

вой дозе (25,0 мг/кг, в/бр) на протяжении трех недель. Через 24 ч. с момента его создания в открытом поле наблюдалось снижение исследуемых показателей двигательной активности, которое блокировалось применением налоксона (10,0 мг/кг, в/бр). Леветирацетам (200,0 мг/кг, в/бр) снижал число эпизодов груминга у киндлинговых крыс и этот эффект устранялся на фоне применения налоксона. Позно-тонические реакции у киндлинговых крыс характеризовались превалированием опиоид-детерминированных проявлений и под влиянием леветирацетама наблюдалось увеличение числа крыс с экзофтальмом (до 66,7%), высоким тонусом хвоста и способностью. Удерживать позу "мостик" (до 86,7%). Эти эффекты леветирацетама блокировались налоксоном (10,0 мг/кг, в/бр).

Ключевые слова: химический киндлинг, леветирацетам, поведение крыс.

Muratova T.N., Godovan V.V., Polyasny V.A.

OPIATE MECHANISMS OF LEVETIRACTEAM ACTION UPON SPONTANEOUS AND INDUCED LOCOMOTOR ACTIVITY OF KINDLED RATS

Summary. The kindling syndrome have been induced in Wistar rats via subthreshold dosage of corazol (25,0 mg/kg, i.p.) administration during three weeks. In 24 h. from the moment of kindling induction the net reduction of locomotor activity was observed in open field test, which was blocked by naloxone (10,0 mg/kg, i.p.). Levetiracetam (200,0 mg/kg, i.p.) decreased the number of grooming episodes in kindled rats and this effect was abolished by naloxone. Postural and tonic behavioral reactions in kindled rats were characterized by the prevalence of opioid - determined manifestations and levetiracetam induced the increase of number of rats with exophthalm (up to 66,7%), the number of rats with high tail tonus and such one who were able to keep "bridge" position (up to 86,7%). Mentioned effects induced by levetiracetam were blocked by naloxone (10,0 mg/kg, i.p.).

Key words: chemical kindling, levetiracetam, rat's behavior.

Стаття надійшла до редакції 06.05.2014 р.

Муратова Тетяна Миколаївна - к. мед. н., доцент кафедри нейрохірургії і неврології Одеського національного медичного університету; godlevsky@odmu.edu.ua

Годован Владлена Володимирівна - д. мед. н., професор кафедри загальної та клінічної фармакології Одеського національного медичного університету; +38 050 358-92-36; godovan@mail.ru

Полясний Вячеслав Олексійович - к. мед. н., доцент кафедри соціальної медицини, медичного права і менеджменту Одеського національного медичного університету

© Мельник А.В., Заїчко Н.В., Паламарчук І.В.

УДК: 546.221.1:599.323.4:611.13

Мельник А.В., Заїчко Н.В., Паламарчук І.В.

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

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ТА ТОНУС АОРТИ ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП

Резюме. Вивчено вплив модуляторів обміну гідроген сульфід (H₂S) - NaHS та пропаргілгліцину на стан аорти щурів трьох вікових груп - статевонезрілих (1 - 2 міс.), дорослих (6 - 8 міс.) та старих (24 - 26 міс.). Двотижневе введення пропаргілгліцину викликає зниження (на 40 - 60%) активності H₂S-синтезуючих ензимів та вмісту H₂S в аорті, в той час як введення NaHS підвищує ці показники. У старих та дорослих щурів під впливом пропаргілгліцину істотно підвищується вміст маркера ендотеліальної дисфункції sVCAM в сироватці крові. Пропаргілгліцин знижує чутливість аорти старих і, меншою мірою, дорослих щурів до вазодилатуючої дії H₂S (в концентраціях 10⁻⁶ - 10⁻³ М), а введення NaHS, навпаки, сприяє її підвищенню. Введення модуляторів обміну H₂S суттєво не впливає на функціональний стан аорти у статевонезрілих щурів.

Ключові слова: гідроген сульфід, пропаргілгліцин, аорта, вік.

