

© Юрченко П.О., Заїчко Н.В., Фільчуков Д.О.

УДК: 546.221.1: 616.83: 616.153

Юрченко П.О., Заїчко Н.В., Фільчуков Д.О.

Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова МОЗ України, кафедра біологічної та загальної хімії (вул. Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна)

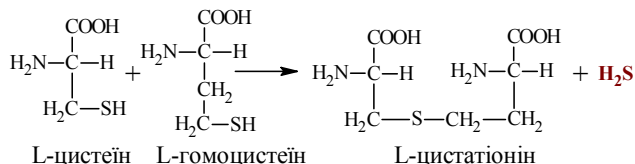
РІВЕНЬ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ТІОЛАКТОНОВОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЇ

Резюме. Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) асоціюється з нейроваскулярними і нейродегенеративними захворюваннями. Утилізація гомоцистеїну в головному мозку пов'язана із синтезом H_2S -нейромодулятора, вазодилатора, цитопротектора. Метою роботи було встановити вплив тіолактонової ГГЦ на рівень H_2S і показники про- /антиоксидантної систем в мозку щурів в умовах корекції вітамінами B_6 , B_9 , B_{12} і полімікроелементним комплексом есмін. ГГЦ викликала зниження рівня H_2S в мозку, що асоціювалось зі зменшенням активності антиоксидантної системи. Введення комбінації вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} і есміну ефективно знижувало рівень гомоцистеїну в крові, зменшувало дефіцит H_2S , підвищувало активність антиоксидантних ензимів у мозку щурів з ГГЦ.

Ключові слова: гомоцистеїн, гідроген сульфід, вітаміни, мікроелементи, есмін, мозок.

Вступ

Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) асоціюється з нейроваскулярними і нейродегенеративними захворюваннями - хворобою Альцгеймера, судинною деменцією, периферичною нейропатією, когнітивними порушеннями [Luo et al., 2013; Petras et al., 2014]. У процесі утилізації гомоцистеїну (ГЦ) в тканинах мозку (гіпокампі, мозочку, корі, стовбурі мозку) синтезується біологічно-активний метаболіт - гідроген сульфід (H_2S). H_2S є газотрансмітером та бере участь у регуляції судинного тону, нейромодуляції, цитопротекції, апоптозі [Kimura, 2013]. Ключовим джерелом H_2S в мозку є реакція конденсації ГЦ з L-цистеїном за участі піридоксин-залежного ензиму цистатіонін- β -синтази:



Роль системи H_2S в механізмах нейротоксичної дії ГГЦ не з'ясована. Як відомо, для корекції ГГЦ використовують вітаміни групи В (фолат, кобаламін, піридоксин) або їх поєднання з мікроелементами [Пентюк та ін., 2003; Артемчук, 2006], однак питання щодо впливу цих засобів на обмін H_2S в мозку залишається відкритим.

Метою роботи було встановити вплив тіолактонової ГГЦ на рівень H_2S і показники про- / антиоксидантної системи в мозку щурів за умов корекції вітамінами B_6 , B_9 , B_{12} та полімікроелементним засобом есмін.

Матеріали та методи

Досліди проведені на 50 білих лабораторних щурах-самцях (250-270 г) згідно етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених І національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей" (Страс-

бург, 1986). Тварини перебували в стандартних умовах віварію з природним світловим режимом день/ніч, воду і їжу отримували ad libitum, на дослідні групи розподілялись випадковим чином (по 10 щурів). Ізольовану ГГЦ (n=40) викликали шляхом інтрагастрального введення тіолактону D,L-гомоцистеїну (Sigma, США) в дозі 100 мг/кг маси на 1% крохмальному гелі протягом 28 днів. З метою корекції ГГЦ три групи щурів отримували інтрагастрально: вітаміни B_6 , B_9 , B_{12} (714; 143; 14,3 мкг/кг маси); або полімікроелементний комплекс есмін (Есмін, АТ "Київський вітамінний завод", Україна) 35 мг/кг маси на добу; або поєднання вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} і есміну, відповідно, з 1 по 28 добу. Есмін містить поліядерні комплекси есенціальних мікроелементів (Fe, Cu, Zn, Co, Mn, Cr) з N-2,3-диметилфенілантраніловою кислотою та кисеньвмісними солі V, Mo, Se, які мають антиоксидантну та цитопротекторну дію [Узленкова та ін., 2013]. Щурам контрольної групи вводили еквівалентні об'єми розчинників. Знеживлювали тварин шляхом декапітації під пропорофоловим наркозом (60 мг/кг інтраперітонеально).

