

ДИНАМИКА БИОХИМИЧЕСКИХ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛИМЕНТАРНОЙ МЕТИОНИН-ОБУСЛОВЛЕННОЙ ГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова*, М.В. Сметанина, О.А. Пазиненко, К.Э. Пантелеев, Г.В. Иванов, Н.В. Кормилина

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России
426056, Российская Федерация, Ижевск, ул. Коммунаров, 281

В условиях хронической нагрузки метионином (ежедневное добавление аминокислоты в пищу (0,15 г/100 г) и воду (1% р-р)) в течение 2–12 недель наблюдали динамику показателей печеночных тестов (аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, билирубина), воспалительных изменений в крови, липидного спектра. Установлено, что метиониновая нагрузка (МН) с 4-й недели приводит к умеренной гипергомоцистеинемии ($28,9 \pm 2,65$ против $8,5 \pm 0,6$ мкмоль/л в контроле), повышению ферментов печени (АсАТ — в 1,73, АлАТ — 1,5 раза, $p < 0,05$) и билирубина (на 62,25%), что указывает на сформированную гепатопатию, которая в дальнейшем (12 недель МН) усугубляется нарушением экскреторной функции печени и холестазом (увеличение щелочной фосфатазы в 1,65, билирубина — в 3,31 раза, $p < 0,05$). Воспалительные изменения в крови нарастают постепенно, начиная с 4-х недель введения препарата, с резким увеличением количества лейкоцитов (в 1,72 раза) и моноцитов (в 5,38 раза) к 12-й неделе МН ($p < 0,05$). Значимые изменения показателей липидного спектра у экспериментальных животных отмечаются к 12-й неделе, что сопровождается повышением индекса атерогенности в 1,49 раза ($p < 0,05$).

Ключевые слова: метиониновая нагрузка, гепатопатия, гипергомоцистеинемия, печеночные тесты, липидный спектр, моноцитоз

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Пазиненко К.А., Чучкова Н.Н., Сметанина М.В., Пазиненко О.А., Пантелеев К.Э., Иванов Г.В., Кормилина Н.В. Динамика биохимических и цитологических показателей крови крыс при моделировании хронической алиментарной метионин-обусловленной гоомоцистеинемии. *Биомедицина*. 2021;17(2): 46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-46-57>

Поступила 14.07.2020

Принята после доработки 03.02.2021

Опубликована 10.06.2021

DYNAMICS OF BIOCHEMICAL AND CYTOLOGICAL PARAMETERS OF RAT BLOOD IN SIMULATED CHRONIC ALIMENTARY METHIONINE-INDUCED HOMOCYSTEINEMIA

Kseniya A. Pazinenko, Natalya N. Chuchkova*, Marina V. Smetanina, Oleg A. Pazinenko, Kirill E. Panteleev, Grigory V. Ivanov, Natalya V. Kormilina

Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia
426056, Russian Federation, Izhevsk, Kommunarov Str., 281

Under the conditions of a chronic methionine diet (daily addition of amino acids to food (0.15 g/100 g) and water (1% solution)) during 2–12 weeks, the dynamics of liver tests, inflammatory changes in the blood

and blood lipids was monitored. It was found that a methionine diet (MD) leads, starting from 4 weeks of MD, to medium hyperhomocysteinemia, an increase in liver enzymes (AsAT – 1.73, AlAT – 1.5 times, $p < 0.05$) and bilirubin (by 62.25%), which indicates the formed hepatopathy. Further (12 weeks of MD), the condition is aggravated by an abnormality of excretory liver function and the development of cholestasis (an increase in alkaline phosphatase by 1.65, bilirubin – by 3.31 times, $p < 0.05$). Inflammatory changes in the blood increase gradually, starting from 4 weeks of drug administration, with a fast growth of the number of white blood cells (1.72 times) and monocytes (5.38 times) by the 12th week of MD ($p < 0.05$). Changes in the blood lipids in experimental animals were noted by the 12th week, which was accompanied by an increase in the atherogenicity index by 1.49 times ($p < 0.05$).

Key words: methionine diet, hepatopathy, hyperhomocysteinemia, liver tests, blood lipids, monocytosis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Pazinenko K.A., Chuchkova N.N., Smetanina M.V., Pazinenko O.A., Panteleev K.E., Ivanov G.V., Kormilina N.V. Dynamics of Biochemical and Cytological Parameters of Rat Blood in Simulated Chronic Alimentary Methionine-Induced Homocysteinemia. *Journal Biomed.* 2021;17(2):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-46-57>

