

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ПРОПАРГІЛГЛІЦИНУ ТА НАТРІЙ ГІДРОГЕНСУЛЬФІДУ НА ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ H_2S В МІОКАРДІ ЩУРІВ

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (м. Вінниця)

Дослідження проведено в рамках планової НДР «Обмін гомоцистеїну в умовах дії нутрієнтних чинників та при різних патологічних станах», № держ. реєстрації 0106V005134.

Вступ. Гідрогенсульфід (H_2S) – біологічно-активний метаболіт сірковмісних амінокислот, який причетний до регуляції судинного тонуусу, скоротливості міокарду, нейромодуляції, процесів запалення, апоптозу, агрегації тромбоцитів [21, 15]. H_2S активно синтезується в тканинах в реакціях десульфуровання цистеїну, гомоцистеїну та відновлення тіосульфат-аніону, які забезпечують три піридоксальфосфатзалежних ензими – цистатіонін- γ -ліаза (ЦГЛ), цистатіонін- β -синтаза (ЦБС), цистеїнамінотрансфераза (ЦАТ), а також 3-меркапт опіруватсульфуртрансфераза (3-МСТ) і тіосульфат-дитіолсульфідтрансфераза (ТСТ). Утилізація H_2S відбувається переважно в мітохондріях шляхом окиснення до тіосульфату (з наступним утворенням сульфідів та сульфатів) та частково в цитозолі шляхом метилювання до метантіолу та диметилсульфіду. В **табл. 1** наведені ключові ензиматичні реакції, які ведуть до утворення та утилізації H_2S .

Продукція H_2S в тканинах істотно змінюється при різних патологічних станах. Зниження вмісту H_2S в плазмі крові та інгібування його утворення в міокарді реєструвалось при спонтанній та L-NAME-індукованій гіпертензії [24, 18] та інфаркті міокарду [23] у щурів. Підвищення рівня H_2S в плазмі крові виявлялось при експериментальному сепсисі [25], ішемічному інсульті [16], хронічних обструктивних захворюваннях легень [13, 21]. Тому модуляція обміну H_2S шляхом застосування його донорів ($NaHS$, Na_2S), прекурсорів (цистеїну, полісульфідів) чи інгібіторів H_2S -синтезуючих ензимів (пропаргілгліцину, β -ціаноаланіну) відкриває новий напрямок корекції таких захворювань. Донори H_2S проявляють кардіо- та ангіопротекторну дію, зменшують ішемічно-реперфузійні пошкодження та оксидативний стрес при інфаркті міокарду, інтестинальній ішемії та ішемії нирок, в той час як інгібітори

H_2S -синтезуючих ензимів проявляють протилежний ефект [21]. Однак, за певних умов інгібітори H_2S -синтезуючих ензимів можуть проявляти цитопротекторну дію. Так, інгібітор ЦГЛ пропаргілгліцин пригнічував процеси пероксидації ліпідів та запалення при гентаміцин-індукованому ураженні нирок [20].

Раніше ми показали, що з віком у щурів знижується рівень H_2S в плазмі крові та пригнічується його продукція в серці та судинах [3]. Не виключено, що модулятори обміну H_2S можуть виявляти геропротекторний ефект.

Метою роботи було вивчення вікових особливостей впливу пропаргілгліцину та натрій гідрогенсульфід (NaHS) на показники обміну H_2S в міокарді щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведені на 90 білих нелінійних щурах-самцях (*Rattus norvegicus*) трьох вікових груп: статевонезрілі (1-2

