

УДК 612.398.192: 622.411.37: 611.137.83: 599.323.4: 612.398.192

Ю.О. Безсмертний¹, Н.В. Заїчко¹, А.В. Мельник²

ВПЛИВ ГОМОЦИСТЕЇНУ ТА ГІДРОГЕНУ СУЛЬФІДУ НА ТОНУС СТЕГНОВИХ АРТЕРІЙ ЩУРІВ ТА ЙОГО ЗМІНИ ЗА УМОВ МОДУЛЮВАННЯ ОБМІНУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ

¹НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова²Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Резюме. Вивчено вплив гомоцистеїну (ГЦ) та гідрогену сульфідру (H_2S) на тонус стегнових артерій щурів *in vitro* та оцінено, як змінюються судинні ефекти вказаних сполук за гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ). ГЦ за високих концентрацій (10^{-4} - $10^{-2}M$) суттєво зменшував здатність стегнових артерій до ацетилхолін-ініційованої вазодилатації і практично не впливав на судинний тонус за низьких концентрацій (10^{-6} - $10^{-5}M$). У той же час, H_2S у широкому діапазоні концентрацій (10^{-6} - $10^{-2}M$) викликав дозозалежну релаксацію стегнових

артерій щурів. За ГГЦ, і особливо за її поєднання з введенням неселективного інгібітору NO-синтази L-NAME, реєструвалося посилення непрямого вазоконстрикторного ефекту ГЦ та зменшення вазодилатуючого ефекту H_2S . Застосування гіпогомоцистеїнемічного засобу декамевіту запобігало розвитку дизрегуляції тонусу стегнових артерій у щурів.

Ключові слова: гідрогену сульфід, гомоцистеїн, стегнові артерії, гіпергомоцистеїнемія, декамевіт.

Вступ. Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є незалежним фактором ризику багатьох патологічних станів – серцево-судинних захворювань, неврологічних розладів, ниркової недостатності, остеопору тощо [4, 13]. Одним із механізмів негативного впливу ГГЦ на різні органи та тканини є порушення процесів регуляції судинного тонусу, який опосередковується через пригнічення продукції вазоактивних молекул – ацетилхоліну, нітрогену монооксиду (NO), гідрогену сульфідру (H_2S) [4, 12]. Ймовірно, що судинні механізми залучені і в реалізацію остеотоксичного ефекту ГГЦ, адже морфофункціональний стан кісткової тканини певною мірою визначається ступенем її кровопостачання. Показово, що судини різного типу відрізняються за чутливістю до пошкоджуючої дії високих рівнів ГЦ, що зокрема продемонстровано на прикладі аорти, ниркових та мезентеріальних артерій щурів [12]. Разом з тим, вплив ГЦ та його вазоактивного метаболіту H_2S на скоротливість судин, залучених до кровопостачання кісток, у тому числі й стегнових артерій, залишається невивченим. Невідомо, як відображається модулювання обміну ГЦ на судинних ефектах вказаних сірковмісних сполук.

Мета дослідження. Вивчити в стендових дослідженнях вплив ГЦ та H_2S на ізометричне напруження кільцевих фрагментів стегнових артерій щурів та оцінити його зміни за умов експериментальної ГГЦ, її комбінації з введенням неселективного інгібітору NO-синтази – L-NAME та гіпогомоцистеїнемічного засобу декамевіту.

Матеріал і методи. Досліди проведені на 40 білих нелінійних щурах-самцях масою 250-270 г. Модель ГГЦ створювали у 30 тварин шляхом інтрагастрального введення тіолактону D,L-гомоцистеїну (Fluka, Німеччина), у дозі 100 мг/кг маси тіла [5]. З метою оцінки скоротливості стегнових артерій в умовах тривалої дії двох чинни-

ків – ГГЦ та порушення продукції оксиду азоту (NO), введення тіолактону ГЦ поєднували з введенням L-NAME у дозі 30 мг/кг [10]. З метою профілактики ГГЦ-індукованих порушень використаний препарат декамевіт (Декамевіт[®], АТ “Київський вітамінний завод”), який містить в одній таблетці високі дози вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} – 20,0; 2,0; 0,1 мг. Цей препарат додавали в дієту тварин протягом всього терміну досліду з розрахунку 781 мг на 1 кг сухого корму, що забезпечувало надходження 1430 мкг вітаміну B_6 , 143 мкг вітаміну B_9 , 7,15 мкг вітаміну B_{12} на 1 кг маси тіла тварин. Вказані дози вітамінів перевищують добову потребу щурів у 7-20 разів, але при цьому є нетоксичними і мають гіпогомоцистеїнемічну дію [2].

