

**БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В МОЗКУ ЩУРІВ З ІЗОЛЬОВАНОЮ  
ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ ЗА УМОВ МОДУЛЯЦІЇ ОБМІНУ  
ГІДРОГЕНСУЛЬФІДУ**

Досліджено вплив модуляторів обміну гідрогенсульфіду ( $H_2S$ ) – амінооксіацетату (інгібітора цистатіонін- $\beta$ -синтази) та NaHS на біохімічні показники мозку щурів з ізольованою гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ), індукованою введенням тіолактону гомоцистеїну (200 мг/кг 14 діб). Інгібування синтезу  $H_2S$  потенціює ГГЦ-індукований оксидативний стрес, енергодефіцит, розлади обміну аденозину в мозку тварин. Введення донора  $H_2S$  (NaHS) має протилежний ефект: підвищує активність антиоксидантних ензимів та вміст АТФ у мозку щурів із ГГЦ. Таким чином, система  $H_2S$  інтегрована в механізми пошкодження мозку за умов ГГЦ і розробка підходів до її корекції є перспективним напрямком подальших досліджень.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гомоцистеїн, гідрогенсульфід, мозок, амінооксіацетат, NaHS.

**ВСТУП.** Гідрогенсульфід ( $H_2S$ ) – біологічно активний метаболіт, який утворюється в процесі метаболізму цистеїну і гомоцистеїну в тканинах мозку (гіпокампі, мозочку, корі, стовбурі мозку, церебральних судинах) та інших тканинах [13, 14].  $H_2S$  виконує функції вазодилататора, нейромедіатора, антиоксиданта, антиагреганта, цитопротектора [13, 16]. Донори  $H_2S$  зменшують пошкодження мозку за умов експериментальної ішемії-реперфузії, гіпоксії, травми мозку [13, 16]. Порушення обміну  $H_2S$  можуть бути інтегровані в патогенез з нейродегенеративних та невроаскулярних захворювань, які часто асоціюються із синдромом гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) [8, 11]. Разом із тим, роль системи  $H_2S$  у реалізації нейротоксичної дії ГГЦ остаточно не з'ясовано.

Метою роботи було вивчити вплив модуляторів обміну  $H_2S$  (NaHS, амінооксіацетату) на стан прооксидантної та антиоксидантної систем, енергетичний обмін, показники нуклеотидного обміну в мозку щурів за умов ізольованої ГГЦ.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведено на 38 білих лабораторних щурах-самцях масою 220–280 г. Тварини перебували в стандартних умовах з природним світловим режимом день/ніч, воду і корм отримували *ad libitum*.

© П. О. Юрченко, Н. В. Заїчко, 2015.

Тварин годували напівсинтетичною крохмально-казеїновою дієтою зі збалансованим вмістом усіх макро- та мікронутрієнтів [3]. Дослідження проведено відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001), та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Тварин випадковим чином поділяли на групи по 8–10 особин у кожній.

Модель ізольованої ГГЦ створювали шляхом введення тіолактону D,L-гомоцистеїну ("Sigma", США) внутрішньошлунково в дозі 200 мг/кг маси протягом 14 діб. Двома групам тварин з ГГЦ з 10 до 14 доби вводили інгібітор цистатіонін- $\beta$ -синтетази – амінооксіацетат (АОА) внутрішньочеревно в дозі 15 мг/кг 1 раз на добу або неорганічний донор  $H_2S$  – натрію гідрогенсульфід (NaHS) внутрішньочеревно в дозі 3 мг/кг 1 раз на добу. Дози та шляхи введення речовин запозичено з літератури, і вони не викликали загибелі щурів. Знеживлювали тварин методом декапітації під пропофоловим наркозом ("Fresenius Kabi", 60 мг/кг, внутрішньочеревно).

У гомогенатах мозку визначали вміст  $H_2S$ , активність NADPH-оксидази (КФ 1.6.3.1), тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9), супероксид-

дисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1), S-аденозилгомоцистеїнгідролази (КФ 3.3.1.1), метіонінаде-нозилтрансферази (КФ 2.5.1.6), глутаматцистеїнлігази (КФ 6.3.2.2), ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів, відновленого глутатіону спектрофотометричними методами, як описано раніше [1, 2].

