

Н. В. Заичко, П. А. Юрченко, Д. А. Фильчуков

**УРОВЕНЬ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА И СОСТОЯНИЕ
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В МОЗГЕ КРЫС
ПРИ ИЗОЛИРОВАННОЙ ГИПЕРГОМОЦИТЕМИИ
И ЕЕ КОРРЕКЦИИ**

*Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова,
Украина, Винница*

Оригинальные научные публикации

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) ассоциируется с нейроваскулярными и нейродегенеративными заболеваниями. Утилизация гомоцистеина в головном мозге связана с синтезом H_2S – нейромодулятора, вазодиллятора, цитопротектора. Целью работы было установить влияние изолированной ГГЦ на уровень H_2S и показатели про- / антиоксидантной систем в мозге крыс в условиях коррекции витаминами B_6 , B_9 , B_{12} и эсмином. 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 энзимов в мозге крыс с ГГЦ.

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

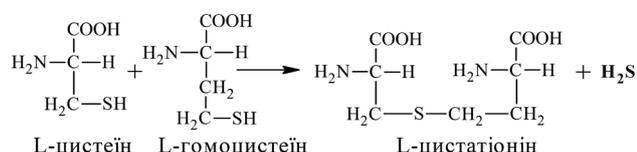
N. V. Zaichko, P. A. Yurchenko, D. A. Filchukov

THE LEVEL OF HYDROGEN SULPHIDE AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN RAT BRAIN IN ISOLATED HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND ITS CORRECTION

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 an isolated HHC level H_2S and indicators pro- / antioxidant systems in the rats brain under correction with vitamins B_6 , B_9 , B_{12} and 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, minerals, Esmin, brain.

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) часто ассоциируется с нейроваскулярными и нейродегенеративными заболеваниями – болезнью Альцгеймера, сосудистой деменцией, субкортикальной микроангиопатией, периферической нейропатией, когнитивными нарушениями [9; 11]. В процессе утилизации гомоцистеина в тканях мозга (гиппокампе, мозжечке, коре, стволе мозга) синтезируется биологически-активный метаболит – гидроген сульфид (H_2S). H_2S является газотрансмиттером (наряду с NO и CO) и принимает участие в регуляции сосудистого тонуса, нейромодуляции, цитопротекции, апоптозе [10]. Ключевым источником H_2S в мозге является реакция конденсации L-гомоцистеина с L-цистеином, катализируемая пиридоксальфосфатзависимым энзимом цистатионин- β -синтазой [10]:



Роль системы H_2S в механизмах нейротоксического действия ГГЦ остается неизученной. С целью коррекции ГГЦ наиболее часто используют витамины группы В (фолат, кобаламин, пиридоксин) и их сочетание с микроэлементами, необходимыми для обмена метионина и гомоцистеина [1; 6]. Целью работы было изучить влияние изолированной ГГЦ на систему H_2S и ее связь с про-/антиоксидантной системой головного мозга крыс в условиях коррекции витаминами B_6 , B_9 , B_{12} и эсмином. Эсмин – композиция полиядерных комплексов микроэлементов (Fe, Cu, Zn, Co, Mn, Cr) с N-2,3-диметилфенилантраниловой кислотой и кислородсодержащих солей V, Mo, Se [2; 3].

Материалы и методы

Исследования проведены на 50 белых лабораторных крысах-самцах массой 250–270 г. Животные находились в стандартных условиях виварию с естественным световым режимом день/ночь, воду и сбалансированный по всем макро- и микронутриентам корм получали ad libitum. Исследования проведены в соответствии с этическими принципами экспериментов на животных, утвержденных Первым национальным конгрессом Украины по биоэтике (Киев, 2001), «Европейской конвенции про защиту позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Страсбург, 1986).

Животных случайным образом распределяли на группы, по 10 особей в каждой. Изолированную ГГЦ ($n = 40$) моделировали путем внутрижелудочного введения тиолактона D, L-гомоцистеина (Sigma, США) в дозе 100 мг/кг массы на 1% крохмальном геле на протяжении 28 суток. Три группы крыс с целью коррекции ГГЦ с первого дня эксперимента получали: витамины B_6 , B_9 , B_{12} (714; 143; 14,3 мкг /кг массы); микроэлементный комплекс эсмин (АТ «Київський вітамінний завод») 35 мг/кг массы в сутки; сочетание витаминов B_6 , B_9 , B_{12} и эсмина. Такое соотношение суточных доз витаминов B_6 , B_9 , B_{12} обеспечивает максимальный гипогомоцистеинемический эффект, не является токсичным и не стимулирует рост животных [1]. Крысам контрольных групп вводили эквивалентные объемы 1% крахмального геля. Умерщвляли крыс путем декапитации под пропофоловым наркозом (60 мг/кг внутривенно).