Таблиця 1
Схеми ензиматичних реакцій утворення та утилізації H_2S в тканинах

Ензим	Схема реакції	Бібліографія
Утворення H_2S		
ЦГЛ КФ 4. 4. 1. 1	Цистеїн + $H_2O \rightarrow$ Піруват + $H_2S + NH_3$	[21, 22]
ЦБС КФ 4. 2. 1. 22	Гомоцистеїн + Цистеїн \rightarrow Цистатіонін + H_2S	[9, 21, 22]
ЦАТ КФ 2. 6. 1. 3	Цистеїн + α -Кетоглутарат \rightarrow 3-Меркаптопіруват + Глутамат 3-Меркаптопіруват + ... \rightarrow $H_2S + ...$	[21, 22]
3-МСТ КФ 2. 8. 1. 2	3-Меркаптопіруват + Ціанід \rightarrow $H_2S + ...$	[6]
ТСТ КФ 2. 8. 1. 5	$S_2O_3^{2-} + R(SH)_2 \rightarrow SO_3^{2-} + H_2S + RS_2$	[8, 2]
Утилізація H_2S		
Тіосульфат-ціанід-сульфуртрансфераза КФ 2. 8. 1. 1	$2HS^- + 2O_2 \rightarrow S_2O_3^{2-} + H_2O$ $S_2O_3^{2-} + CN^- \rightarrow SCN^- + SO_3^{2-}$	[21, 22]
Сульфітоксидаза КФ 1. 8. 3. 1	$SO_3^{2-} + Fe(III)\text{цитохром c} \rightarrow SO_4^{2-} + Fe(II)\text{цитохром c}$	[21, 22]
Тіол-S-метил-трансфераза КФ 2. 1. 1. 9	$H_2S \rightarrow CH_3-SH \rightarrow CH_3-S-CH_3$	[21, 22]

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 проведені 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 щоденно 1 раз на добу інтраперітонеально протягом 14 дб. Щурам 1-х підгруп (контроль) інтраперітонеально вводили 0,15 М розчин NaCl. Через 24 години після останнього введення речовин тварин знеживлювали методом цервікальної дислокації.

Вміст H₂S в міокарді визначали за методикою описаною в [7]. Міокард промивали холодним 1,15% розчином KCl, подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50% ТХО, центрифугували при 1200 г 15 хв., в супернатанті визначали вміст H₂S за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності FeCl₃. Всі маніпуляції проводили у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для попередження втрат H₂S). Вміст сульфід-аніону в пробі розраховували за калібрувальним графіком. Стандартом слугували водні розчини Na₂S x 9H₂O (Sigma, США) з концентрацією 31,2-3120 мкМ.

Для інших досліджень міокард гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (рН 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло), центрифугували 30 хв при 600 г при температурі 4-6°C, відбирали аліквати постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20°C. Активність H₂S-синтезуючих ензимів – цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3), тиосульфатдитіолсульфід-трансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5) в постядерному супернатанті міокарду оцінювали в адаптованих нами інкубаційних

середовищах за приростом сульфід-аніону [3, 4]. Інкубаційне середовище для визначення активності ЦГЛ містило L-цистеїн 6,0 мМ, піридоксальфосфат 1,34 мМ, Трис-буфер 0,08 М (рН 8,5); ЦАТ – L-цистеїн 6,0 мМ, α-кетоглутарат 1,6 мМ, піридоксальфосфат 1,34 мМ, Трис-буфер 0,08 М (рН 8,5); ТСТ – тиосульфат натрію 0,2 мМ, дитіотреїтол 2,3 мМ, Трис-буфер 0,09 М (рН 8,5). До 0,5 мл інкубаційного середовища додавали 0,1 мл постядерного супернатанту міокарду, інкубували 60 хв. при 37°C. Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, додавали 1% розчин ацетату цинку для зв'язування утвореного H₂S. В контрольні проби обробляли як дослідні за винятком того, що досліджуваний матеріал вносили в середовище після інкубації та охолодження.

Здатність міокарду до утилізації екзогенного H₂S визначали за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніону в інкубаційному середовищі. До 1,0 мл інкубаційного середовища, що містило донор H₂S – 312 мкМ Na₂S, 0,47 мМ Трис-буфер (рН 7,4) додавали 0,1 мл постядерного супернатанту міокарду (кількість протеїну – 1-2 мг), інкубували 30 хв. при 37°C. Контрольні проби інкубували без гомогенату, який додавали після зупинки реакції. Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, додавали 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку, і визначали кількість сульфід-аніону як описано раніше.

Активність сульфітоксидази (КФ 1.8.3.1) визначали за швидкістю окиснення сульфід-аніону в присутності гексоціаноферрату калію [10]. Вміст протеїну визначали мікробиуретовим методом [1]. Активність аспартатамінотрансферази та креатинфосфокінази визначали за наборами ТОВ Філісіт-Діагностика, СпайнЛаб (Україна). Статистичний аналіз проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали дані за p < 0,05. Результати наведено як M ± m.