Submitted 14.07.2020

Revised 03.02.2021

Published 10.06.2021

Введение

Основной причиной значительного повышения уровня гомоцистеина в крови является генетически обусловленная дисфункция ферментов и кофакторов, связанных с процессом биосинтеза гомоцистеина [7, 19, 23]. Повышение гомоцистеина может быть связано также с нарушением диеты, связанной с излишним потреблением продуктов, богатых метионином (сыр, орехи, мясо, яйца, соя) [15], дефицитом фолатов, витамина B12 и, в меньшей степени, дефицитом витамина B6, что влияет на метаболизм метионина [11, 27, 32]. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) может сопровождать прием препаратов метионина, например, в бодибилдинге [24], где метионин является одной из самых важных аминокислот для набора мышечной массы [22, 31]. В таких случаях уровень гомоцистеина в крови редко достигает чрезмерно высоких показателей. В целом, легкая (до 15 мкмоль/л) и умеренная форма (15–30 мкмоль/л) ГГЦ встречается у 5–10% населения [23], которая считается базой для возникновения сосудистой патологии и связанных с ней заболеваний [19]. Однако эффекты гипергомоцистеинемии разнообразны, они проявляются на всех

уровнях организации организма, формируя как органную, так и системную патологию.

Уровень гомоцистеина регулируется как метиониновым, так и фолатным циклами, в связи с чем гипергомоцистеинемия может быть спровоцирована у животных как генетическими, так и диетическими манипуляциями. Поскольку гомоцистеин образуется в цитоплазме как промежуточный метаболит метионинового цикла, ГГЦ возможно вызвать созданием метаболической напряженности цикла метионина, например, путем добавления избыточного количества метионина в рацион [12].

В экспериментах на животных (в основном, это мыши, ребе — крысы, мини-пиги, утки и др.), гипергомоцистеинемия воспроизводится различными способами, используя в зависимости от цели эксперимента адекватные методологические подходы, основанные на метаболизме метионина. Так, инъекции метионина либо гомоцистеина (фармакологический подход) [5, 9, 15], внутрижелудочное введение суспензии метионина [2, 3] приводят к тяжелой форме ГГЦ. В экспериментах на мышах показано, что умеренная гипергомоцистеинемия может быть достиг-

нута путем увеличения общего содержания метионина до 12–20 г/кг в пище [16] или воде [21]. Большинство исследований использовали протоколы кормления *ad libitum*, но некоторые использовали сравнительное парное кормление [25]. В работе [25] показано, что у мышей, получавших диету, богатую метионином, наблюдалась значительная атероматозная патология в дуге аорты даже при нормальном уровне гомоцистеина в плазме, что позволило авторам предполагать, что в основе ассоциации гомоцистеина с сосудистыми заболеваниями могут лежать продукты избыточного метаболизма метионина, а не высокий уровень гомоцистеина плазмы как такового.

Учитывая распространенность умеренной формы ГГЦ, не связанной с наследственно обусловленной патологией, мы опробовали модель формирования гипергомоцистеинемии хроническим добавлением метионина непосредственно в рацион лабораторным животным, используя различную длительность введения и анализируя эффекты, возникающие в процессе применения «метиониновой диеты».

Цель работы — формирование устойчивой гипергомоцистеинемии у экспериментальных животных пищевой нагрузкой метионином и выбор оптимальной длительности потребления метионина для изучения различных эффектов ГГЦ.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 62-х белых крысах *Rattus norvegicus* Berk обоего пола, содержащихся в виварии ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России, в осенне-зимний период (октябрь–декабрь). Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом СП 2.2.1.321814 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических

клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51.

Масса животных к началу эксперимента составляла 220 ± 20 г. Крысы находились в одинаковых условиях содержания (температура воздуха 18–22°C, относительная влажность 70%, при естественно-искусственном освещении), в клетках размером 0,6×0,4×0,5 м по 5 особей, подстилкой служили древесные опилки. Все животные получали экструдированный корм ПК-120 ГОСТ Р 51849–2001 Р.5, со свободным доступом к воде в стандартных поилках.

С целью беспрепятственного проведения экспериментальных манипуляций и исключения формирования зоостресса крыс в течение 2-х недель приручали к рукам (процедура хэндлинга [10]), затем ежедневно индивидуально каждому животному скармливали шарики из сырого свиного мясного фарша массой $15,0 \pm 0,5$ г. У контрольных животных прикорм не содержал добавок, у крыс экспериментальной группы с целью формирования гипергомоцистеинемии в фарш добавляли пищевой метионин (кормовая добавка DL-метионин 99%, Бельгия) из расчета 0,15 г/100 г, одновременно они получали 1% р-ра метионина в воде *ad libitum* в качестве питья. Выбор дозы определили данные литературы [2, 3, 16], а также предварительная самостоятельная отработка экспериментальных доз препарата. Ежедневно осуществлялось взвешивание крыс с целью корректировки дозы вводимого метионина. Распределение количества животных в группах составило: контрольная группа — 20 крыс (4 животных на момент начала эксперимента, по 4 крысы на каждую временную точку в 2, 4, 8, 12 недель эксперимента); экспериментальная группа — 42 особи: 2 недели — 10 животных, 4 недели — 12 животных, 8 недель — 10 животных, 12 недель — 10 животных.