Вступ

Одним із механізмів кардіоваскулярного старіння є пригнічення судинної продукції вазодилататорів (ацетилхоліну, нітроген монооксиду) та посилення продукції вазоконстрикторів (ендотеліну-1, ангіотензину) [Кульчицкий, 2005; Taddei et al., 2003]. В останні роки було встановлено, що важливу роль в регуляції судинного тонуусу відіграє гідроген сульфід (H₂S) - метаболіт сірковмісних амінокислот, газотрансмітер, цитопротектор та антиоксидант [Kimura, 2011]. Доведено, що донори H₂S зменшують пошкодження органів (міокарду, мозку, нирок) при експериментальній ішемії-реперфузії, оксидативному стресі, запаленні, а інгібітори H₂S-синтезуючих ензимів, навпаки, проявляють адитивний

ефект [Lowicka, Beltowski, 2007; Kimura, 2011]. Раніше нами було показано, що в процесі старіння відбувається зниження активності H₂S-синтезуючих ензимів в аорті щурів [Ольховский та ін., 2011], однак, вікові особливості впливу модуляторів обміну H₂S на стан судин залишаються не визначеними. Метою роботи було встановлення впливу донору H₂S - натрій гідросульфід та інгібітору синтезу H₂S - пропаргілгліцину на біохімічні та функціональні показники стану аорти щурів різних вікових груп.

Матеріали та методи

Досліди проведені на 90 білих нелінійних щурах-

самцях (*Rattus norvegicus*) трьох вікових груп: статевонезрілі (1 - 2 міс., маса тіла 60 - 80 г), дорослі (6 - 8 міс., маса тіла 220 - 280 г), старі (24 - 26 міс., маса тіла 330 - 380 г). Тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч, воду і збалансований гранульований корм отримували *ad libitum*. Дослідження проведено згідно загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі.

Щурів кожної вікової групи розподіляли на 3 підгрупи (n=10): 1 - контроль, 2 - введення пропаргілгліцину, 3 - введення NaHS. Щурам 2-х підгруп вводили необоротний інгібітор цистатіонін-γ-ліази D,L-пропаргілгліцин в дозі 50 мг/кг маси, щурам 3-х підгруп - донор H₂S - NaHS в дозі 3 мг/кг маси, щурам 1-х підгруп - 0,9% розчин NaCl щоденно 1 раз на добу інтраперітонеально протягом 14 днів. Через 24 години після останнього введення речовин тварин знеживлювали методом цервікальної дислокації.

Вміст H₂S та активність H₂S-синтезуючих ензимів - цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3), тіосульфатдитіолсульфідтрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5) в аорті визначали як описано раніше [Wilinski et al., 2011; Ольховський та ін., 2011]. Вміст адгезивної молекули судинних клітин-1 (sVCAM-1) в сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "sVCAM-1 ELISA KIT" (Diacalone, Франція) у відповідності до інструкції фірми - виробника.

Скоротливість ізолюваних фрагментів аорти реєстрували за допомогою тензометричної установки, створеної в ДУ "Інститут фізіології АМН України ім. О.О. Богомольця", за загальноприйнятою методикою [Mel'nik et al., 2010].

Для оцінки H₂S-стимульованого розслаблення ізолювані фрагменти аорти, передскороченої фенілефріном (10-6М), перфузували розчинами, що містили одночасно фенілефрин (10-6М) та H₂S в різних концентраціях (10-2-10-6М), протягом 15 хв. кожний з наступною реєстрацією змін ізометричного напруження. Результати представляли у відсотках, які розраховували відносно показника ізометричного напруження фрагменту аорти, досягнутого при дії фенілефрину і прийнятого за 100%.

Результати. Обговорення

Встановлено, що з віком швидкість утворення H₂S в аорті щурів істотно зменшується. Активність H₂S-синтезуючих ензимів - ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ в аорті старих щурів є меншою на 37,5; 27,6 та 44,7%, ніж у статевонезрілих тварин, та на 17,0; 16,8 та 18,5% меншою, ніж у дорослих щурів (табл. 1). Введення пропаргілгліцину викликало достовірне зниження активності ЦГЛ і не викликало суттєвих змін активності інших H₂S-синтезуючих ензимів в аорті щурів всіх вікових груп. При цьому, інгібуючий ефект пропаргілгліцину залежав від віку і виявився максимальним у старих щурів: активність ЦГЛ в підгрупах "пропаргілгліцин" у тварин віком 24 - 26 міс., 6 - 8 міс. та 1 - 2 міс. була на 61,2; 52,2 та 36,8% меншою, ніж у відповідного контролю. Введення NaHS суттєво не впливало на активність H₂S-синтезуючих ензимів в аорті щурів.