Результати досліджень та їх обговорення.
Встановлено, що з віком швидкість утворення H₂S

Таблиця 2

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на активність H₂S-синтезуючих ензимів в міокарді 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	0,324 ± 0,018	1,07 ± 0,04	1,83 ± 0,08
		Пропаргілгліцин	0,161 ± 0,016*	1,08 ± 0,06	1,74 ± 0,07
		NaHS	0,303 ± 0,011	1,19 ± 0,07	1,98 ± 0,07
2	Дорослі, 6-8 міс.	Контроль	0,217 ± 0,009#	0,706 ± 0,048#	1,25 ± 0,05#
		Пропаргілгліцин	0,083 ± 0,010*	0,684 ± 0,039	1,15 ± 0,02
		NaHS	0,208 ± 0,010	0,689 ± 0,031	1,29 ± 0,09
3	Старі, 24-26 міс.	Контроль	0,189 ± 0,006#§	0,551 ± 0,011#§	1,13 ± 0,03#§
		Пропаргілгліцин	0,041 ± 0,006*	0,559 ± 0,033	1,03 ± 0,04
		NaHS	0,176 ± 0,012	0,527 ± 0,023	1,20 ± 0,05

Примітка: * – p < 0,05 відносно контролю у відповідній групі; # – p < 0,05 відносно статевонезрілих щурів; § – p < 0,05 відносно дорослих щурів.

Таблиця 3
Вплив пропаргілгліцину та NaHS на активність сульфатоксидази та швидкість утилізації екзогенного H₂S в міокарді щурів різного віку (M ± m, n = 10)

Групи щурів		Умови дослідження	Сульфатоксидаза, нмоль / хв·мг протеїну	Швидкість утилізації H ₂ S, нмоль / хв·мг протеїну
1	Статевонезрілі, 1-2 міс.	Контроль	5,10±0,32	0,730±0,045
		Пропаргілгліцин	4,62±0,17	0,723±0,034
		NaHS	5,35±0,23	0,738±0,034
2	Дорослі, 6-8 міс.	Контроль	4,92±0,47	0,696±0,031
		Пропаргілгліцин	4,05±0,20	0,687±0,026
		NaHS	5,13±0,21	0,713±0,039
3	Старі, 24-26 міс.	Контроль	3,74±0,24 [#]	0,614±0,020 [#]
		Пропаргілгліцин	3,03±0,15 [*]	0,640±0,018
		NaHS	4,45±0,23 [*]	0,647±0,015

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю у відповідній групі; # – p<0,05 відносно статевонезрілих щурів; § – p<0,05 відносно дорослих щурів.

в міокарді щурів істотно зменшується. Так, активність H₂S-синтезуючих ензимів – ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ в міокарді у старих щурів є меншою на 40-50%, ніж у статевонезрілих тварин, та на 30-35% меншою, ніж у дорослих щурів (**табл. 2**). Введення пропаргілгліцину викликало достовірне зниження активності ЦГЛ і не викликало суттєвих змін активності інших H₂S-синтезуючих ензимів в міокарді щурів всіх вікових груп. При цьому депримуєчий ефект пропаргілгліцину на активність ЦГЛ виявився найбільшим у старих щурів. Так, активність ЦГЛ в підгрупах «пропаргілгліцин» у тварин віком 24-26 міс., 6-8 міс. та 1-2 міс. була на 78,3; 61,8 та 50,3% меншою, ніж у відповідних групах контролю. Двотижневе введення

NaHS не викликало достовірних змін активності H₂S-синтезуючих ензимів в міокарді щурів всіх вікових груп.

Результати наших досліджень показали, що в процесі старіння зменшується ефективність утилізації H₂S в міокарді (**табл. 3**). Зокрема, активність сульфатоксидази у старих щурів виявилась меншою на 24,0 та 26,6%, а швидкість утилізації екзогенного H₂S – на 11,8 та 15,8% ніж у дорослих та статевонезрілих тварин, відповідно. Зауважимо, що показники утилізації H₂S у дорослих та статевонезрілих щурів суттєво не відрізнялись. Введення модуляторів обміну H₂S вірогідно не впливало на показники деградації H₂S у статевонезрілих та дорослих щурів, на відміну від старих тварин. Зокрема, активність сульфатоксидази у старих щурів в підгрупі «пропаргілгліцин» була меншою (на 18,9%), а в підгрупі «NaHS» – вищою (на 19,0%), ніж в підгрупі контролю.

