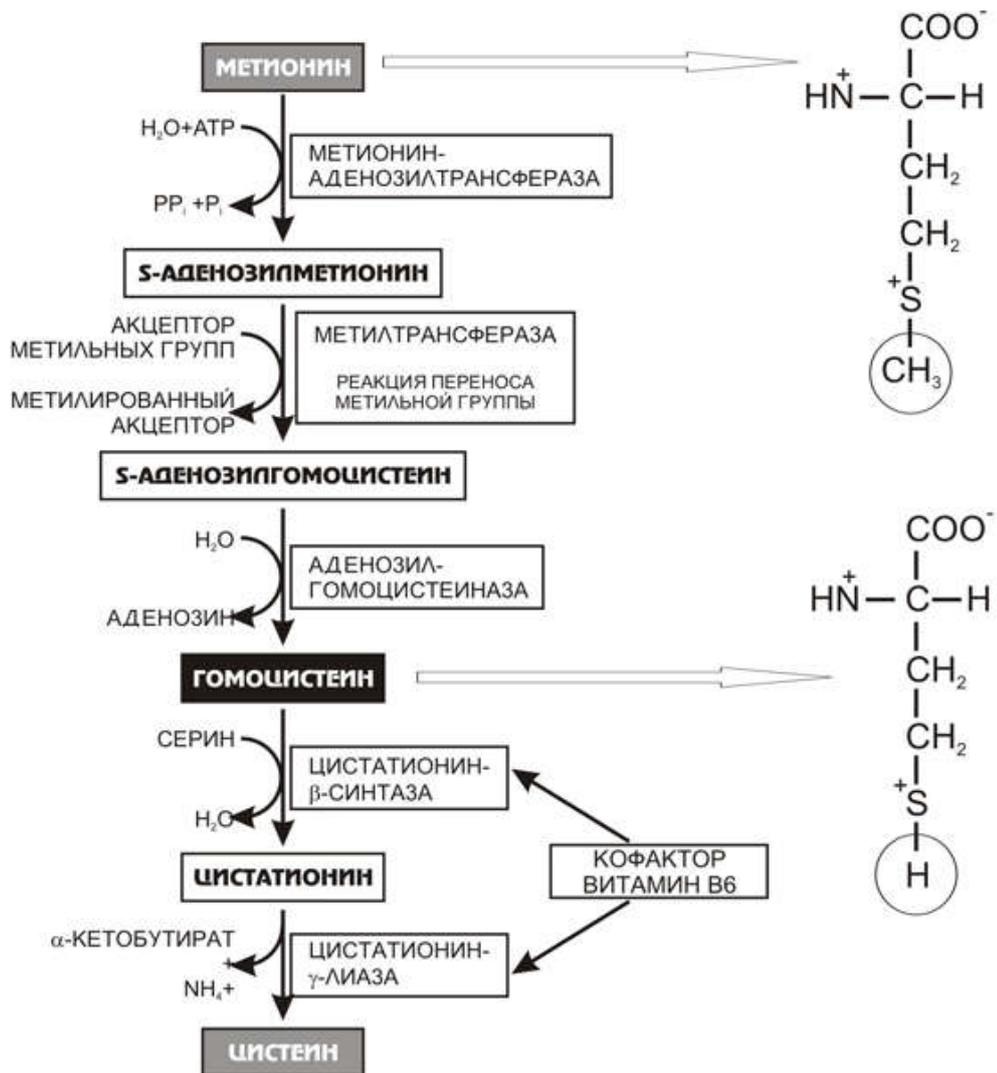
1.2 Метаболизм гомоцистеина в организме

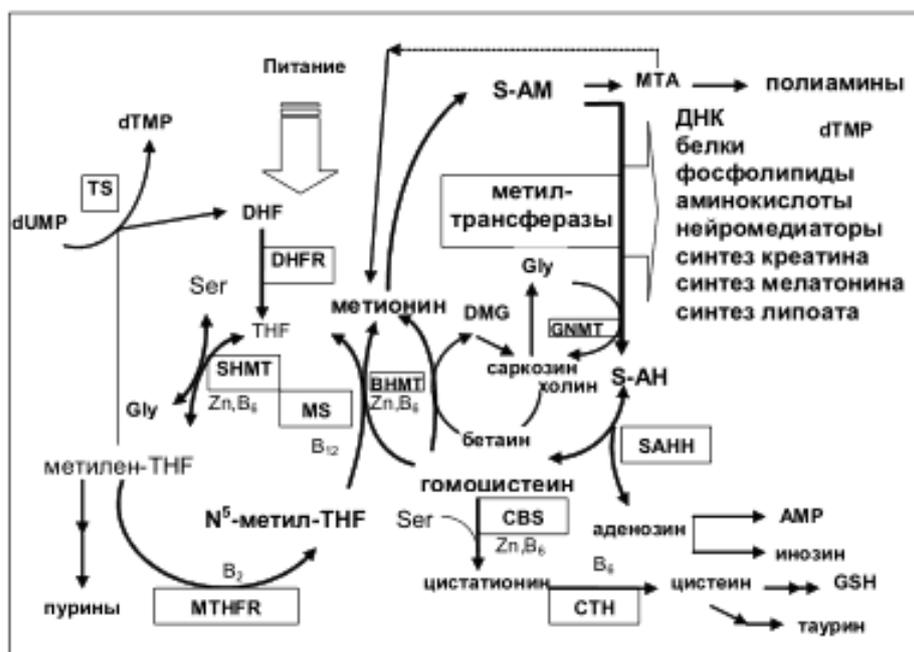
Сейчас хорошо изучены практически все метаболические реакции обмена серосодержащей аминокислоты - метионина (Met), основного донора метильных групп в организме человека и животных - S-аденозилметионина (SAM) и его катаболита – гомоцистеина (ГЦ). Во всех этих процессах ключевую роль играют незаменимые факторы питания - витамины (фолаты,

кобаламин, пиридоксин, рибофлавин, токоферолы, ретиноиды) и микроэлементы.

Гомоцистеин метаболизируется двумя путями: реметилирования, которое происходит в присутствии кофакторов ферментов цианокобаламина (витамин В12) и фолиевой кислоты и при переносе сульфатной группы, которое происходит в присутствии пиридоксина (витамин В6) и фолиевой кислоты. [MacMahon *et al.*, 2000]. При реакции метионина с АТФ (катализатором является фермент *метионин аденозилтрансфераза*) образуется S-аденозилметионин (SAM). Это взаимодействие наблюдается практически во всех тканях организма. S-аденозилметионин - универсальный донор метильных групп в реакциях метилирования, которые осуществляются различными метилтрансферазами [McQuillan *et al.*, 1999]. Известно приблизительно 100 реакций, которые сопровождаются переносом метильной группы на протеины, нуклеиновые кислоты и липиды. [Rid *et al.*, 2002]. К примеру, метилирование ДНК - важный регуляторный механизм экспрессии генов, основа эпигенеза. Гипометилирование ДНК повышает риск возникновения мутации и приводит к нестабильности хромосом [Нак *et al.