Вік - асоційоване зниження активності H₂S-синтезуючих ензимів супроводжувалося зменшенням вмісту H₂S в аорті та сироватці крові (табл. 2). Введення пропаргілгліцину викликало достовірне зниження, а NaHS

Таблиця 1. Вплив пропаргілгліцину та NaHS на активність H₂S-синтезуючих ензимів в аорті щурів різного віку (M±m, n=10).

Групи щурів	Умови дослідження	Активність ензимів, нмоль H ₂ S /хв·мг протеїну		
		ЦГЛ	ЦАТ	ТСТ
1 Статевонезрілі, 1-2 міс.	Контроль	0,921±0,055	0,642±0,030	2,84±0,16
	Пропаргілгліцин	0,582±0,035*	0,667±0,033	2,67±0,12
	NaHS	0,883±0,028	0,684±0,066	2,78±0,14
2 Дорослі, 6-8 міс.	Контроль	0,693±0,029*	0,559±0,044	1,89±0,08*
	Пропаргілгліцин	0,331±0,017*	0,546±0,037	1,94±0,09
	NaHS	0,675±0,019	0,603±0,035	2,35±0,15*
3 Старі, 24-26 міс.	Контроль	0,575±0,035#	0,465±0,036#	1,54±0,07#
	Пропаргілгліцин	0,223±0,011*	0,452±0,025	1,43±0,04
	NaHS	0,469±0,033*	0,434±0,033	1,57±0,07

Примітки: * - p<0,05 щодо контролю у відповідній групі; # - p<0,05 щодо статевонезрілих щурів; § - p<0,05 щодо дорослих щурів.

Таблиця 2. Вплив пропаргілгліцину та NaHS на вміст H₂S в аорті та сироватці крові, вміст sVCAM-1 в сироватці крові у щурів різного віку (M±m, n=10).

Групи щурів	Умови дослідження	Вміст H ₂ S в аорті, мкг/г тканини	Вміст H ₂ S в сироватці крові, мкмоль/л	Вміст sVCAM-1 в сироватці крові, нг/мл
1 Статевонезрілі, 1-2 міс.	Контроль	4,30±0,12	86,1±2,41	456±30,8
	Пропаргілгліцин	2,69±0,09*	71,0±1,88*	484±21,0
	NaHS	5,10±0,21*	92,3±1,57*	403±13,0
2 Дорослі, 6-8 міс.	Контроль	3,77±0,13#	80,2±2,97	508±20,9
	Пропаргілгліцин	1,93±0,06*	60,3±2,85*	624±22,8*
	NaHS	4,72±0,10*	90,6±2,10*	419±27,8*
3 Старі, 24-26 міс.	Контроль	3,36±0,09#	69,6±2,12#	652±22,4#
	Пропаргілгліцин	1,29±0,05*	46,2±1,69*	932±35,2*
	NaHS	5,21±0,13*	85,5±1,44*	463±25,3*

Примітки: * - p<0,05 щодо контролю у відповідній групі; # - p<0,05 щодо статевонезрілих щурів; § - p<0,05 щодо дорослих щурів.

- підвищення вмісту H_2S в аорті щурів всіх вікових груп і найбільший ефект реєструвався у старих тварин. Так, рівень H_2S в аорті щурів віком 24 - 26 міс., 6 - 8 міс. та 1 - 2 міс. у групах "пропаргілгліцин" був на 61,6; 48,8 та 37,4% меншим, а в групах "NaHS" - на 55,0; 25,1 та 18,6% вищим, ніж в контролі. Між вмістом H_2S в сироватці крові і активністю ЦГЛ виявлявся прямий кореляційний зв'язок, який посилювався з віком: $r=0,63$ ($p<0,05$); 0,49; 0,39 в групах старих, дорослих та статевонезрілих щурів.