По истечении 2, 4, 8, 12 недель метиониновой нагрузки у экспериментальных

животных и контрольных крыс под эфирным наркозом транскардиальной пункцией забирали кровь для исследования на содержание гомоцистеина, который определяли иммуноферментным методом с использованием тест-системы AxisShield (Великобритания); маркерных ферментов печени (АсАТ, АлАТ, щелочную фосфатазу, билирубин). В биохимическом анализе оценивали липидный спектр: триглицериды, общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), рассчитывали индекс атерогенности по формуле: $\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП} / \text{ХС ЛПНП}$; общий белок крови. В клиническом анализе крови оценивали гематологические показатели белой крови (абсолютное содержание лейкоцитов, относительное (в %) количество лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов). Исследование проводили с использованием Olympus AU-480, System XS-500i и Alifax Roller 10 Plus. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России. В подготовке эксперимента учитывались требования к моделированию субхронической токсичности [1], забой и взятие материала осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза № 724 от 13.11.1984 г.) и Межгосударственного стандарта «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (2016).

В работе использовался статистический метод с применением программ «Statistica 10.0» с определением средней арифметической (M), ее ошибки (m). Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Shapiro—Wilk's. Сравнения двух групп из совокупностей анализировали с помо-

щью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с использованием программного обеспечения SPSS. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Метиониновая нагрузка (МН) в течение 2-х недель не вызывает значимого изменения гомоцистеина в крови (данные контрольных крыс составляют $8,5 \pm 0,6$, у экспериментальных животных — $8,9 \pm 0,8$ мкмоль/л). Уровень гомоцистеина к 4-м неделям введения метионина превышает контрольные показатели в 3,4 раза, а через 8–12 недель — в 3,55 раза ($p < 0,05$). Динамика изменений уровня гомоцистеина в крови представлена на рисунке.

Динамика печеночных тестов у животных в процессе эксперимента представлена в табл. 1.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил основной эффект метиониновой нагрузки на показатели: АлАТ ($F(3,79) = 38,876$, $p < 0,001$), АсАТ ($F(3,79) = 15,277$, $p < 0,001$), щелочная фосфатаза ($F(3,79) = 10,047$, $p < 0,001$), билирубин ($F(3,79) = 11,137$, $p < 0,0001$), что отражается в статистически значимом повышении указанных показателей у животных, получавших метионин, по сравнению с контролем.

Через 2 недели метиониновой нагрузки значимо в крови в 1,73 раза повышается только уровень АсАТ. Причем для этого показателя выраженно увеличивается разброс данных (интервальные значения между минимальным и максимальным показателями данных). Введение метионина в течение 1-го мес. приводит к повышению также и аланиновой аминотрансферазы в 1,5 раза. К этому же времени увеличивается билирубин (в 1,62 раза). К 8-й неделе метиониновой нагрузки уровни печеночных ферментов являются наиболее значимыми: АлАТ выше контрольных значений в 2,5 раза, АсАТ — в 5,2 раза, билирубин — в 3,9 раза.

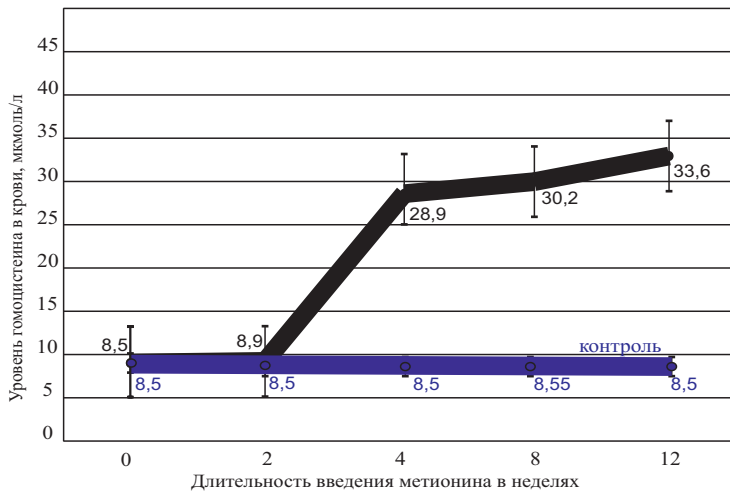


Рис. Динамика уровня гомоцистеина в крови экспериментальных животных при нагрузке метионином.
Fig. Changes in the level of homocysteine in the blood of experimental animals under a methionine diet.

Таблица 1. Динамика уровней маркерных ферментов печени и билирубина в процессе эксперимента
Table 1. Changes in the levels of liver enzymes and bilirubin during the experiment