*, 2001]. В результате переноса S-аденозилгомоцистеин гидроксилазой (SAHH) метильной группы образуется S-аденозилгомоцистеин (S-AH), являющийся ингибитором метилтрансферазных реакций (исключение составляет лишь глицин N- метилтрансфераза (GNMT), и поэтому необходимо, чтобы он быстро метаболизировался. Этот процесс происходит при помощи соответствующей гидролазы и приводит к образованию гомоцистеина. Гомоцистеин далее либо вовлекается в биосинтез цистеина (транссульфурирование), либо превращается в метионин за счет присоединения метильной группы [Скворцов *с соавт.*, 2011]. Источниками метильной группы в последней реакции могут служить метилентетрагидрофолат или бетаин. Излишек гомоцистеина элиминируется из клетки и появляется в плазме крови, где он связывается с белками (75%)

или образует гомоцистин, т.е. находится в окисленном состоянии. На долю восстановленного гомоцистеина приходится всего лишь 1%.





Роль метионина в одноуглеродном обмене.

AMP – аденозинмонофосфат; **BHMT** – бетаин-гомоцистеин метилтрансфераза; **CBS** – цистатионин- β -синтаза; **CTH** – цистатионин γ -лиаза; **DHF** – дигидрофолат; **DHFR** – дигидрофолат редуктаза; **dUMP** – дезоксиуридинмонофосфат; **dTMP** – дезокситимидинмонофосфат; **GNMT** – глицин N-метилтрансфераза; **Gly** – глицин; **GSH** – глутатион; **DMG** – диметилглицин; **MTHFR** – метилен-тетрагидрофолат редуктаза; **MTA** – метилтиоаденозин; **MS** – метионин синтаза; **S-AM** – S-аденозилметионин; **S-AH** – S-аденозилгомоцистеин; **SAHH** – S-аденозилгомоцистеин гидроксилаза; **Ser** – серин; **SHMT** – серин гидрокси метилтрансфераза; **TS** тимидин синтаза; **THF** – тетрагидрофолат; **B₂** – витамин B₂ (рибофлавин); **B₆** – пиридоксальфосфат

Рисунок 2 - Биосинтез гомоцистеина.