Уровень H_2S в головном мозге определяли как описано [8]. Мозг промывали холодным 1,15% раствором KCl, навеску ткани гомогенизировали 1–2 мин. в среде 0,01 M NaOH в соотношении 1:5 (масса/объем) при 3000 об/мин (тефлон-стекло). К 1 мл гомогената добавляли 250 мкл

50% трихлоруксусной кислоты, центрифугировали при 1200 g 15 мин, в супернатанте определяли содержание H₂S по реакции с N, N-диметил-пара-фенилендиаминном в присутствии FeCl₃. Для предупреждения потерь H₂S манипуляции проводили в стерильных герметизированных пластиковых пробирках.

Для других исследований мозг гомогенизировали 1–2 мин. в 1,15% раствора KCl в соотношении 1:4 (масса/объем) при 3000 об/мин (тефлон-стекло). Центрифугировали 30 мин при 600 g при 4 °С, отбирали аликвоты постядерного супернатанта в микропробирки Eppendorf и до проведения исследований сохраняли при –20 °С. Активность цистатионин-β-синтазы (КФ 4.2.1.22) определяли в инкубационной среде (пиридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистеин 3,3 мМ, D, L-гомоцистеин 3,3 мМ, Трис-буфер 0,083 М рН 8,5 в конечных концентрациях) по простоте H₂S как описано [7]. Активность NADPH-оксидазы (КФ 1.6.3.1) определяли по поглощению NADPH при 340 нм, тиоредоксинредуктазы (КФ 1.8.1.9) – по скорости NADPH-зависимого восстановления 5,5'-дителибис(2-нитробензоата), супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) – по ингибированию окисления кверцетина [2]. Активность глутаматцистеинлигазы (КФ 6.3.2.2) определяли спектрофотометрическим методом [12]. Уровень глутатиона определяли в депротеинизированном трихлорацетатном экстракте тканей мозга по реакции с 5,5'-дителибис(2-нитробензоатом). Уровень белка определяли микробиуретовым методом [4].

Уровень гомоцистеина в сыворотке крови определяли методом ИФА по набору «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англия). Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента, корреляционный анализ проводили по Пирсону. Достоверными считали данные при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Введение тиолактона гомоцистеина вызвало повышение базального уровня этой аминокислоты в сыворотке крови на 154% через 28 суток (табл. 1). Развитие ГГЦ ассоциировалось со снижением уровня H₂S (на 53%) и активности цистатионин-β-синтазы (на 34,1%) в мозге крыс. Введение витаминов B₆, B₉, B₁₂, эсмина и, особенно, их комбинации достоверно сдерживало формирова-

ние ГГЦ и предотвращало развитие нарушений в системе H₂S / цистатионин-β-синтаза в мозге. Так, у крыс в группах «ГГЦ + вит. B₆, B₉, B₁₂», «ГГЦ + эсмин» и «ГГЦ + вит. B₆, B₉, B₁₂ + эсмин» сывороточный уровень гомоцистеина был ниже на 27,4; 12,5 и 41,5%, а уровень H₂S в мозге – выше на 43,5; 17,7 та 95,2%, чем у крыс с ГГЦ. Активность цистатионин-β-синтазы в мозге была достоверно выше (на 25,7 и 47,4%) в группах «ГГЦ + вит. B₆, B₉, B₁₂» и «ГГЦ + вит. B₆, B₉, B₁₂ + эсмин», чем у крыс с ГГЦ.

Длительное введение тиолактона гомоцистеина вызвало повышение активности ключевого продуцента супероксид-аниона – NADPH-оксидазы (на 76,0%); снижение активности СОД и тиоредоксинредуктазы (на 38,6 и 53,3%); ингибирование активности глутаматцистеинлигазы и снижение уровня восстановленного глутатиона (на 48,2 и 50,3%) в мозге крыс (табл. 2). Комбинация витаминов B₆, B₉, B₁₂ с эсмином наиболее эффективно предупреждала развитие дисбаланса прооксидантной / антиоксидантной систем в условиях изолированной ГГЦ.