Одним із маркерів ендотеліальної дисфункції є зростання вмісту розчинної молекули адгезії судинних клітин sVCAM-1 в сироватці крові, що зокрема спостерігається при атеросклерозі та ішемічній хворобі серця [Turhan et al., 2006; Chan et al., 2014]. Виявилось, вміст sVCAM-1 в сироватці крові старих щурів був достовірно вищим (на 28,3 та 42,9%), ніж у дорослих та статевонезрілих щурів і обернено корелював з вмістом H_2S в аорті ($r=-0,86$; $-0,50$; $-0,33$; $p<0,05$). Введення пропаргілгліцину поглиблювало, а NaHS, навпаки, зменшувало ознаки ендотеліальної дисфункції у старих та дорослих тварин. Вміст sVCAM-1 в сироватці крові щурів віком 24 - 26 міс та 6 - 8 міс. в групах "пропаргілгліцин" був на 42,9 та 22,8% вищим, а в групах "NaHS" - на 29,0 та 17,5% вищим, ніж в контролі. Модулятори обміну H_2S не викликали достовірних змін вмісту sVCAM-1 у щурів віком 1 - 2 міс.

Дослідження впливу H_2S на тонус аорти щурів засвідчило, що з віком реєструється зниження чутливості судин до вазорелаксуючої дії цього медіатора (рис. 1). Так, H_2S в діапазоні концентрацій 10^{-6} - 10^{-2} М у щурів віком 24 - 26 міс. викликав менш виразну вазорелаксацію, ніж у щурів віком 6 - 8 міс. та 1 - 2 міс. У старих щурів відмічалось зміщення кривої "доза - ефект" праворуч порівняно із дорослими та статевонезрілими щурами із максимальним ефектом 45,5; 57,0; 61,8% в концентрації 10^{-3} М, відповідно. Середня ефективна концентрація (EC_{50}) H_2S , яка викликає розслаблення кільцевих фрагментів аорти на 50%, у старих щурів була достовірно вищою, ніж у дорослих та статевозрілих щурів і становила $119\pm7,24$ мкМ проти $94,1\pm4,00$ та $70,2\pm6,12$ мкМ, відповідно.

Введення пропаргілгліцину викликало суттєве зниження чутливості аорти до дії H_2S у дорослих і особливо у старих щурів (рис. 2). Це підтверджується достовірним зростанням EC_{50} H_2S у старих щурів до $156\pm8,12$ мкМ та дорослих щурів до $114\pm5,12$ мкМ ($p<0,05$ відносно контролю). Двотижневе введення NaHS підвищувало чутливість аорти до вазодилатуючої дії H_2S у дорослих та старих щурів: EC_{50} H_2S в цих групах становило $73,9\pm4,35$ ($p<0,05$) та $104\pm7,56$ мкМ ($p>0,05$).

Не виключено, що в процесі старіння в судинах порушується робота редокс-чутливих K^+_{ATP} -каналів - головної мішені в реалізації вазодилатуючої дії H_2S [Kimura, 2011]. Зниження чутливості судин до релаксуючої дії H_2S в процесі старіння може бути наслідком

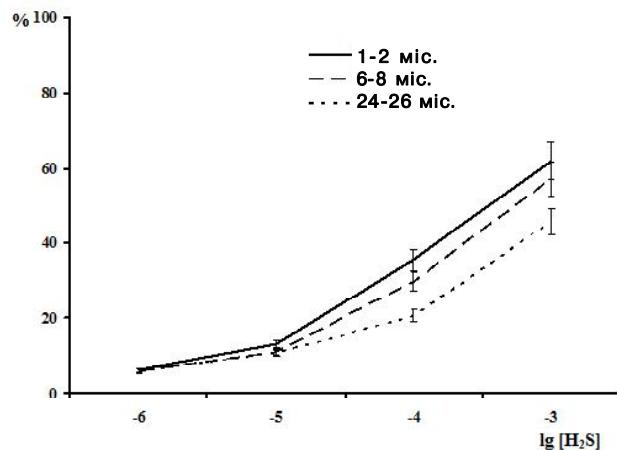


Рис. 1. H_2S -стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти у статевонезрілих (1-2 міс.), дорослих (6-8 міс.) та старих щурів (24-26 міс.). За 100% прийнятий рівень H_2S -стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення ($M\pm m$, $n=5$).