Активність 5'-нуклеотидази (КФ 3.1.3.5) і NTPD-ази (апірази, КФ 3.6.1.5) визначали за швидкістю утворення неорганічного фосфату при гідролізі АМФ та АДФ [5, 6], вміст аденілових нуклеотидів у депротейнізованому фільтраті мозку – хроматографічним методом [4], вміст гомоцистеїну в сироватці крові – за допомогою набору “Homocysteine EIA” (“Axis-Shield”, Англія).

Статистичний аналіз проводили з використанням t-критерію Стьюдента, для визначення зв'язків між показниками виконували кореляційний аналіз за Пірсоном. Вірогідними вважали дані при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Введення тіолактону гомоцистеїну (200 мг/кг) на 14 добу викликало зростання сироваткового рівня гомоцистеїну в 3,25 раза, зниження рівня  $H_2S$  у мозку в 2,0 рази, що зумовило зменшення відношення  $H_2S$ /гомоцистеїн у 6,14 раза (табл. 1). Введення АОА підвищувало тяжкість ГГЦ (на 54,7 %), поглиблювало дефіцит  $H_2S$  у мозку (на 28,5 %), що спричинило більш значне зниження відношення  $H_2S$ /гомоцистеїн (на 42,8 %). Введення NaHS мало протилежний ефект – зменшувало виразність ГГЦ, підвищувало рівень  $H_2S$  у мозку (на 34,6 %) та істотно збільшувало відношення  $H_2S$ /гомоцистеїн (на 71,4 %).

ГГЦ індукувала розвиток оксидативного стресу в мозку щурів, про що свідчили зростання активності прооксиданта NADPH-оксидази, вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних протеїнів (на 92,9; 85,2 та 64,8 %), зниження активності антиоксидантних ензимів – СОД, тіоредоксинредуктази, глутаматцистеїнлігази та вмісту відновленого глутатіону (на 57,1; 40,8; 50,3; 48,2 %). Введення АОА поглиблювало порушення про-антиоксидантної рівноваги та потенціювало розвиток оксидативного стресу в мозку тварин з ГГЦ. Водночас введення NaHS зменшувало (на 18–22 %) приріст активності NADPH-оксидази, вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних груп протеїнів, натомість підвищувало (на 25–50 %) активність тіоредоксинредуктази, СОД, глутаматцистеїнлігази та вміст глутатіону в мозку щурів з ГГЦ. Між вмістом  $H_2S$  та показниками про-антиоксидантної системи в мозку тварин виявляли достовірні зв'язки: прямі – з активністю тіоредоксинредуктази, глутаматцистеїнлігази, вмістом глутатіону ( $r=0,68$ ;  $0,67$ ;  $0,45$ ;  $p < 0,05$ ), обернені – з активністю NADPH-оксидази, рівнем ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів ( $r=-0,49$ ;  $-0,56$ ;  $-0,47$ ;  $p < 0,05$ ).

Важливим механізмом розвитку нейродегенеративних процесів є порушення енергетичного обміну в клітинах мозку. Введення тіолактону гомоцистеїну впродовж 14 діб спричиняло розвиток енергодефіциту в тканинах мозку, про що свідчило достовірне зменшення (на 20–30 %) вмісту АТФ та енергетичного заряду (табл. 2). Введення АОА поглиблювало ГГЦ-індукований дефіцит АТФ та зниження енергетичного заряду, тоді як введення NaHS

Таблиця 1 – Вплив модуляторів обміну  $H_2S$  на вміст гомоцистеїну і стан про-антиоксидантної систем у мозку щурів з ГГЦ ( $M \pm m$ ,  $n=8-10$ )