В основе негативного влияния ГГЦ на систему H₂S в мозге могут лежать различные механизмы. Активность цистатионин-β-синтазы зависит от уровня аллостерического активатора S-аденозилметионина [10], синтез которого снижается при ГГЦ [6]. При ГГЦ не исключается субстратное ингибирование десульфуразной активности цистатионин-β-синтазы [5]. При ГГЦ может усиливаться деградация H₂S при взаимодействии с активными формами кислорода и азота, липидными дериватами. H₂S вступает в реакции сульфидирования с низкомолекулярными тиолами и протеинами, образует в реакционно-способные персульфиды и тиольные радикалы [13]. H₂S является активатором цистин-глутаматных антипортеров и глутаматцистеинлигазы [14] и снижение его уровня в мозге может детерминировать снижение синтеза глутатиона. Доноры H₂S активируют экспрессию тиоредоксинредуктазы, глутатион-S-трансферазы *in vitro* [14]. Результаты корреляционного анализа подтвердили обратную взаимосвязь между уровнем гомоцистеина в крови и уровнем H₂S в мозге (r = 0,51; p < 0,05). В условиях ГГЦ уровень H₂S прямо коррелировал с активностью цистатионин-β-синтазы, тиоредоксинредуктазы, глутаматцистеинлигазы.

Таблица 1. Уровень H₂S и его продукция в мозге крыс при изолированной ГГЦ и ее коррекции витаминами B₆, B₉, B₁₂ и эсмином (M ± m, n = 10)

Группы крыс		Гомоцистеин (сыворотка), мкмоль/л	Гомогенат мозга	
1	Контроль	6,62 ± 0,23	2,64 ± 0,15	0,451 ± 0,023
2	ГГЦ	16,8 ± 0,92*	1,24 ± 0,12*	0,297 ± 0,018*
3	ГГЦ вит. B ₆ , B ₉ , B ₁₂	12,2 ± 0,88*#	1,78 ± 0,11*#	0,372 ± 0,022*#
4	ГГЦ эсмин	14,7 ± 0,76*§	1,46 ± 0,08*§	0,341 ± 0,045*
5	ГГЦ вит. B ₆ , B ₉ , B ₁₂ эсмин	9,82 ± 0,09*#§£	2,42 ± 0,13*#§£	0,438 ± 0,016*#§£

Примечание. p < 0,05 по сравнению с * – группой 1; # – группой 2; § – группой 3; £ – группой 4.

Таблица 2. Активность про- и антиоксидантной систем в мозге крыс при изолированной ГГЦ и ее коррекции витаминами B₆, B₉, B₁₂ и эсмином (M ± m, n = 10)

Группы крыс		NADPH-оксидаза, нмоль/мин-мг-протеина	Тиоредоксинредуктаза/ мин-мг протеина	СОД, у. е./ мин-мг-протеина	Глутаматцистеинлигаза, нмоль/мг-протеина	Глутатион, мкмоль/мг-протеина
1	Контроль	1,75 ± 0,07	5,98 ± 0,26	5,70 ± 0,35	3,66 ± 0,28	6,45 ± 0,40
2	ГГЦ	3,08 ± 0,19*	3,67 ± 0,19*	2,66 ± 0,15*	2,19 ± 0,36*	3,44 ± 0,37*
3	ГГЦ + вит. B ₆ , B ₉ , B ₁₂	2,31 ± 0,11*#	4,58 ± 0,31*#	3,98 ± 0,21*#	3,07 ± 0,50	4,37 ± 0,26*#
4	ГГЦ + эсмин	2,52 ± 0,19*#	4,07 ± 0,28*	3,62 ± 0,17*#	2,84 ± 0,42	4,02 ± 0,31*
5	ГГЦ + вит. B ₆ , B ₉ , B ₁₂ + эсмин	2,04 ± 0,14*#£	5,31 ± 0,20*#£	4,66 ± 0,21*#§£	3,49 ± 0,13*#	5,18 ± 0,38*#

Примечание. p < 0,05 по сравнению с * – группой 1; # – группой 2; § – группой 3; £ – группой 4.