Показатель	Единицы измерения	Интервальные значения	Среднее (М)	Ошибка среднего (m)
<i>Контрольные показатели</i>				
АлАТ	ед/л	36–82	43,56	4,88
АсАТ	ед/л	99,0–132,3	111,33	3,84
Билирубин общий	мг/дл	2,02–7,78	3,02	1,50
Щелочная фосфатаза	ед/л	162,8–259,8	238,0	15,64
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 2 недели</i>				
АлАТ	ед/л	23,0–73,9	47,2	6,37
АсАТ	ед/л	117,0–248,8	193,1*	28,15
Билирубин общий	мг/дл	1,0–5,3	3,14	0,95
Щелочная фосфатаза	ед/л	196,1–491,0	245,5	23,32
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 4 недели</i>				
АлАТ	ед/л	43,56–73,05	65,3*	7,70
АсАТ	ед/л	111,33–245,00	162,08*	29,17
Билирубин общий	мг/дл	1,10–6,99	4,9*	1,89
Щелочная фосфатаза	ед/л	69–418	229,5	20,56
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 8 недель</i>				
АлАТ	ед/л	85,4–150,6	109,4*	10,22
АсАТ	ед/л	120,3–850,4	582,7*	25,62
Билирубин общий	мг/дл	4,5–13,2	11,8*	2,31
Щелочная фосфатаза	ед/л	98,2–274,4	157,1*	22,61
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 12 недель</i>				
АлАТ	ед/л	107–144	124,32*	8,47
АсАТ	ед/л	107,0–807,6	361,15*	143,98
Билирубин общий	мг/дл	3,7–23,5	10,01*	3,97
Щелочная фосфатаза	ед/л	145–1366	393,67*	76,05

Примечание: * — различия достоверны в сравнении с показателями контроля при $p < 0,05$.

Note: * — differences are significant compared to the parameters of the control at $p < 0.05$.

К 12-й неделе МН уровень АсАТ и билирубина несколько снижается, оставаясь выше нормальных показателей, количество аланинаминотрансферазы продолжает увеличиваться. Маркером холестаза является уровень щелочной фосфатазы, наибольшее количество которой локализуется в эндотелии желчевыводящих путей. На 12-й неделе МН уровень ЩФ выше исходных значений в 1,65 раза ($p<0,05$). Нарушение экскреторной функции печени связано с показателем билирубина — его количество через 12 недель МН

превышает данные контроля в 3,31 раза ($p<0,05$). Одновременное повышение данных к 12-й неделе МН характеризует застой желчи, обусловленный нарушением функции клеток.

Таким образом, показатели печеночных проб (АлАТ, АсАТ, щелочная фосфатаза, билирубин) указывают на сформированную гепатопатию к 4-й неделе введения аминокислоты в рацион питания животных, которая к 12-й неделе МН дополняется нарушением экскреторной функции печени и развитием холестаза.

Таблица 2. Динамика показателей липидного спектра крови в процессе эксперимента
Table 2. Changes in blood lipids during the experiment

Показатель (ммоль/л)	Интервальные значения	Среднее (М)	Ошибка среднего (m)
<i>Контрольные показатели</i>			
Триглицериды	0,31–1,16	0,51	0,08
Общий холестерин	1,05–1,62	1,38	0,11
ХС ЛПВП	0,52–1,53	0,74	0,11
ХС ЛПНП	0,34–0,54	0,47	0,02
Индекс атерогенности	0,68–0,88	0,86	0,1
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 2 недели</i>			
Триглицериды	0,38–0,56	0,47	0,07
Общий холестерин	0,2–1,6	1,32	0,04
ХС ЛПВП	0,70–1,95	0,82	0,21
ХС ЛПНП	0,35–0,6	0,53	0,05
Индекс атерогенности	0,66–0,81	0,71	0,1
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 4 недели</i>			
Триглицериды	0,41–2,42	0,91*	0,17
Общий холестерин	1,1–2,1	1,51	0,13
ХС ЛПВП	0,66–0,80	0,83	0,16
ХС ЛПНП	0,36–0,68	0,52	0,14
Индекс атерогенности	0,68–0,90	0,87	0,05
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 8 недель</i>			
Триглицериды	0,22–1,13	0,58	0,12
Общий холестерин	0,86–2,69	1,89	0,62
ХС ЛПВП	0,24–1,29	0,99*	0,13
ХС ЛПНП	0,25–0,88	0,55*	0,09
Индекс атерогенности	0,72–0,94	0,90	0,05
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 12 недель</i>			
Триглицериды	0,21–1,20	0,68	0,12
Общий холестерин	1,32–1,83	1,64	0,09
ХС ЛПВП	0,51–1,34	0,72	0,11
ХС ЛПНП	0,21–0,50	0,31*	0,06
Индекс атерогенности	0,89–1,53	1,28*	0,09

Примечание: * — различия достоверны в сравнении с показателями контроля при $p<0,05$.

Note: * — differences are significant compared to the parameters of the control at $p<0,05$.

При холестатическом синдроме может повышаться уровень липидов (холестерина, триглицеридов, липопротеинов), динамика которых в процессе эксперимента представлена в табл. 2.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил основной эффект метиониновой нагрузки на показатель ЛПНП ($F(3,55)=2,958, p<0,05$).