Вміст ГЦ у сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "Homocysteine EIA" (Axis-Shield, Англія). Вміст H_2S в мозку визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [Wilinski et al., 2011]. В постядерному супернатанті гомогенатів мозку визначали активність цистатіонін- β -синтази (КФ 4.2.1.22) за приростом вмісту H_2S [Заїчко та ін., 2009]; NADPH-оксидази (КФ 1.6.3.1) - за поглинанням NADPH при 340 нм; тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9) - за NADPH-залежним відновленням 5,5'-дитіобіс(2-нітробензоату); супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.15.1.1) - за інгібуванням окиснення кверцетину; глутаматцистеїнілази (КФ 6.3.2.2) - за приростом неорганічного фосфату як було описано [Заїчко та ін., 2014; Orłowski, Meister, 1971]. Вміст глутатіону визначали в депротейнізованому трихлороцтовому екстракті тканин мозку за реакцією з 5,5'-дитіобіс(2-нітробензоатом). Рівень протеїну визначали мікробіуретовим методом [Кочетов, 1980]. Статистич-

ний аналіз проводили з використанням t-критерію Ст'юдента, кореляційний аналіз проводили за Пірсоном. Вірогідними вважали результати при $p < 0,05$.

Результати. Обговорення

Введення тіолактону ГЦ викликало підвищення базального рівня ГЦ в сироватці крові на 154% (табл. 1), що асоціювалось зі зниженням рівня H_2S (на 53%) та активності цистатіонін- β -синтази (на 34,1%) у мозку щурів. Введення вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} та есміну, особливо у поєднанні, достовірно стримувало розвиток ГЦ та попереджало порушення в системі H_2S / цистатіонін- β -синтаза в мозку. Так, у щурів у групах "ГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} ", "ГЦ + есмін" та "ГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} + есмін" рівень ГЦ у сироватці був нижчий на 27,4; 12,5; 41,5%, а рівень H_2S в мозку, навпаки, вищий на 43,5; 17,7 та 95,2%, ніж у щурів з ГЦ. Активність цистатіонін- β -синтази в мозку була вірогідно вищою (на 25,7 та 47,4%) у групах "ГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} " та "ГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} + есмін", ніж у щурів з ГЦ.

За умов тіолактонової ГЦ спостерігали збільшення активності прооксидантного ензиму NADPH-оксидази (на 76,0%); зниження активності антиоксидантних ензимів СОД, тіоредоксинредуктази (на 38,6; 53,3%), вмісту відновленого глутатіону (на 50,3%) та пригнічення його синтезу за участі глутаматцистеїнліази (на 48,2%) у мозку щурів. Введення вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} та есміну достовірно стримувало розвиток оксидативного стресу і запобігало зниженню активності антиоксидантних ензимів та вмісту відновленого глутатіону в мозку щурів з ГЦ. Найбільший антиоксидантний ефект за умов ГЦ виявився при застосуванні вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} у поєднанні з есміном (табл. 1).

Результати кореляційного аналізу засвідчили достовірний обернений зв'язок між сироватковим рівнем ГЦ та вмістом H_2S в мозку ($r = 0,51$; $p < 0,05$). За умов тіолактонової ГЦ рівень H_2S прямо корелював з активні-

стю цистатіонін- β -синтази, тіоредоксинредуктази, глутаматцистеїнліази, відновленого глутатіону ($r = 0,70$; $0,68$; $0,45$; $0,67$; $p < 0,05$) та обернено - з активністю NADPH-оксидази ($r = -0,49$; $p < 0,05$) в мозку. Зв'язки показників про- та антиоксидантної систем в мозку з сироватковим рівнем ГЦ мали протилежну спрямованість.