Ген метионин-синтазы (MTR) является одним из генов обмена гомоцистеина в организме и имеет довольно сложную молекулярную организацию. Он состоит из 33 экзонов, которые содержат большое количество мутаций, нарушающих обмен ГЦ в организме. Наиболее известной является мутация с заменой цитозина на тимидин в 1173-м кодоне. В результате в структуре белка происходит замена пролина на лейцин

(P1173L). Данная мутация обусловлена ферментативным дефицитом и нарушением реметилирования ГЦ, что приводит к повышению его концентрации в крови. Это, в конечном счете, ведет к повышению риска возникновения сердечных и сосудистых заболеваний за счет развития коагулопатии [Rozen, 2001].

Существуют два основных механизма регуляции уровня гомоцистеина в крови — реметилирование до метионина, которое протекает двумя путями: фолатзависимый (гомоцистеин преобразуется обратно в метионин при наличии высокой концентрацией фолиевой кислоты за счет ее перевода в активную форму 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктазой (MTHFR), бетаиновый (за счет реметилирования гомоцистеина в метионин, где донором метильных групп является триметилглицин), и транссульфирование до цистеина. Фолатзависимый путь протекает во всех тканях организма, бетаиновый – преимущественно в почках [Bostom *et al.*, 1997; Buccianti *et al.*, 2002; Van Guldener *et al.*, 2001]. Также было проведено исследование, показывающее, что при двухнедельном внутрибрюшинном ведении гомоцистеина наблюдалось снижение его концентрации в крови, в то время как содержание цистеина, глутатиона и цистеинглицина возрастало. Это можно объяснить следующим образом: эффект снижения концентрации гомоцистеина при одновременном возрастании общего цистеина обусловлен работой цистатион-β-синтазного пути, основная активность которого наблюдается в печени. Образовавшийся при этом цистеин находится преимущественно в окисленном состоянии, связываясь с белками, образуя цистин и смешанные дисульфиды. Цистин транспортируется в клетки посредством Xc-системы [Lu, 1999], при этом обмениваясь на глутамат, который также необходим для синтеза глутатиона [Bannai, 1986]. Эти механизмы отражают дозозависимые процессы адаптации организма к условиям гипергомоцистеинемии, замечающиеся в способности к усиленному метаболизму гомоцистеина, сохраняя низкий, но

коррелирующий со степенью и длительностью гипергомоцистеинемии, уровень глутатиона [Иванов *с соавт.*, 2013].

1.3 Гипергомоцистеинемия

В 1932 г. De Vigneaud открыл деметилированную аминокислоту метионина – гомоцистеин. В конце 1960-тых годов доктором Kilmer McCully была обнаружена связь между гомоцистеином и различными заболеваниями кровеносных сосудов, а в 1962 году была открыта гомоцистеинурия (повышенная концентрация гомоцистеина в моче), которая связана с нехваткой фермента цистатионин синтазы. При этом заболевании возникает умственная отсталость, смещение хрусталика, деформация костей и прогрессирующие сердечно - сосудистые заболевания [Скворцов *с соавт.*, 2011]. Врач Kilmer McCully изучал людей с высокой концентрацией гомоцистеина в крови и обнаружил связь между развитием тяжелых сосудистых заболеваний и гипергомоцистеинемией. В дальнейшем, это открытие послужило основой гомоцистеиновой теории атеросклероза, предложенная им же в 1975г. Kilmer McCully был убежден, что существует связь между повышенными дозами гомоцистеина в организме, авитаминозом и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Исследования недавних лет подтвердили и расширили гомоцистеиновую теорию развития сердечно-сосудистых нарушений.