При метиониновой нагрузке, продолжающейся 2–4 недели, в показателях липидного обмена значительных изменений не происходит, выявляется лишь тенденция к повышению уровней данных липидного спектра крови. Так, в сравнении с контролем на 12,76% и 10,64% повышаются ЛПНП (2-я и 4-я неделя МН), на 8,7% — общий холестерин (4-я неделя МН). Через 1 мес. в крови в 1,78 раза повышены триглицериды. Рассчитываемый на основе показателей атерогенный индекс не изменяется к этому времени ($0,87\pm0,05$ при МН в течение 4-х недель против $0,86\pm0,1$ у контрольных животных). Возможно, это связано с незначительным компенсаторным повышением уровня ЛПВП (на 12,16%). Практически для всех показателей (за исключением ЛПНП) на этих сроках МН повышается как верхняя, так и нижняя граница данных, при этом разбросы между максимальным и минимальным значениями менее выражены, чем у контрольных животных. Значимые (при $p<0,05$) повышения показателей липидного спектра отмечаются в 8 недель МН: общий холестерин повышается в 1,37 раза, ЛПНП — в 1,2 раза, липопротеины высокой плотности — в 1,34 раза. Увеличение длительности введения метионина до 12-ти недель сопровождается нарастающим дисбалансом в составе липидного обмена, что приводит к повышению атерогенного индекса в 1,49 раза ($1,28\pm0,09$). Дисбаланс проявляется и в изменении интервального диапазона: у ряда животных нижняя граница показателей оказывается меньше, чем в контрольной группе.

Таким образом, незначительные изменения показателей липидного спектра у экспериментальных животных отмечаются к 8-й неделе МН, увеличиваются далее к 12-й неделе, что приводит к повышению индекса атерогенности. Двухфакторный анализ выявил значимое повышение в крови экспериментальных животных атерогенной фракции липидов (ХС ЛПНП).

Мы проследили изменение воспалительных явлений в крови, основываясь на динамике цитологических показателей в процессе эксперимента (табл. 3).

Изменения в составе белой крови появляются через 4 недели МН. Значимо ($p<0,05$) по сравнению с контрольными животными на этом сроке эксперимента увеличивается абсолютное количество лейкоцитов (на 27,43%), гранулоцитов (на 37,73%), моноцитов (в 3,05 раза). Повышены как минимальные, так и максимальные показатели. Отмечается некоторое снижение абсолютного содержания лимфоцитов — они составляют 80,78% от контрольных значений ($p<0,1$), укладываясь, тем не менее, в референсные значения. К 8-й неделе МН их количество выравнивается, оказываясь сравнимо с данными интактного контроля. У экспериментальных крыс к 8-й неделе потребления метионина с пищей остаются повышенными количество лейкоцитов и моноцитов, незначительно отличаясь от предыдущего этапа наблюдения. В дальнейшем (12 недель введения метионина) эти показатели снова повышаются: абсолютное количество лейкоцитов достоверно ($p<0,05$) превышает норму в 1,72 раза, лимфоцитов — в 1,31 раза, моноцитов — в 5,38 раза. Количество гранулоцитов выше контрольных значений на 20,32%, но не выходит за пределы референсных значений.

На 4-й неделе МН обнаруживается тенденция к повышению общего белка крови ($64,82\pm2,52$ против $77,90\pm2,19$ г/л), превышение показателя составляет 20,18%. В дальнейшем его количество возвраща-

Таблица 3. Динамика цитологических показателей крови в процессе эксперимента

Table 3. Changes in the cytological parameters of blood during the experiment

Показатели (10 ⁹ /л)	Интервальные значения	Среднее (М)	Ошибка среднего (m)
<i>Контрольные показатели</i>			
Лейкоциты	2,2–18,3	10,79	2,24
Гранулоциты	2,15–4,62	3,79	0,42
Лимфоциты	3,75–7,21	6,51	0,90
Моноциты	0,54–1,26	0,63	0,23
Гранулоциты (%)	21,5–46,7	35,10	4,14
Лимфоциты (%)	37,5–72,1	59,39	5,65
Моноциты (%)	6,4–23,6	6,90	1,76
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 2 недели</i>			
Лейкоциты	8,2–12,8	9,80	2,12
Гранулоциты	1,5–3,2	2,72*	0,54
Лимфоциты	5,8–7,5	6,22	1,44
Моноциты	0,50–0,82	0,69	0,20
Гранулоциты (%)	15,5–32,2	27,74	3,21
Лимфоциты (%)	55,8–70,1	63,52	9,64
Моноциты (%)	5,2–8,4	7,01	1,56
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 4 недели</i>			
Лейкоциты	7,8–19,8	13,75*	1,76
Гранулоциты	3,5–7,2	5,22*	1,03
Лимфоциты	4,2–5,9	5,26	0,69
Моноциты	1,2–3,1	1,92*	0,24
Гранулоциты (%)	25,8–56,9	45,25	2,53
Лимфоциты (%)	30,2–42,5	38,23	1,86
Моноциты (%)	10,5–20,1	16,04	2,42
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 8 недель</i>			
Лейкоциты	7,9–21,1	13,10*	1,64
Гранулоциты	3,6–6,7	4,18	1,03
Лимфоциты	3,7–7,9	6,87	1,14
Моноциты	0,8–2,6	1,98*	0,17
Гранулоциты (%)	26,6–50,9	39,52	8,22
Лимфоциты (%)	28,8–68,8	50,88	5,64
Моноциты (%)	8,8–15,6	10,56	2,35
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 12 недель</i>			
Лейкоциты	10,8–26,3	18,60*	6,65
Гранулоциты	2,4–6,7	4,56	1,56
Лимфоциты	5,8–11,1	8,51*	1,14
Моноциты	2,5–8,9	3,39*	1,01
Гранулоциты (%)	13,0–36,3	29,86	8,44
Лимфоциты (%)	48,8–84,1	55,06	10,21
Моноциты (%)	5,0–30,9	18,23	8,46