Негативний вплив ГЦ на систему H_2S в мозку може реалізуватись через різні механізми. Активність цистатіонін- β -синтази залежить від рівня алостеричного активатора S-аденозилметіоніну в клітинах [Kimura, 2013], синтез якого пригнічується за ГЦ [Пентюк та ін., 2003]. За ГЦ може посилюватись деградація H_2S при взаємодії з активними формами кисню та азоту, ліпідними дериватами, низькомолекулярними тіолами з утворенням персульфідів та тійльних радикалів. Оскільки H_2S є активатором цистин-глутаматних антипортерів та глутаматцистеїнліази [Stein, Bailey, 2013], то його дефіцит в мозку може спричинити порушення синтезу глутатіону. Натомість, в присутності H_2S активується експресія тіоредоксинредуктази, глутатіон-S-трансферази в клітинах [Stein, Bailey, 2013]. Роль вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} в обміні ГЦ та їх гіпогомощістемічний ефект є добре відомим [Пентюк та ін., 2003; Артемчук, 2006]. Здатність есміну потенціювати дію вітамінів та нормалізувати стан системи H_2S в мозку за ГЦ може пояснюватись наявністю в його складі мікроелементів - коактиваторів та кофакторів ензимів метаболізму ГЦ та антиоксидантних ензимів [Заїчко та ін., 2014]. Таким чином, порушення в системі " H_2S / цистатіонін- β -синтаза" інтегровані в патогенетичні механізми ГЦ.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Введення тіолактону ГЦ (100 мг/кг 28 діб) викликає зростання базального рівня ГЦ в сироватці крові на 154%, зниження вмісту H_2S та активності цистатіонін- β -синтази в мозку щурів на 53,0 та 34,1%. Зміни

Таблиця 1. Стан системи H_2S та біохімічні показники в мозку щурів за тіолактонової ГЦ та її корекції ($M \pm m$, $n = 10$).

Показники	Контроль, $n = 10$	ГЦ, $n = 10$	ГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} , $n = 10$	ГЦ + есмін, $n = 10$	ГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} + есмін, $n = 10$
	1	2	3	4	5
ГЦ, мкмоль / л	6,62 \pm 0,23	16,8 \pm 0,92*	12,2 \pm 0,88*#	14,7 \pm 0,76*§	9,82 \pm 0,09*#§&
Мозок					
H_2S , нмоль/ мг протеїну	2,64 \pm 0,15	1,24 \pm 0,12*	1,78 \pm 0,11*#	1,46 \pm 0,08*§	2,42 \pm 0,13#§&
Цистатіонін- β -синтаза	0,45 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02*	0,37 \pm 0,02*#	0,34 \pm 0,04*	0,43 \pm 0,02#§&
NADPH-оксидаза	1,75 \pm 0,07	3,08 \pm 0,19*	2,31 \pm 0,11*#	2,52 \pm 0,19*#	2,04 \pm 0,14#&
Тіоредоксинредуктаза	5,98 \pm 0,26	3,67 \pm 0,19*	4,58 \pm 0,31*#	4,07 \pm 0,28*	5,31 \pm 0,20#&
СОД	5,70 \pm 0,35	2,66 \pm 0,15*	3,98 \pm 0,21*#	3,62 \pm 0,17*#	4,66 \pm 0,21*#§&
Глутаматцистеїнліаза	3,66 \pm 0,28	2,19 \pm 0,36*	3,07 \pm 0,50	2,84 \pm 0,42	3,49 \pm 0,13#
Глутатіон, мкмоль/мг протеїну	6,45 \pm 0,40	3,44 \pm 0,37*	4,37 \pm 0,26*#	4,02 \pm 0,31*	5,18 \pm 0,38*#&

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - групи 2; § - групи 3; & - групи 4; 2. активність ензимів - в нмоль/хв.·мг протеїну, СОД - в ум.од./хв.·мг протеїну.

в системі H_2S / цистатіонін- β -синтаза асоціюються з підвищенням активності NADPH-оксидази, зниженням активності тіореодоксинредуктази, СОД, інгібуванням синтезу глутатіону в мозку у щурів з тіолактоновою ГГЦ.

2. Введення композиції вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} та есміну проявляє найбільший гіпогомоцистеїнемічний

ефект, запобігає порушенням в системі H_2S в мозку та підвищує активність антиоксидантної системи за умов тіолактонової ГГЦ.

Вітамінно-мікроелементна корекція обміну ендogenous H_2S може стати перспективною стратегією в профілактиці нейродегенеративних процесів за ГГЦ, що потребує подальшого клінічного підтвердження.