Вік-асоційовані зміни у шляхах утворення та утилізації H₂S в міокарді асоціювались зі зменшенням вмісту цього метаболіту в тканинах серця та сироватці крові. Так, вміст H₂S в міокарді у старих щурів виявився на 12,6 та 23,3% нижчим, ніж у дорослих та статевонезрілих щурів (**табл. 4**). Двотижневе введення пропаргілгліцину (інгібітору H₂S-синтезуючого ензиму ЦГЛ) викликало достовірне зниження, а NaHS (донору H₂S) – підвищення вмісту H₂S в міокарді щурів всіх вікових груп, однак найбільший ефект реєструвався у старих тварин. Зокрема, рівень H₂S в міокарді у щурів віком 24-26 міс., 6-8 міс. та 1-2 міс.

Таблиця 4
Вплив пропаргілгліцину та NaHS на вміст H₂S в міокарді та сироватці крові, активність аспаратамінотрансферази (АсАТ) та креатинфосфокінази (КФК) в сироватці крові у щурів різного віку (M ± m, n = 10)

Групи щурів	Умови дослідження	Вміст H ₂ S в міокарді, мкг/г вологої тканини	Сироватка крові			
			Вміст H ₂ S, мкмоль/л	Активність АсАТ, мкмоль/хв. ·л	Активність КФК, Од. /л	
1	Статевонезрілі, 1-2 міс.	Контроль	8,41±0,23	86,1±2,41	36,1±0,63	80,9±3,85
		Пропаргілгліцин	7,23±0,25 [*]	71,0±1,88 [*]	36,5±0,92	87,9±2,69
		NaHS	9,32±0,33 [*]	92,3±1,57 [*]	35,4±0,79	81,3±3,43
2	Дорослі, 6-8 міс.	Контроль	7,38±0,28 [#]	80,2±2,97	35,9±0,63	78,8±5,36
		Пропаргілгліцин	5,73±0,19 [*]	60,3±2,85 [*]	39,1±1,70	92,9±4,85
		NaHS	8,60±0,30 [*]	90,6±2,10 [*]	34,9±0,75	82,1±2,08
3	Старі, 24-26 міс.	Контроль	6,45±0,19 [#]	69,6±2,12 [#]	37,4±1,28	83,0±5,45
		Пропаргілгліцин	4,31±0,24 [*]	46,2±1,69 [*]	48,5±1,76 [*]	119±5,96 [*]
		NaHS	9,84±0,23 [*]	85,5±1,44 [*]	35,4±0,79	87,1±2,17

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю у відповідній групі; # – p<0,05 відносно статевонезрілих щурів; § – p<0,05 відносно дорослих щурів.

в групах «пропаргілгліцин» був на 33,2; 22,3 та 14,0 % меншим, а в групах «NaHS» – на 52,6; 16,5 та 10,8 % вищим, ніж у відповідних групах контролю. Між вмістом H_2S в сироватці крові та міокарді виявлявся достовірний кореляційний зв'язок, який посилювався з віком ($r = 0,73; 0,78; 0,86, p < 0,05$, в групах статевонезрілих, дорослих та старих щурів).

Виявилось, що введення пропаргілгліцину проявляло кардіотоксичний вплив на міокард переважно старих тварин. Про це свідчить достовірне зростання активності аспартатамінотрансферази (на 29,7%) та креатинфосфокінази (на 43,4%) в сироватці крові у щурів віком 24-26 міс., в той час як у щурів віком 6-8 міс. активність цих ензимів зростала на рівні тенденції, а у статевонезрілих щурів практично не змінювалась. Введення NaHS не викликало змін активності аспартатамінотрансферази та креатинфосфокінази в сироватці крові у тварин всіх вікових груп. Кореляційний аналіз засвідчив, що у старих тварин вміст H_2S в міокарді обернено корелює з активністю аспартатамінотрансферази та креатинфосфокінази в сироватці крові ($r = -0,55; -0,71, p < 0,05$) і сила зв'язку посилюється за умов введення пропаргілгліцину ($r = -0,76; -0,83, p < 0,05$). В то же час, асоціація вмісту H_2S в міокарді із активністю вказаних ензимів у статевонезрілих та дорослих тварин є менш тісною ($r < 0,40$).