Показник	Група щурів			
	контроль	ГГЦ	ГГЦ+АОА	ГГЦ+NaHS
	1-ша	2-га	3-тя	4-та
Гомоцистеїн (сироватка), мкмоль/л	6,58±0,40	21,4±1,42*	33,1±2,51**	15,4±0,86**§
$H_2S$ (мозок), нмоль/мг протеїну	2,72±0,19	1,33±0,15*	0,95±0,06**	1,79±0,08**§
$H_2S$ /гомоцистеїн	0,43±0,05	0,07±0,01*	0,03±0,01**	0,12±0,01**§
NADPH-оксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	1,70±0,08	3,28±0,26*	4,55±0,22**	2,46±0,13**§
Тіоредоксинредуктаза, нмоль/хв·мг протеїну	6,03±0,46	3,57±0,32*	2,58±0,31**	4,51±0,28**§
СОД, ум. од./хв·мг протеїну	5,22±0,44	2,24±0,13*	1,60±0,14**	3,55±0,15**§
ТБК-активні продукти, мкмоль/г тканини	9,72±0,36	18,0±1,24*	22,0±0,84**	14,7±0,66**§
Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну	3,29±0,29	6,05±0,38*	7,19±0,37**	5,18±0,29**§
Глутаматцистеїнлігаза, нмоль/мг протеїну	3,98±0,52	1,95±0,31*	1,09±0,23**	2,76±0,21**§
GSH, мкмоль/мг протеїну	6,33±0,41	3,28±0,39*	2,30±0,25**	4,41±0,27**§

Примітки. Тут і в таблиці 2:

1. \* –  $p < 0,05$  відносно 1-ї групи.
2. # –  $p < 0,05$  відносно 2-ї групи.
3. § –  $p < 0,05$  відносно 3-ї групи.

Таблиця 2 – Вплив модуляторів обміну  $H_2S$  на обмін аденілових нуклеотидів та ензими циклу метилювання в мозку щурів з ГГЦ ( $M \pm m$ ,  $n=8-10$ )

Показник	Група щурів			
	контроль	ГГЦ	ГГЦ+АОА	ГГЦ+NaHS
	1-ша	2-га	3-тя	4-та
АТФ, мкмоль/г тканини	3,12±0,17	1,94±0,14*	1,78±0,09*	2,35±0,07*#§
АДФ, мкмоль/г тканини	0,97±0,04	1,72±0,07*	1,94±0,05*#	1,35±0,06*#§
АМФ, мкмоль/г тканини	0,65±0,03	0,97±0,04*	1,07±0,04*	0,80±0,02*#§
Енергетичний заряд	0,76±0,01	0,60±0,01*	0,57±0,01*	0,67±0,01*#§
5'-Нуклеотидаза, нмоль/хв-мг протеїну	7,24±0,48	3,35±0,32*	2,73±0,41*	5,27±0,53*#§
NTPD-аза (апіраза), нмоль/хв-мг протеїну	6,94±0,23	3,36±0,50*	2,67±0,42*	4,15±0,16*§
Метіонінаденозилтрансфераза, нмоль/хв-мг протеїну	2,05±0,17	1,18±0,30*	1,15±0,15*	1,46±0,10*
S-аденозилгомоцистеїн-гідролаза, нмоль/хв-мг протеїну	4,18±0,24	2,64±0,48*	2,51±0,23*	2,73±0,41*

підвищувало вміст АТФ та енергетичний заряд (на 21,1; 11,6 %), зменшувало диспропорцію між вмістом аденілових нуклеотидів у мозку щурів.

У мозку аденілові нуклеотиди не лише відіграють важливу роль в енергетичному обміні, а й слугують джерелом аденозину, є регуляторами нейротрансмісії, нейродегенерації, відповіді на гіпоксію/ішемію, вазодилатації, агрегації тромбоцитів та інших процесів, які опосередковуються через специфічні пуринові рецептори нейронів, ендотеліоцитів та інших клітин [15]. За умов ГГЦ сповільнювалися (в 2,07; 2,16 разів) гідроліз аденілових нуклеотидів та утворення аденозину з участю NTPD-ази (апірази) та 5'-нуклеотидази, знижувалась (в 1,73; 1,58 разів) активність S-аденозилгомоцистеїнгідролази і метіонінаденозилтрансферази. Введення АОА поглиблювало, а NaHS – пом'якшувало депримує вплив ГГЦ на вказані процеси в мозку щурів.