Примечание: * — различия достоверны в сравнении с показателями контроля при $p < 0,05$.

Note: * — differences are significant compared to the parameters of the control at $p < 0,05$.

ется к норме. Значительное (в несколько раз) увеличение уровня общего белка связывают с острой фазой воспаления, тогда как хроническое воспаление не является поводом для его повышения и, хотя этот фактор и является чувствительным индикатором воспаления, но не обладает специфичностью [8, 14]. Можно предположить, что в нашем случае незначительное превышение показателя маркирует начало воспалительного процесса, который в дальнейшем переходит в хроническую фазу.

Обсуждение результатов

Гомоцистеин является промежуточным метаболитом в метиониновом цикле. Согласно полученным результатам, временной точкой отсчета, с которой начинается повышение гомоцистеина, является 1 мес. после введения в рацион питания повышенных доз аминокислоты. Метионин является незаменимой аминокислотой, основные метаболические превращения которой происходят в печени (около 50% всего пищевого метионина). В ряде экспериментов по выявлению «доза—эффект» было показано, что пищевая нагрузка метионином повышает уровень ферментов печени, угнетает рост животных [28, 29, 30]. У человека модуляция количества метионина в рационе приводит к изменениям обмена веществ, нарушению метилирования гистоновых белков в клетках печени [20]. Нами отмечено, что за 4 недели избыток метионина в пище и воде инициирует развитие гепатопатии, которая приводит к нарастанию печеночных ферментов (особенно аланинаминотрансферазы), указывающих на повреждение клеток. Повреждение гепатоцитов запускает воспалительную реакцию, в которой участвует врожденная иммунная система [18, 26]. Воспалительные изменения крови (лейко- и моноцитоз) неуклонно нарастают в течение всего времени наблюдений за животными, достигая максимальных значений к 12-й неделе МН.

Воспалительный процесс у крыс с МН подтверждается также при гистологическом исследовании ткани печени формированием лейкоцитарных инфильтратов вокруг сосудов и поврежденных гепатоцитов [6], изменением кровеносного микрососудистого русла печени [4]. К 12-й неделе после введения метионина в пищу в печени выявляется нарушение экскреторной функции, развивается холестаз, что усугубляет имеющуюся гепатопатию.

Умеренная гипергомоцистеинемия на 8-й неделе МН приводит к невыраженному дисбалансу в составе липидных фракций, значимому повышению ЛПНП (проатерогенных) через 12 недель МН. Вместе с повышением атерогенных фракций липидов, в это же время повышаются (менее значительно) и антиатерогенные ЛПВП. Известно, что у крыс липиды находятся преимущественно в форме ЛПВП, у них вырабатывается мурихоловая желчная кислота, отсутствующая у людей, которая препятствует, например, апоптозу гепатоцитов, регулирует синтез желчных кислот, способствует большей устойчивости к изменениям уровня сыровоточного холестерина [13, 17]. Тем не менее, стабильно повышенный уровень гомоцистеина в крови, углубление патологии печени, хроническое воспаление приводит к атеросклеротической настроенности организма, но не ранее, чем через 2 мес. после повышения уровня гомоцистеина в крови. Отмечаемый при этом в анализах крови моноцитоз является характерным для атеросклероза.

Заключение

Таким образом, последовательность анализируемых показателей и эффектов в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии, обусловленной избыточным поступлением метионина с пищей, следующая: 1) повышенный метионин первично нарушает функцию клеток печени, вызы-

вая гепатопатию, следствием которой является повышение гомоцистеина в крови; 2) повышение гомоцистеина усугубляет повреждение печени, приводит далее к холестазу; способствует формированию хро-