Таким чином, в процесі старіння формується дефіцит ендogenous H_2S в міокарді, що асоціюється зі зниженням активності H_2S -синтезуючих ензимів та пригніченням шляхів утилізації H_2S . З віком роль ЦГЛ як продуцента H_2S в міокарді зростає, на що вказує більш суттєве падіння рівня цього метаболіту в міокарді, індуковане пропаргілгліцином, саме у старих тварин. Введення NaHS ефективно відновлює дефіцит H_2S в міокарді старих щурів, однак нормалізації ендogenous продукції цього метаболіту не викликає. Пропаргілгліцин та NaHS менш суттєво впливають на показники обміну H_2S в міокарді дорослих і, особливо, статевонезрілих щурів. Тривале пригнічення продукції H_2S в міокарді старих тварин, індуковане пропаргілгліцином, супроводжується пошкодженням кардіоміоцитів, про що свідчить зростання маркерних ензимів – аспартатамінотрансферази та креатинфосфокінази.

Зниження продукції H_2S в міокарді може бути чинником формування вік-асоційованої кардіальної дисфункції. Адже H_2S залучений до регуляції скоротливості міокарду і викликає дозозалежне відкриття K^+ATP -каналів передсердних та шлуночкових кардіоміоцитів [18]. Тривале введення донорів H_2S попереджає формування дисфункції лівого шлуночка, зменшує ремоделювання серця та стримує розвиток серцевої недостатності у мишей після інфаркту міокарду [17], зменшує апоптоз та фіброз в серці мишей з хронічною серцевою недостатністю [14].

Екзогенний H_2S (NaHS) інгібує апоптоз кардіоміоцитів, зменшує експресію Fas та FasL, знижує активність каспази-3, активує білок-репресор апоптозу ARC, в той час як пропаргілгліцин проявляє протилежний ефект [19].

Існування вікових відмінностей чутливості міокарду до дії H_2S та модуляторів його обміну підтверджують результати інших досліджень. В досліджах *in vitro* показано, що NaHS пригнічує кальційіндуковане відкриття мітохондріальних пор в міокарді дорослих щурів у діапазоні концентрацій 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, а у старих щурів – тільки в концентрації 10^{-5} моль/л [5]. Здатність H_2S у фізіологічних концентраціях стабілізувати мітохондрії, очевидно, може пояснювати відновлення активності мітохондріального ензиму сульфітоксидази в міокарді старих щурів під впливом NaHS. В цілому, зниження активності сульфітоксидази в міокарді з віком також може мати негативні наслідки. Доведено, що недостатність цього ензиму в клітинах веде до накопичення токсичного сульфід-аніону, промотує розвиток оксидативного стресу [11] та знижує чутливість судин до дії вазодилаторів [12].

Висновки.

1. В процесі старіння в міокарді щурів достовірно знижується (на 30-50%) вміст H_2S та активність H_2S -синтезуючих ензимів (цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази, тіосульфатдитіолсульфід-трансферази), а також зменшується швидкість деградації екзогенного H_2S (на 10-15%) та активність сульфітоксидази (на 24-27%).

2. Введення пропаргілгліцину викликає зниження (на 15-40%) вмісту H_2S в сироватці крові та міокарді, зменшення активності ЦГЛ (на 50-80%) в міокарді у щурів всіх вікових груп. Депримує ефект пропаргілгліцину на обмін H_2S в міокарді є найбільшим у щурів віком 24-26 міс. і асоціюється із зростанням активності аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази в сироватці крові.

3. Введення NaHS достовірно відновлює дефіцит H_2S в міокарді старих щурів і помірно підвищує його рівень у дорослих та статевонезрілих щурів, але не змінює активність H_2S -синтезуючих ензимів. Введення NaHS підвищує активність сульфітоксидази у щурів віком 24-26 міс. і не впливає на показники утилізації H_2S в міокарді у дорослих та статевонезрілих щурів.