Оригинальные научные публикации

теинлигазы, глутатиона ($r = 0,70; 0,68; 0,45; 0,67; p < 0,05$) и обратно – с активностью NADPH-оксидазы ($r = -0,49; p < 0,05$) в мозге. Связь показателей про- / антиоксидантной системы в мозге с уровнем гомоцистеина в сыворотке крови имела противоположный характер.

Роль витаминов B_6, B_9, B_{12} в обмене метионина и гомоцистеина хорошо известна [1; 6]. Способность эсмина потенцировать действие витаминов B_6, B_9, B_{12} и нормализовать обмен H_2S в мозге в условиях ГГЦ может объясняться наличием в его составе микроэлементов – кофакторов и кофакторов ферментов метаболизма гомоцистеина и антиоксидантных ферментов [2; 3]. Например, цинк входит в состав метионинсинтетазы; селен – в состав тиоредаксинредуктазы, марганец, медь и цинк – СОД, феррум – в состав цистатионин- β -синтазы. Введение эсмина повышало активность СОД, каталазы, глутатионпероксидазы и уровень глутатиона в плазме крови крыс при лучевой болезни [3].

Выводы

1. Введение тиолактона гомоцистеина (100 мг/кг в течение 28 суток) вызывает повышение базального уровня гомоцистеина в сыворотке крови на 154%, что сопровождается снижением уровня H_2S и активности цистатионин- β -синтазы в мозге крыс (на 53,0 и 34,1%). В условиях ГГЦ нарушения в системе H_2S / цистатионин- β -синтаза ассоциируются с повышением активности NADPH-оксидазы, снижением активности тиоредаксинредуктазы, СОД, ингибированием синтеза глутатиона.

2. Изолированное введение витаминов B_6, B_9, B_{12} и эсмина проявляет гипогомоцистеинемический эффект, уменьшает формирование дефицита H_2S в мозге, повышает антиоксидантную активность и уровень глутатиона в мозге крыс с ГГЦ. Лечебно-профилактический эффект витаминов и эсмина существенно потенцируется при их сочетанном применении.

Таким образом, нарушения в системе H_2S интегрированы в патогенетические механизмы ГГЦ. Коррекция уровня H_2S при помощи витаминно-микроэлементных комплексов может стать полезной стратегией в профилактике ГГЦ-ассоциированных нейродегенеративных процессов, но этот вопрос требует более детального изучения в перспективе.

Литература

1. Артемчук, М. А. Профілактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпергомоцистеїнемії / М. А. Артемчук // *Bio-medical and Biosocial Anthropology*. – 2006. – № 7. – С. 17–20.
2. Вплив полімікроелементного препарату «Есмін» на вікові зміни вмісту гідрогенсульфіду та показників про- / антиоксидантної системи в міокарді щурів / Н. В. Заїчко [та ін.] // *Укр. біохім. журнал*. – 2014. – Т. 86, № 3. – С. 61–68.
3. Ефективність есміну при дії на організм іонізуючого випромінювання / Н. С. Узленкова [та ін.] // *Журн. НАМН України*. – 2013. – Т. 19, № 1. – С. 34–45.
4. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
5. Мельник, А. В. Активність ферментів синтезу гідроген сульфід у нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // *Укр. біохім. журнал*. – 2009. – № 4. – С. 12–22.
6. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О. О. Пентюк [та ін.] // *Укр. біохім. журнал*. – 2003. – Т. 75, № 1. – С. 5–17.
7. Утворення гідроген сульфід у органах щурів / Н. В. Заїчко [та ін.] // *Медицина хімія*. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 7–13.
8. *Carvedilol* induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs / B. Wiliński [et al.] // *Folia Biol (Krakow)*. – 2011. – Vol. 59, № 3–4. – P.151–155.
9. *Hyperhomocysteinemia* as a risk factor for the neuronal system disorders / M. Petras [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 65, № 1. – P.15–23.
10. *Kimura*, H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system / H. Kimura // *Neurochem. Int.* – 2013. – Vol. 63, № 5. – P. 492–497.
11. *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.
12. *Orlowski*, M. Partial reactions catalyzed by γ -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate / M. Orlowski, A. Meister // *J. Biol. Chem.* – 1971. – Vol. 246, № 23. – P. 7095–7105.
13. *Paul*, B. D. H_2S signalling through protein sulfhydration and beyond / B. D. Paul, S. H. Snyder // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 13, № 8. – P. 499–507.
14. *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.