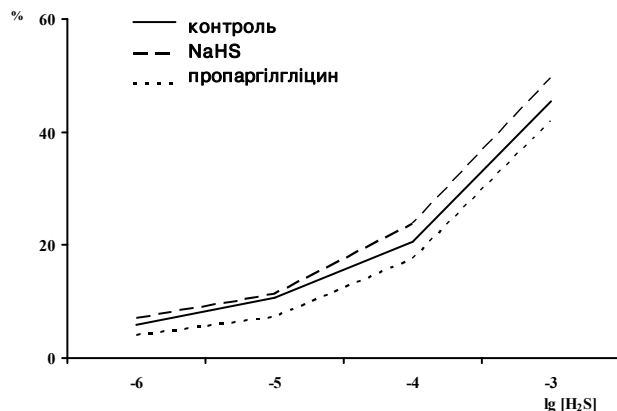


Рис. 2. Вплив пропаргілгліцину та NaHS на H_2S -стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти у старих щурів ($M\pm m$, $n=5$).

прозапальних змін в ендотелії, про що свідчить підвищення вмісту sVCAM-1 в сироватці крові. Зростання вмісту sVCAM-1 в процесі старіння відмічалось і в інших дослідженнях [Miles, 2008].

Таким чином, з віком зменшується здатність судин до H_2S -індукованої вазодилататії та зростає чутливість судин до дії модуляторів обміну H_2S . Інгібування судинної продукції H_2S асоціюється із прискоренням формуванням вік - асоціованої ендотеліальної дисфункції, а введення донорів H_2S , навпаки, стримує її розвиток.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У процесі старіння знижується активність H_2S -синтезуючих ензимів (ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ), знижується вміст H_2S в аорті, що асоціюється з підвищенням вмісту sVCAM-1 в сироватці крові.

2. Введення пропаргілгліцину викликає зниження

(на 30 - 60%) вмісту H_2S в сироватці крові та аорті, зменшення активності ЦГЛ (на 50 - 80%) в аорті у щурів всіх вікових груп. Депримує ефект пропаргилгліцину на синтез H_2S в аорті є найбільшим у щурів віком 24 - 2 міс. і асоціюється із значним зростанням вмісту sVCAM-1 в сироватці крові. Введення NaHS відновлює дефіцит H_2S в аорті і зменшує ознаки ендотеліальної дисфункції у старих щурів.

3. У процесі старіння реєструється зменшення (на 40-

50%) чутливості аорти до релаксуючої дії H_2S . Введення пропаргилгліцину достовірно збільшує, а NaHS зменшує вікові відмінності вазорелаксуючої дії H_2S у щурів.

Вивчення ролі системи H_2S /ЦГЛ в регуляції судинного тону в процесі старіння є перспективним напрямком подальших досліджень і дозволить ідентифікувати нові мішені, впливаючи на які можна підвищити ефективність лікування вік - асоціованої патології серцево-судинної системи.