Перспективи подальших досліджень. Отже, роль системи H_2S /ЦГЛ в регуляції стану міокарду зростає в процесі старіння і корекція вік-асоційованих зрушень в обміні H_2S відкриває нові перспективи для кардіоваскулярної геропротекції. Тому, напрямок наших подальших досліджень є вивчення впливу модуляторів обміну H_2S на серцево-судинну систему щурів різного віку та пошук препарату, який би сприяв нормалізації обміну H_2S з віком.

Література

1. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
2. Мельник А. В. Активність ензимів синтезу гідроген сульфід у нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // Укр. біохім. журнал. – 2009. – № 4. – С. 12-22.
3. Ольховський О. С. Вікові відмінності продукції гідроген сульфід у серці та аорті щурів / О. С. Ольховський, А. В. Мельник, Н. В. Заїчко // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2011. – Т. 11, № 4. – С. 133 – 137.

4. Пат. України на корисну модель № 75683 UA МПК (2012) G01N 30/22 Спосіб визначення H₂S-продукуючої активності міокарда тварин / Заїчко Н. В., Мельник А. В., Ольховський О. С., Заїчко К. О.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М. І. Пирогова. – № u2012 06388; заявл. 28. 05. 2012; опубл. 10. 12. 2012; Бюл. № 23.
5. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів / Н. А. Струтинська, О. М. Семенихіна., С. В. Чорна [та ін.] / Фізіол. журн. – 2011. – № 57, № 6. – С. 3 – 14.
6. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain / N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – Vol. 11, № 4. – P. 703-14.
7. Atorvastatin affects the hydrogen sulphide tissue concentration in mouse kidneys and other organs / B. Wilicski, J. Wilicski, E. Somogyi [et al.] // *Pharmacol Rep.* – 2011. – Vol. 63. – P. 184 – 188.
8. Cadmium, lead, and zinc removal by expression of the thiosulfate reductase gene from *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli* / S. W. Bang, D. S. Clark, J. D. Keasling // *Biotechnol. Lett.* – 2000. – Vol. 22. – P. 1331-1335.
9. Chen X. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine-β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine / X. Chen, K. -H. Jhee, W. D. Kruger // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2004. – Vol. 279, № 50. – P. 52082-52086.
10. Cohen H. J. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties / H. J. Cohen, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1971. – Vol. 246, № 2. – P. 359-366.
11. Effect of sulfite on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in normal and sulfite oxidase-deficient rat erythrocytes / O. H. Ozturk, S. Oktar, M. Aydin [et al.] // *J. Physiol Biochem.* – 2010. – Vol. 66, № 3. – P. 205 – 212.
12. Effects of sulphite supplementation on vascular responsiveness in sulphite oxidase-deficient rats / C. Nacitarhan, V. Kucukatay, G. Sadan [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2008. – Vol. 35, № 3. – P. 268-272.
13. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD / Y. H. Chen, W. Z. Yao, B. Geng [et al.] // *Chest.* – 2005. – Vol. 128, № 5. – P. 3205 – 3211.
14. H₂S ameliorates oxidative and proteolytic stresses and protects the heart against adverse remodeling in chronic heart failure / P. K. Mishra, N Tyagi., U. Sen [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 298, № 2. – P. 451-456.
15. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydrylation / Nishida M., Sawa T., Kitajima N., [et al.] // *Nat Chem Biol.* – 2012. – 8, № 8. – P. 714-724.
16. Hydrogen Sulfide Is a Mediator of Cerebral Ischemic Damage / Qu Kun, P. L. H. Chen Christopher, Halliwell Barry [et al.] // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37. – P. 889 – 893.
17. Hydrogen sulfide mitigates cardiac remodeling during myocardial infarction via improvement of angiogenesis / N. Qipshidze, N. Metreveli, P. K. Mishra [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, № 4. – P. 430-441.
18. Hydrogen sulfide opens the KATP channel on rat atrial and ventricular myocytes / G. Z. Zhong, Y. B. Li, X. L. Liu [et al.] // *Cardiology.* – 2010. – Vol. 115, № 2. – P. 120-126.
19. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing phosphorylation of apoptosis repressor with caspase recruitment domain / X. Yao, G. Tan, C. He [et al.] // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2012. – Vol. 226, № 4. – P. 275-285.
20. Inhibition of cystathionine gamma-lyase and the biosynthesis of endogenous hydrogen sulphide ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity / V. P. Dam, J. L. Scott, A. Ross A., R. T. Kinobe // *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 15, № 685. – P. 165 – 173.
21. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // *Pharmacological Reports.* – 2007. – Vol. 59. – P. 4-24.
22. Stipanuk M. H. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratase in liver and kidney of the rat / M. H. Stipanuk, P. W. Beck // *Biochem. J.* – 1982. – Vol. 206, № 2. – P. 267-277.
23. The cardioprotective potential of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury (review) / E. Dongy, I. Hornybk, Z. Benko, L. Kiss // *Acta Physiol Hung.* – 2011. – Vol. 98, № 4. – P. 369 – 81.
24. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase / G. Zhong, F. Chen, Y. Cheng [et al.] // *J. Hypertens.* – 2003. – Vol. 21. – P. 1879 – 1885.
25. Zhang H. Endogenous hydrogen sulfide regulates inflammatory response by activating the ERK pathway in polymicrobial sepsis / Huili Zhang, Shabbir M. Moomchhala, Madhav Bhatia // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 4320 – 4331.