Уровень гомоцистеина в плазме крови повышается с возрастом [Van Beijnum, 2005], имеет циркадные ритмы и зависит от качества и количества принимаемой пищи [Lavie, 2004]. Содержание гомоцистеина в крови взрослого здорового человека составляет 5–15 мкм/л. Значения доверительного интервала ($p \geq 95\%$) уровня гомоцистеина: до 30 лет — от 4.6 до 8.1 мкм/л, старше 60 лет — от 5.8 до 11.9 мкм/л, женщины 30–59 лет — от 4.5 до 7.9 мкм/л, мужчины 30–59 лет — от 6.3 до 11.2 мкм/л [Kidney, 2002]. У взрослого человека гипергомоцистеинемию диагностируют при концентрации гомоцистеина в крови более чем 15 мкм/л. Повышение

содержания гомоцистеина более 15 мкмоль/л трактуется как умеренная (16-30 мкмоль/л), средняя (31-100 мкмоль/л) и тяжелая или выраженная (более 100 мкмоль/л) гипергомоцистеинемия [Kang, 1986]. Встречаемость гомоцистеинемии в общей популяции составляет около 5%. В ряде случаев при допустимом уровне гомоцистеина может быть скрытое нарушение его метаболизма, которое выявляют с помощью нагрузочной пробы метионином.

Гомоцистеинемия – это заболевание, связанное с повышенным содержанием гомоцистеина (более 15 мкм/л) в плазме крови.

Гипергомоцистеинемия может наблюдаться при:

- 1) повышенной скорости образования ГЦ;
- 2) нарушении реакций транссульфурирования;
- 3) снижении скорости преобразования гомоцистеина в метионин; здесь огромную роль играет обеспеченность витаминами (B2, B6, B9, B12) и микроэлементами (Zn) (доказано, что ГГЦ в 75% случаев обусловлена неадекватным поступлением в организм именно этих веществ) [Selhub, 1993];

- 4) использовании противосудорожных препаратов;

- 5) введении антагониста фолата – метатрексата;

- 6) полиморфизме гена MTHFR: замена цитидина в 677 положении на тимидин (C677 → T), которая приводит к встраиванию аланина вместо валина в полипептидной цепи и появлению термолабильных свойств фермента со снижением его активности на 50% (частота этой мутации колеблется в разных регионах и среди разных этнических групп, в среднем у европейцев составляя 10-20%) [Medina *et al.*, 2001; Van der Put, 2001] или замена аденина на цитозин в положении 1298 (A1298C), что также сопровождается снижением ферментативной активности [Pigott, 2011].

- 7) рационе с повышенным содержанием метионина.

- 8) сопутствующие заболевания, в первую очередь витаминдефицитные состояния и почечная недостаточность. Заболевания щитовидной железы, сахарный диабет, псориаз и лейкозы могут способствовать значительному росту уровня гомоцистеина в крови. Это

происходит не только за счет уменьшения содержания витамина В6, но также вследствие снижения активности печеночных ферментов, участвующих в процессах обмена гомоцистеина.

Ведущими токсическими факторами при повышении уровня гомоцистеина являются:

- оксидантный стресс. Гомоцистеин подавляет транскрипцию, трансляцию и ферментативную активность основных ферментов антиоксидантов - супероксид дисмутазы (SOD) и глутатион пероксидазы (GPx) [Наумов, 2007], значительно снижает экспрессию и секрецию внеклеточной супероксид дисмутазы - основной SOD сосудистой стенки [Nonaka, 2001];

- стресс эндоплазматической сети. Процесс связан с нарушением созревания и накоплением в эндоплазматической сети вновь синтезированных белков. Это вызывает активацию специфических генов и приводит либо к разрешению СЭС, либо, в случае длительного, хронического воздействия гипергомоцистеинемии - к апоптозу/некрозу клетки и активации воспалительного ответа [Наумов, 2007]. Последние исследования показали, что вероятной причиной ER стресса, вызванного гомоцистеином, является накопление в клетке S-АН и ингибирование очень специфической метилтрансферазы - изопренилцистеин карбоксиметилтрансферазы (ICMT), которая регулирует встраивание и структурирование мембранных белков эндоплазматической сети;

- нарушения эпигенетической «партитуры» генома клеток. Установлено, что гомоцистеин влияет на регуляцию активности более ста генов, среди которых есть выполняющие провоспалительные и проапоптозные функции [Sharma, 2006].