Отже, вміст  $H_2S$  у мозку є вагомим чинником, що детермінує зміни про-антиоксидантної системи, зменшення вмісту глутатіону, впливає на енергозабезпечення клітин та обмін аденозину за умов ГГЦ. Зниження вмісту  $H_2S$ , відновленого глутатіону й активності тіоредоксинредуктази є чинником тіол-дисульфідного дисбалансу та порушення регуляції активності редокс-чутливих протеїнів мозку. Поглиблення дефіциту  $H_2S$  у мозку збільшує масштабність ГГЦ-індукованого оксидативного стресу, енергодефіциту, а зростання вмісту  $H_2S$  має протилежний ефект – підвищує активність антиоксидантної системи, зменшує дисбаланс в обміні аденілових нуклеотидів.

Отримані нами результати узгоджуються з результатами досліджень *in vitro* та *in vivo*. Існують дані, що введення донорів  $H_2S$  викликає зниження рівня гомоцистеїну та продуктів пероксидації ліпідів у плазмі крові, підвищує

активність СОД у мітохондріях [9]. Донори  $H_2S$  (NaHS) стимулюють експресію СОД, тіоредоксинредуктази та зменшують вміст малонового діальдегіду в культурі нейрональних клітин [10]. NaHS та  $Na_2S$  можуть вивільняти глутатіон із змішаних дисульфідів, стимулювати транспорт цистеїну в клітини, зменшувати оксидативний стрес у мітохондріях [14], підвищувати активність глутатіонсинтетази [10]. Нормалізуючий вплив NaHS на енергетичний обмін у мозку за умов ГГЦ можна пояснити здатністю  $H_2S$  стабілізувати стан мітохондрій, попереджувати  $Ca^{2+}$ -індуковане відкривання мітохондріальної пори і набухання мітохондрій [7], постачати електрони на дихальний ланцюг та збільшувати продукцію АТФ шляхом окисного фосфорилування [12].

Таким чином, модуляція вмісту  $H_2S$  у мозку може бути важливою стратегією нейропротекції за умов ГГЦ і подальші дослідження в цьому напрямку відкривають нові перспективи фармакотерапії нейродегенеративних захворювань.

**ВИСНОВКИ.** 1. ГГЦ індукує формування несприятливого метаболічного патерну в мозку, який включає дефіцит  $H_2S$ ; оксидативний стрес, зниження активності та вмісту антиоксидантів (тіоредоксинредуктази, СОД, глутаматцистеїнлігази, глутатіону); енергодефіцитний стан; пригнічення утворення аденозину.

2. Введення інгібітора цистатіонін- $\beta$ -синтази АОА поглиблює дефіцит  $H_2S$  у мозку та підвищує нейротоксичний ефект ГГЦ. Введення NaHS зменшує виразність ГГЦ, збільшує вміст  $H_2S$  у мозку, що асоціюється з регресом оксидативного стресу, підвищенням активності тіоредоксинредуктази, глутаматцистеїнлігази, вмісту глутатіону та АТФ у мозку.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вплив навантаження цистеїном на ферментні системи метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці, нирках та мозку щурів / Н. В. Заїчко, О. О. Пентюк, А. В. Мельник, О. І. Штатко // Мед. хімія. – 2010. – **12**, № 2 (43). – С. 43–49.
2. Вплив полімікроелементного препарату “Есмін” на вікові зміни вмісту гідрогенсульфіду та показників про- / антиоксидантної системи в міокарді щурів / Н. В. Заїчко, О. С. Ольховський, А. В. Мельник [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2014. – **86**, № 3. – С. 61–68.
3. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, К. П. Постовітенко [та ін.] // Досягнення біології та медицини. – 2004. – № 1 (3). – С. 35–38.
4. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований / М. И. Прохорова. – Л. : Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.
5. Рыбальченко В. К. Структура и функции мембран : практикум / В. К. Рыбальченко, М. М. Коганов. – К. : Выща шк., 1988. – 312 с.
6. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats / S. Frassetto, M. Schetinger, R. Schierholt [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2000. – **33**, № 11. – P. 1369–1377.
7. Effect of hydrogen sulfide donor NaHS on the functional state of the respiratory chain of the rat heart mitochondria / O. M. Semenykhina, N. A. Strutyns'ka, A. Iu. Bud'ko [et al.] // Fiziol. Zh. – 2013. – **59**, № 2. – P. 9–17.
8. Herrmann W. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases / W. Herrmann, R. Obeid // Clin. Chem. Lab. Med. – 2011. – **49**, № 3. – P. 435–441.
9. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats / L. Chang, B. Geng, F. Yu [et al.] // Amino Acids. – 2008. – **34**, № 4. – P. 573–585.
10. Hydrogen sulfide protects SH-SY5Y neuronal cells against D-galactose induced cell injury by suppression of advanced glycation end products formation and oxidative stress / Y. Y. Liu, B. V. Nagpure, P. T. Wong, J. S. Bian // Neurochem. Int. – 2013. – **62**, № 5. – P. 603–609.
11. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders / M. Petras, Z. Tatarkova, M. Kovalska [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2014. – **65**, № 1. – P. 15–23.
12. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics / K. Modis, C. Coletta, K. Erdelyi [et al.] // FASEB J. – 2013. – **27**, № 2. – P. 601–611.
13. Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system / H. Kimura // Neurochem. Int. – 2013. – **63**, № 5. – P. 492–497.
14. Kimura Y. Hydrogen sulphide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria / Y. Kimura, Y. I. Goto, H. Kimura // Antioxidants and Redox. Signaling. – 2010. – **12**, № 1. – P. 1–13.
15. Latini S. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations / S. Latini, F. Pedata // J. Neurochem. – 2001. – **79**. – P. 463–484.
16. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury / J. F. Wang, Y. Li, J. N. Song, H. G. Pang // Neurochem. Int. – 2014. – **64**. – P. 37–47.