Список літератури

- Артемчук М.А. Профілактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпогомоцистеїнемії / М.А.Артемчук // Biomedical and Biosocial Anthropology. - 2006. - №7. - С.17-20.
- Вплив полімікроелементного препарату "Есмін" на вікові зміни вмісту гідрогенсульфіду та показників про- / антиоксидантної системи в міокарді щурів / Заїчко Н.В., Ольховський О.С., Мельник А.В. [та ін.] // Укр. біохім. журнал. - 2014. - Т.86, №3. - С.61-68.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. - М.: Высшая школа, 1980. - 272 с.
- Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / Пентюк О.О., Луцюк М.Б., Андрушко І.І., Постовітенко К.П. // Укр. біохім. журн. - 2003. - 75, №1. - С.5-17.
- Утворення гідроген сульфід у органах щурів / Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, А.В. Мельник [та ін.] // Медична хімія. - 2009. - Т.11, №4. - С.7-13.
- Ефективність есміну при дії на організм іонізуючого випромінювання / Узленкова Н.Є., Мамотюк Є.М., Григор'єва Г.С., Коначович Н.Ф. // Журн. НАМН України. - 2013. - Т.19, №1. - С.34-45.
- Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs / Wilinski B., Wilinski J., Somogyi E. [et al.] // Folia Biol (Krakow). - 2011. - Vol. 59, №3-4. - P.151-155.
- Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders / Petras M., Tatarkova Z., Kovalska M. [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. - 2014. - Vol. 65, №1. - P.15-23.
- Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system / Kimura H. // Neurochem. Int. - 2013. - Vol. 63, № 5. - P.492-497.
- Luo J.J. Electrophysiologic features of peripheral neuropathy in adults with an isolated elevated plasma level of homocysteine / J.J. Luo, F. Bumanlag, N.J. Dun // J Neurol Transl Neurosci. - 2013. - Vol. 2, №1. - P. 1027.
- Orlowski M. Partial reactions catalyzed by β -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate / M. Orlowski, A. Meister // J. Biol. Chem. - 1971. - Vol. 246, №23. - P.7095-7105.
- Stein A. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology / Stein A., Bailey Sh.M. // Redox Biology - 2013. - №1. - P.32-39.

Юрченко П.А., Заїчко Н.В., Фільчуков Д.А.

УРОВЕНЬ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ТИОЛАКТОНОВОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ И ЕЕ КОРЕКЦИИ

Резюме. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) ассоциируется с невроваскулярными и нейродегенеративными заболеваниями. Утилизация гомоцистеина в головном мозге связана с синтезом H_2S -нейромодулятора, вазодилатора, цитопротектора. Целью работы было установить влияние тиолактоновой ГГЦ на уровень H_2S и показатели про- /антиоксидантной систем в мозге крыс в условиях коррекции витаминами B_6 , B_9 , B_{12} и полимикроэлементным комплексом эсмин. ГГЦ индуцировала снижение уровня H_2S в мозге, что ассоциировалось со снижением активности антиоксидантной системы. Введение комбинации витаминов B_6 , B_9 , B_{12} и эсмина эффективно снижало уровень гомоцистеина в крови, уменьшало дефицит H_2S , повышало активность антиоксидантных ферментов в мозге крыс с ГГЦ.

Ключевые слова: гомоцистеин, гидроген сульфид, витамины, микроэлементы, эсмин, мозг.

Yurchenko P.A., Zaichko N.V., Filchukov D.A.

THE LEVEL OF HYDROGEN SULPHIDE AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN RAT BRAIN IN HOMOCYSTEINE THIOLACTONE-INDUCED HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND ITS CORRECTION

Summary. Hyperhomocysteinemia (HHC) is associated with neurovascular and neurodegenerative diseases. Disposal of homocysteine in the brain associated with the synthesis of H_2S - neuromodulator, vasodilator, cytoprotector. The aim was to determine the effect of homocysteine thiolactone-induced HHC on H_2S level and indicators pro- / antioxidant systems in the rats brain under correction with vitamins B_6 , B_9 , B_{12} and trace element complex Esmin. HHC induced reduction of H_2S levels in brain that was associated with a decrease activity of an antioxidant system. Administration of a combination of vitamins B_6 , B_9 , B_{12} and esmin effectively reduces the level of homocysteine in the blood, reduced the deficit of H_2S , and increased the activity of antioxidant enzymes in rat brain with HHC.

Key words: homocysteine, hydrogen sulfide, vitamins, trace element, esmin, brain.

Рецензент - д.мед.н., профессор Волощук Н.І.

Стаття надійшла до редакції 11.05.2015 р.

Юрченко Петро Олександрович - асистент кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І.Пирогова; +38 0432 66-12-24; peter777ah@mail.ru

Заїчко Наталія Валентинівна - д.мед.н., доцент, завідувач кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І.Пирогова; +38 0432 66-12-24

Фільчуков Деніс Олександрович - к.мед.н., доцент кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І.Пирогова; +38 0432 66-12-24