УДК 546. 221. 1:599. 323. 4:611. 127

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ПРОПАРГІЛГЛІЦИНУ ТА НАТРІЙ ГІДРОГЕНСУЛЬФІДУ НА ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ H₂S В МІОКАРДІ ЩУРІВ

Заїчко Н. В., Йолтухівський М. М., Ольховський О. С., Паламарчук І. В.

Резюме. Досліджено вплив інгібітору H₂S-синтезуючого ензиму цистатіонін-γ-ліази пропаргілгліцину та донору H₂S – натрій гідрогенсульфіду (NaHS) на показники обміну H₂S в міокарді щурів трьох вікових груп: 1-2 міс. (статевонезрілі), 6-8 міс. (дорослі), 24-26 міс. (старі). Встановлено, що 14-добове введення пропаргілгліцину (50 мг/кг і. п.) викликало достовірне зниження вмісту H₂S (на 15-40%) та активності цистатіонін-γ-ліази (на 50-80%) в міокарді щурів всіх вікових груп, але найбільші зміни виявлялись у щурів віком 24-26 міс. Введення NaHS (3 мг/кг і. п.) достовірно відновлювало дефіцит H₂S в міокарді старих щурів та помірно підвищувало його рівень у дорослих та статевонезрілих щурів, при цьому активність H₂S-синтезуючих ензимів в міокарді не змінювалась. У старих щурів зменшувалась швидкість деградації H₂S (на 10-15%) та активність сульфітоксидази (на 24-27%) в міокарді порівняно з тваринами віком 1-2 міс. та 6-8 міс. При введенні NaHS активність сульфітоксидази в міокарді старих щурів відновлювалась. Таким чином, в процесі старіння формується дисбаланс в шляхах обміну H₂S в міокарді і введення донорів H₂S зменшує його виразність.

Ключові слова: гідрогенсульфід, вік, міокард, пропаргілгліцин, NaHS.

УДК 546. 221. 1:599. 323. 4:611. 127

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА И НАТРИЙ ГИДРОГЕНСУЛЬФИДА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА H₂S В МИОКАРДЕ КРЫС

Заичко Н. В., Йолтуховский Н. М., **Ольховський О. С.,** Паламарчук И. В.

Резюме. Исследовано влияние ингибитора H₂S-синтезирующего фермента цистатионин-γ-лиазы пропаргилглицина и донора H₂S – натрий гидрогенсульфида (NaHS) на показатели обмена H₂S в миокарде крыс трех возрастных групп: 1-2 мес. (неполовозрелые), 6-8 мес. (взрослые), 24-26 мес. (старые). Установлено, что 14-суточное введение пропаргилглицина (50 мг/кг и. п.) вызвало достоверное снижение содержания H₂S (на 15-40%) и активности цистатионин-γ-лиазы (на 50-80%) в миокарде крыс всех возрастных групп, но наибольшие изменения выявлялись у крыс в возрасте 24-26 мес. Введение NaHS (3 мг/кг и. п.) достоверно восстанавливало дефицит H₂S в миокарде старых крыс и умеренно повышало его уровень у взрослых и неполовозрелых крыс, при этом активность H₂S-синтезирующих ферментов в миокарде не изменялось. У старых крыс уменьшалась скорость деградации H₂S (на 10-15%) и активность сульфитоксидазы (на 24-27%) в миокарде по сравнению с животными в возрасте 1-2 мес. и 6-8 мес. При введении NaHS активность сульфитоксидазы в миокарде старых крыс восстанавливалась. Таким образом, в процессе старения формируется дисбаланс в обмене H₂S в миокарде и введение доноров H₂S уменьшает его выразительность.