Список літератури

- Кульчицкий О. К. Система оксиду азота та вік / О. К. Кульчицкий // Бук. мед. вісник. - 2005. - № 9 (2). - С. 143 - 144.
- Ольховський О. С. Вікові відмінності продукції гідроген сульфід в серці та аорті щурів / О. С. Ольховський, А. В. Мельник, Н. В. Заїчко // Актуальні проблеми сучасної медицини. - 2011. - Т. 11, № 4. - С. 133-137.
- Age-related increases in circulating inflammatory markers in men are independent of BMI, blood pressure and blood lipid concentrations / E. A. Miles, D. Rees, T. Banerjee [et al.] // Atherosclerosis. - 2008. - Vol. 196, № 1. - P. 298-305.
- Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs / B. Wilinski, J. Wilinski, E. Somogyi [et al.] // Folia Med. Cracov. - 2011. - Vol. 51, № 1 - 4. - P. 29 - 35.
- Imaging of the Vulnerable Carotid Plaque: Biological Targeting of Inflammation in Atherosclerosis using Iron Oxide Particles and MRI / J. M. Chan, C. Monaco, M. Wylezinska-Arridge [et al.] // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. - 2014. - Vol. 47, № 5. - P. 462 - 9.
- Increased plasma soluble adhesion molecules; ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin levels in patients with slow coronary flow / H. Turhan, G. S. Saydam, A. R. Erbay [et al.] // Int. J. Cardiol. - 2006. - Vol. 108, № 2. - P. 224 - 30.
- Kimura H. Hydrogen sulfide: its production and functions / H. Kimura // Exp. Physiol. - 2011. - № 9. - P. 833 - 835.
- Lowicka E. Hydrogen sulfide (H_2S) - the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacological Reports. - 2007. - P. 4 - 24.
- Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies / S. Taddei, L. Ghiadoni, A. Virdis [et al.] // Curr Pharm Des. - 2003. - № 9. - P. 2385 - 2402.
- Role of Hydrogen Sulfide and Sulfur-Containing Amino Acids in Regulation of Tone of Smooth Muscles of the Vascular Wall in Rats / A. V. Mel'nik, N. I. Voloshchouk, N. O. Pentyuk, K. O. Zaichko // Neurophysiology. - 2010. - № 2. - P. 126 - 131.

Мельник А.В., Заїчко Н.В., Паламарчук И.В.

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ ОБМЕНА ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ТОНУС АОРТЫ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Резюме. Изучено влияние модуляторов обмена гидроген сульфида (H_2S) - NaHS и пропаргилглицина на состояние аорты крыс трех возрастных групп - неполовозрелые (1 - 2 мес.), взрослые (6 - 8 мес.) и старые (24 - 26 мес.). Двухнедельное введение пропаргилглицина вызывает снижение (на 40 - 60%) активности H_2S - синтезирующих ферментов и содержания H_2S в аорте, в то время как введение NaHS повышает эти показатели. У старых и взрослых крыс под влиянием пропаргилглицина существенно повышается содержание маркера эндотелиальной дисфункции sVCAM в сыворотке крови. Пропаргилглицин снижает чувствительность аорты старых и, в меньшей степени, взрослых крыс к вазодилатирующему действию H_2S (в концентрациях 10^{-6} - 10^{-3} М), а введение NaHS, наоборот, способствует ее повышению. Введение модуляторов обмена H_2S существенно не влияет на функциональное состояние аорты у неполовозрелых крыс.

Ключевые слова: гидроген сульфид, пропаргилглицин, аорта, возраст.

Melnik A.V., Zaichko N.V., Palamarchuk I.V.

INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE METABOLISM MODULATORS ON BIOCHEMICAL INDICES AND TONE OF RAT'S AORTA IN DIFFERENT AGE GROUPS

Summary. It was investigated the influence of hydrogen sulfide (H_2S) metabolism modulators - NaHS and propargylglycine on biochemical indices and tone of rat's aorta in three age groups - immature (1 - 2 months), adult (6 - 8 months) and old (24 - 26 months). A two-week administration of propargylglycine caused a significant reduction (by 40-60 %) in H_2S -synthesizing enzymes activity and H_2S in aorta whereas the administration of NaHS increases these indices. Under the influence of propargylglycine endothelial dysfunction marker - sVCAM is significantly increased in serum of aged and adult rats. Propargylglycine reduces the sensitivity of adult rat's aorta and significantly decreases the sensitivity of old rat's aorta to H_2S vasodilation at concentrations of 10^{-6} - 10^{-3} М, but the administration of NaHS contributes to vasodilation improvement. Administration of H_2S metabolism modulators did not significantly affect the functional condition of the immature rats' aorta.

Key words: hydrogen sulfide, propargylglycine, aorta, aging.

Стаття надійшла до редакції 08.05.2014 р.

Заїчко Наталія Валентинівна - д. мед. н., доцент, завідувач кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38 0432 35-53-22;

Мельник Андрій Володимирович - к. мед. н., доцент кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38 0432 35-53-22;

Паламарчук Ірина Віталіївна - асистент кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38 0432 35-53-22