нического воспаления; 3) более поздним временным событием является дисбаланс в составе липидов крови, нарастание атерогенных фракций и повышения индекса атерогенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии. *Биомедицина*. 2006;4:1–23. [Karkischenko N.N. Klassicheskie i al'ternativny'e modeli v lekarstvennoy toksikologii [Classical and alternative models in drug toxicology]. *Biomeditsina [Journal Biomed.]*. 2006;4:1–23. (In Russian)].
2. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс. *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. 2014;22(4):42–46. [Medvedev D.V., Zvyagina V.I., Fomina M.A. Sposob modelirovaniya tyazhelej formy gipergomocisteinonii u krys [A method of modeling a severe form of hyperhomocysteinemia in rats]. *Rossiyskij mediko-biologicheskij vestnik im. akad. I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2014;22(4):42–46. (In Russian)].
3. Новгородская Я.И., Кравчук Р.И., Островская О.Б., Курбат М.Н. Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии. *Гепатология и гастроэнтерология*. 2019;3(1):93–98. [Novogrodskaya Ya.I., Kravchuk R.I., Ostrovskaya O.B., Kurbat M.N. Morfologicheskie izmeneniya v pecheni kry's pri gipergomocisteinonii [Morphological changes in the rat liver in hyperhomocysteinemia]. *Hepatology and gastroenterology*. 2019;3(1):93–98. (In Russian)].
4. Пантелеев К.Э., Пазиненко К.А., Пазиненко О.А. Метионин-индуцированная токсическая гепатопатия. *Университетская медицина Урала*. 2020;6(1):21–22. [Pantelev K.E., Pazinenko K.A., Pazinenko O.A. Metionin-inducirovannaya toksicheskaya gepatopatiya [Methionine-induced toxic hepatopathy]. *Universitetskaya medicina Urala [University medicine of the Urals]*. 2020;6(1):21–22. (In Russian)].
5. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Невротин А.И., Хохлов С.Е., Сиповский В.Г., Барабанова В.В., Чёфу С.Г., Жлоба А.А., Блашко Э.Л. Гипергомоцистеинемия усугубляет повреждения нефрона при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Нефрология*. 2005;9(4):67–74. [Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Nevrotin A.I., Khoklov S.E., Sipovskiy V.G., Barabanova V.V., Chifu S.G., Zhloba A.A., Blashko E'L. Gipergomocisteinemiya usugublyayet povrezhdeniya nefrona pri e'ksperimental'noj khronicheskoy pochechnoy nedostatochnosti [Hyperhomocysteinemia exacerbates damage to the nephron in experimental chronic kidney failure]. *Nephrology*. 2005;9(4):67–74. (In Russian)].
6. Тукмачева К.А., Сметанина М.В., Чучкова Н.Н. Сравнительная оценка действия таутомеров калия оротата на активность воспалительного процесса у крыс с гипергомоцистеинемией. *Мат-лы Всеросс. науч. конф. с межд. уч. «Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции»*, Рязань, 2019:96–98. [Tukmacheva K.A., Smetanina M.V., Chuchkova N.N. Sravnitel'naya ocenka dejstviya tautomerov kaliya orotata na aktivnost' vospalitel'nogo processa u kry's s gipergomocisteinonii [Comparative evaluation of the effect of potassium orotate tautomers on the activity of the inflammatory process in rats with hyperhomocysteinemia]. *Mat-ly Vseross. nauch. konf. s mezhd. uch. «Biologiya v vysshej shkole: aktual'nye voprosy nauki, obrazovaniya i mezhdisciplinarnoj integracii [Materials of the all-Russian scientific conference with international participation "Biology in higher education: current issues of science, education and interdisciplinary integration"]*. Ryazan', 2019:96–98. (In Russian)].
7. Baeza I., Vigo L., de la Serna E., Calvo-Escalona R., Merchán-Naranjo J., Rodríguez-Latorre P., Arango C., Castro-Fornieles J. The effects of antipsychotics on weight gain, weight-related hormones and homocysteine in children and adolescents: a 1-year follow-up study. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*. 2017;26(1):35–46.
8. Calkosiński I., Majda J., Terlecki G., Gostomska-Pampuch K., Małolepsza-Jarmołowska K., Sobolewska S., Calkosińska A., Kumala A., Gamian A. Dynamic Analysis of Changes of Protein Levels and Selected Biochemical Indices in Rat Serum in the Course of Experimental Pleurisy. *Inflammation*. 2016;39(3):1076–1089.
9. Chaouad B., Moudilou E.N., Ghoul A., Zerrouk F., Moulahoum A., Othmani-Mecif K., Cherif M.E.H., Exbrayat J.M., Benazzoug Y. Hyperhomocysteinemia and myocardial remodeling in the sand rat. *Psammomys obesus*. *Acta Histochem*. 2019;121(7):823–832.
10. Cloutier S., LaFollette M.R., Gaskill B.N., Panksepp J., Newberry R.C. Tickling, a technique for inducing positive affect when handling rats. *J. Vis. Exp*. 2018;(135):57190.
11. Czerwogrodzka-Senczyna A., Jerzak M., Jeznach-Steinhagen A., Karzel K., Boniecka I. Content of fatty acids in a diet and the homocysteine levels in wom-