Ключевые слова: гидрогенсульфид, возраст, миокард, пропаргилглицин, NaHS.

UDC 546. 221. 1:599. 323. 4:611. 127

Propargylglycine and Sodium Hydrogen Sulfide Age-Related Influence on Indices of Rats' Myocardium H₂S Metabolism

Zaichko N. V., Yoltukhivskiy M. M., **Olhovskiy A. S.,** Palamarchuk I. V.

Abstract. Hydrogen sulfide (H₂S) is a biologically active metabolite of sulfur-containing amino acid that is involved in the regulation of vascular tone, myocardial contractility, neuromodulation, inflammation, apoptosis and platelet aggregation. H₂S is actively synthesized in tissues by desulfuration. Its production in tissues varies significantly under various pathological conditions. Previously, we have mentioned that H₂S levels decrease in plasma of rats within aging period as well as H₂S production is inhibited in heart and blood vessels. It is possible that modulators of metabolism of H₂S can demonstrate geroprotective effect.

The aim of this study was to investigate the age-related impact of cystathionine-γ-lyase inhibitor – propargylglycine and H₂S-donor – sodium hydrosulfide (NaHS) on indice of rats' myocardium H₂S metabolism.

The influence of propargylglycine and NaHS on three age groups of rats: 1-2 months (immature), 6-8 months (adults), 24-26 months (aged) was investigated. The levels of H₂S in the myocardium was researched with the help of the method described by Wilinski (2011). The activity of H₂S-synthesizing enzymes – cystathionine-γ-lyase (CSE, 4. 4. 1. 1), cysteine aminotransferase (CAT, 2. 6. 1. 3), thiosulfate sulfurtransferase (TST, 2. 8. 1. 5) in myocardium homogenates was evaluated in adapted incubation medium by growth of sulfide anion. The ability of myocardium to utilize exogenous H₂S was determined by the speed of sulfide anion's lowering concentration in the incubation medium. The activity of sulfite oxidase, aspartate aminotransferase and creatine phosphokinase were determined by generally known methods.

A two-week administration of propargylglycine (50 mg/kg i. p.) caused a significant reduction in H₂S level (by 15-40%) and cystathionine-γ-lyase activity (by 50-80%) in myocardium of all age groups but the greatest changes were detected among rats of 24-26 months old. The administration of NaHS (3 mg/kg i. p.) significantly restored the deficit of H₂S in the myocardium of aged rats and moderately increased the level of H₂S among adult and immature rats, while the activity of H₂S-synthesizing enzymes in myocardium did not change. The rate of H₂S degradation (by 10-15%) and sulfite oxidase activity (by 24-27%) in myocardium of aged rats decreased in comparison with immature and adult rats. The administration of NaHS restored sulfite oxidase activity of aged rats' myocardium.

Our results demonstrate that deficiency of endogenous H₂S develops with age and this phenomenon is associated with the decreased activity of H₂S-synthesizing enzymes and depression of H₂S utilization pathways in the rats' myocardium. The administration of NaHS effectively restores H₂S deficiency in the myocardium of old rats, but it does not cause the normalization of endogenous production of this metabolite. Propargylglycine and NaHS effect H₂S metabolism less significantly in the myocardium of adult and especially immature rats. Prolonged inhibition of H₂S production in myocardium of aged animals induced by propargylglycine is accompanied by cardiomyocytes damage, the growth of marker enzymes – aspartate aminotransferase and creatine phosphokinase is a proof of this activity.

Thus, the role of H₂S/CSE-system in myocardium increases with age and further research of geroprotective effects of H₂S donors reveals new perspectives of cardiovascular system's age-related changes corrections.

Key words: Hydrogen sulfide, age, myocardium, propargylglycine, NaHS.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 8. 11. 2013 р.