**П. А. Юрченко, Н. В. Заїчко**

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ КРЫС С ИЗОЛИРОВАННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ ПРИ МОДУЛЯЦИИ ОБМЕНА ГИДРОГЕНСУЛЬФИДА**

### **Резюме**

*Исследовано влияние модуляторов обмена гидрогенсульфида ( $H_2S$ ) – аминоксиацетата (ингибитора цистатионин- $\beta$ -синтазы) и NaHS на биохимические показатели мозга крыс с изолированной гипергомоцистеинемией (ГГЦ), индуцированной введением тиолактона гомоцистеина (200 мг/кг 14 суток). Ингибирование синтеза  $H_2S$  потенцирует ГГЦ-индуцированный оксидативный стресс, энергодифицит, нарушения обмена аденозина в мозге животных. Введение донора  $H_2S$  (NaHS) оказывает противоположный эффект: повышает активность антиоксидантных ферментов и содержание АТФ в мозге крыс с ГГЦ. Таким образом, система  $H_2S$  интегрирована в механизмы*

повреждения мозга в условиях ГГЦ и разработка подходов к ее коррекции является перспективным направлением дальнейших исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гомоцистеин, гидродисульфид, мозг, аминоксиацетат, NaHS.

**P. O. Yurchenko, N. V. Zaichko**

M. I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## **BIOCHEMICAL CHANGES IN RATS' BRAIN WITH ISOLATED HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN MODULATION OF HYDROGEN SULFIDE METABOLISM**

### **Summary**

*The effect of modulators exchange of hydrogen ( $H_2S$ ) – aminoxyacetate (inhibitor of cystathionine  $\beta$ -synthase) and NaHS was estimated on biochemical indicators in rats' brain with isolated hyperhomocysteinemia, wich was induced by thiolactone homocysteine administration (200 mg/kg for 14 days). Inhibition of  $H_2S$  synthesis potentiates HHC-induced oxidative stress, deficit of energy, disorders of adenosine metabolism in rats' brain. Administration of  $H_2S$  donor NaHS has the opposite effect. It increases antioxidant enzymes activity and content of ATP in rats' brain with HHC. Thus, the  $H_2S$  system is integrated into the brain damage mechanisms in condition of HHC and possible ways of its correction are perspective direction for the future investigations.*

KEY WORDS: **homocysteine, hydrogen sulfide, brain, aminoxyacetate, NaHS.**

Отримано 27.01.15

**Адреса для листування:** Н. В. Заїчко, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна, e-mail: nzaichko@mail.ru.