- en with fertility disorders. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2018;39(1):56–64.
12. Dayal S., Lentz S.R. Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28(9):1596–1605.
 13. Denk G.U., Kleiss C.P., Wimmer R., Vennegeerts T., Reiter F.P., Schulz S., Zischka H., Rust C. Tauro- β -muricholic acid restricts bile acid-induced hepatocellular apoptosis by preserving the mitochondrial membrane potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;424(4):758–764.
 14. Germolec D.R., Shipkowski K.A., Frawley R.P., Evans E. Markers of inflammation. *Methods Mol. Biol.* 2018;1803:57–79.
 15. Han N., Chae J.W., Jeon J., Lee J., Back H.M., Song B., Kwon K.I., Kim S.K., Yun H.Y. Prediction of Methionine and Homocysteine levels in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats as a T2DM animal model after consumption of a Methionine-rich diet. *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2018;15:14.
 16. Hofmann M.A., Lalla E., Lu Y., Gleason M.R., Wolf B.M., Tanji N., Ferran L.J.Jr., Kohl B., Rao V., Kisiel W., Stern D.M., Schmidt A.M. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J. Clin. Invest.* 2001;107:675–683.
 17. Hu X., Bonde Y., Eggertsen G., Rudling M. Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism. *J. Intern. Med.* 2014;275(1):27–38.
 18. Ju C., Reilly T. Role of immune reactions in drug-induced liver injury (DILI). *Drug Metab. Rev.* 2012;44(1):107–115.
 19. Kim J., Kim H., Roh H., Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch. Pharm. Res.* 2018;41(4):372–383.
 20. Mentch S.J., Mehrohamadi M., Huang L., Liu X., Gupta D., Mattocks D., Gómez Padilla P., Ables G., Baman M.M., Thalacker-Mercer A.E., Nichenametla S.N., Locasale J.W. Histone methylation dynamics and gene regulation occur through the sensing of one-carbon metabolism. *Cell Metab.* 2015;22(5):861–873.
 21. Mudd S.H., Skovby F., Levy H.L., Pettigrew K.D., Wilcken B., Pyeritz R.E., Andria G., Boers G.H., Bromberg I.L., Cerone R. The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1985;37:1–31.
 22. Seyyedini S., Nazem M.N. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: an applied histologic study. *Folia Morphol. (Warsz.)*. 2017. doi: 10.5603/FM.a2017.0044. PMID: 28553855.
 23. Son P., Lewis L. Hyperhomocysteinemia. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publ., 2020. PMID: 32119295.
 24. Thevis M., Schänzer W. Emerging drugs affecting skeletal muscle function and mitochondrial biogenesis — Potential implications for sports drug testing programs. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2016;30(5):635–651.
 25. Troen A.M., Lutgens E., Smith D.E., Rosenberg I.H., Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:15089–15094.
 26. Tujos S., Fontana R.J. Mechanisms of drug-induced liver injury: From bedside to bench. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011;8(4):202–211.
 27. Vadakattu S.S., Ponday L.R., Nimmathota A., Nagalla B., Kondru D.S., Undrajavaram P., Banavath B.R., Kommula S.R., Punjal R., Palla S. Prevalence of Nutritional Anemia and Hyperhomocysteinemia in Urban Elderly. *Indian J. Clin. Biochem.* 2019;34(3):330–335.
 28. Woo C.W., Prathapasinghe G.A., Siow Y.L. Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1762(7):656–665.
 29. Xu H.M., Chen Y., Xu J., Zhou Q. Drug-Induced liver injury in hospitalized patients with notably elevated alanine aminotransferase. *World J. Gastroenterol.* 2012;18(41):5972–5978.
 30. Xue J.J., Xie M., Tang J., Huang W., Zhang Q., Hou S.S. Effects of excess DL- and L-Methionine on growth performance of starter Pekin ducks. *Poult. Sci.* 2018;97(3):946–950.
 31. Yang B., Ren X.-L., Zhang J., Yu Q. Effects of training on plasma content of nitric oxide, endothelin and NO/ET system in rats fed with high methionine diet. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2011;27(2):221–224.
 32. Zaric B.L., Obradovic M., Bajic V., Haidara M.A., Jovanovic M., Isenovic E.R. Homocysteine and hyperhomocysteinemia. *Curr. Med. Chem.* 2019;26(16):2948–2961.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Пазиненко Ксения Андреевна, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: k.pazinenko@yandex.ru

Чучкова Наталья Николаевна*, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: mig05@inbox.ru

Сметанина Марина Викторовна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: lisenok0910@rambler.ru

Пазиненко Олег Алексеевич, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: pazinenko.dima@yandex.ru

Пантелеев Кирилл Эдуардович, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: kirillpanteleev@mail.ru

Иванов Григорий Вадимович, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: grisha-igvz@mail.ru

Кормилина Наталья Владимировна, доц., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: nvkor1110@mail.ru

Kseniya A. Pazinenko, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: k.pazinenko@yandex.ru

Natalya N. Chuchkova*, Dr. Sci. (Med.), Prof., Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: mig05@inbox.ru

Marina V. Smetanina, Cand. Sci. (Med.), Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: lisenok0910@rambler.ru

Oleg A. Pazinenko, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: pazinenko.dima@yandex.ru

Kirill E. Panteleev, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: kirillpanteleev@mail.ru

Grigory V. Ivanov, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: grisha-igvz@mail.ru

Natalya V. Kormilina, Assoc. Prof., Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: nvkor1110@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author