Основным потребителем S-AM в организме человека является гуанидиноацетат N-метилтрансфераза (GAMT), катализирующая последний этап превращения гуанидиноацетата в креатин [Carducci, 2002]. Эта реакция в организме человека составляет примерно 75% общего количества

гомоцистеина. Редкая врождённая патология, связанная с дефектом фермента, проявляется тремя формами заболевания:

- тяжёлая форма включает трудноизлечимую эпилепсию, экстрапирамидальные двигательные расстройства и общее нарушение развития;
- промежуточная форма характеризуется различным уровнем задержки развития, нарушением речи, аутизмом и эпилептическими припадками с минимальными изменениями на ЭЭГ;
- при лёгкой форме встречаются нарушения умственного развития и речи, наблюдается аутическое поведение [Наумов, 2007];

Хорошо известно, что нервная система весьма чувствительна к изменениям процессов метилирования. Например, пищевая недостаточность фолата (витамина В9) и кобаламина (витамина В12), приводящие к истощению уровня S-AM, служит причиной демиелинизации [Kim, 2003], а при рассеянном склерозе нарушение процессов метилирования занимает ведущее место в патогенезе болезни [Kim, 2003].

ГГЦ является также независимым предиктором развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений. Получены доказательства, что ГГЦ ассоциируется с инсультом:

Мета-анализ показал наличие достоверной положительной связи между уровнем гомоцистеина в плазме крови и инсультом во всех возрастных группах, независимой от курения, уровня холестерина и артериальной гипертензии (АГ). К тому же концентрация общего гомоцистеина является сильным независимым предиктором как впервые развившегося, так и повторного инсульта [Mizrahi *et al.*, 2003]. ГГЦ при сочетании с другими ФР, такими как курение или АГ, усиливает действие последних [Хубутия *с соавт.*, 2004]. Известно, что ГГЦ способствует нарушению когнитивных функций [Herrmann, 2006; West *et al.*, 2011] .

ГГЦ также связана с развитием хронической церебральной недостаточности [Хубутия *с соавт.*, 2004].

Установлена связь между повышением артериального давления (АД), особенно систолического, и уровнем гомоцистеина в плазме крови [Stehouwer et al., 2003; Van Guldener *et al.*, 2003]. Получены данные о повышении концентрации гомоцистеина у пациентов с АГ в сравнении с контрольной группой лиц с нормальным АД [Modi *et al.*, 2005]. Повреждение почек у больных АГ является дополнительным фактором, приводящим к ГЦ [Van Guldener *et al.*, 2003].

Повышенные дозы ГЦ приводят также к угнетению синтеза тромбомодулина - эндотелиального мембранного белка, без которого процесс активации тромбином антикоагулянтов (протеинов С и S) нарушен, в норме ингибирующая активность факторов Va и Villa. Одновременно V фактор свертывания крови становится нечувствительным к действию протеина С. Указанные процессы приводят к дополнительному повышению коагуляционных свойств крови.

1.4 Влияние гомоцистеинемии на развитие плода

Также в настоящее время интенсивно изучается связь между гипергомоцистеинемией и возникновением пороков развития плода. Показано, что женщины с невынашиванием на 35 неделе беременности (среди которых -большой процент женщин с полиморфизмом MTHFR677TT – 24%) имеют значимо более высокий уровень ГЦ, чем остальные [Holmes *et al.*, 2005]. ГЦ способен беспрепятственно проникать через плаценту и токсически влиять на плод. Нарушения микроциркуляции и образование микротромбов приводят к ряду осложнений протекания беременности. Нарушение фетоплацентарного кровообращения и плацентации могут привести к репродуктивной недостаточности: бесплодия и невынашивания беременности в результате дефектов имплантации зародыша [Kupfermine *et al.*, 1998]. Показано, что гипергомоцистеинемия на ранних стадиях беременности является одной из причин незаращения костномозгового

канала и анэнцефалии [Van der Molen *et al.*, 2000]. Анэнцефалия приводит к стопроцентной летальности, а незаращение костномозгового канала — к развитию серьезных неврологических проблем у ребенка - моторный паралич, пожизненная инвалидность и преждевременная смерть. На более поздних стадиях беременности ГГЦ является одной из причин развития хронической фетоплацентарной недостаточности и хронической внутриутробной гипоксии плода. Это приводит к рождению детей пониженной массой тела и снижению функциональных резервов всех жизнеобеспечивающих систем новорожденного, а также развитию ряда осложнений новорожденного [Vollset, 2000]. Была доказана способность фолатов оказывать протективный эффект в отношении возникновения пороков нервной трубки [Van der Put, 2001].