Евтаназію тварин викликали шляхом дислокації шийних хребців. Після виділення стегнові артерії одразу поміщали у стандартний буферний розчин Кребса (склад у кінцевих концентраціях, мМ: 132 натрію хлориду, 4,7 калію хлориду, 1,4 натрію дигідрофосфату, 1,0 кальцію хлориду, 12,5 натрію гідрокарбонату та 5,6 глюкози), рН 7,4, при температурі 18-20°C (рН розчину Кребса доводили до 7,4 шляхом продування сумішю газів – 95% кисню та 5% карбону діоксиду). За допомогою препарувальних голок судини фіксували на парафіновому дні препарувальної чашки, заповненої розчином Кребса. Під бінокляром стегнову артерію звільняли від сполучної тканини та згустків крові. Відпрепаровані ділянки судин розрізали на кільцеві сегменти завширшки 2-3 мм під кутом близько 45°, отримані ізольовані кільцеві сегменти судин залишали в розчині Кребса при температурі 18-20°C на 45 хв до перенесення їх у робочу перфузійну камеру. Гладеньком'язові препарати досліджуваних судин поміщали у виготовлену із плексигласу робочу камеру (об'єм – 0,5 мл) між гачком і датчиком напружен-

ня та розтягували під постійним навантаженням 0,015-0,02 Н, що дозволяє отримати оптимальну силу скорочення судинних препаратів.

Реєстрацію скоротливої активності ізольованих препаратів судин проводили в режимі, що наближався до ізометричного за допомогою тензометричної установки, створеної в ДУ «Інститут фізіології АМН України ім. О.О. Богомольця», за загальноприйнятою методикою [1, 3, 6]. Судинні сегменти в камері суперфузували буферним розчином Кребса зі сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою перистальтичного насоса. Суперфузійний буферний розчин Кребса термостатували із постійною температурою 37°C за допомогою системи підігріву розчину. До початку експерименту судинні сегменти витримували в перфузійній камері протягом 40-60 хвилин. Після цього починали періодичну стимуляцію гладеньком'язових клітин за допомогою гіперкалієвого буферного розчину із вмістом іонів K^+ 80 мМ до отримання стабільних скоротливих відповідей з метою досягнення оптимального режиму роботи гладеньких м'язів судин. Після цього м'язові смужки промивалися стандартним розчином Кребса 3 рази по 30 хв. Цілісність ендотелію контролювали за ступенем ізометричного розслаблення досліджуваних фрагментів судин під впливом ацетилхоліну ($10^{-6}M$), попередньо скорочених розчином α_1 -агоніста адренорецепторів фенілефрином ($10^{-6}M$).

Для оцінки H_2S -стимульованого розслаблення ізольовані фрагменти стегнової артерії, передскороченої фенілефрином ($10^{-6}M$), перфузували розчинами, що містили одночасно фенілефрин ($10^{-6}M$) та H_2S у різних концентраціях (10^{-2} - $10^{-6}M$), протягом 15 хв кожний із подальшою реєстрацією змін ізометричного напруження. Ре-

зультати представляли у відсотках, які розраховували відносно показника ізометричного напруження фрагменту стегнової артерії, досягнутого при дії фенілефрину і прийнятого за 100%.

З метою дослідження непрямой констрикторної дії ГЦ фрагменти стегнової артерії інкубували з D,L-ГЦ (Sigma, США) у діапазоні концентрацій 10^{-6} - $10^{-2}M$ протягом 180 хв, передскорочували їх фенілефрином ($10^{-6}M$) та суперфузували розчином, який містив фенілефрин та ацетилхолін (у концентраціях $10^{-6}M$) протягом 30 хв. Далі оцінювали ацетилхолін-індуковані зміни ізометричного напруження у відсотках і порівнювали їх з такими в стегнових артерій, яким не проводилась інкубація з ГЦ.

Результати дослідження та їх обговорення. Спершу ми вивчили вплив ГЦ на індуковану ацетилхоліном ендотелійзалежну релаксацію стегнових артерій у щурів контрольної групи, а також зміни судинних ефектів цієї сірковмісної амінокислоти за умов ізольованої ГЦ та поєднаної з уведенням L-NAME і декамевіту (рис. 1, табл.). Виявилось, що в концентраціях 10^{-6} - $10^{-5}M$ ГЦ мав незначний вплив на вазодилатацію, індуковану ацетилхоліном: релаксація кільцевих фрагментів стегнових артерій зменшувалася лише на 8,11 та 11,7% відповідно. Проте в більших концентраціях (10^{-4} та $10^{-2}M$) він викликав дозозалежне зменшення вазодилатуючої дії ацетилхоліну (відповідно на 50,6% та 83,2%). Середня ефективна концентрація ГЦ для стегнової артерії коливалась у межах 81,0-91,0 мкМ. Отже, по відношенню до стегнової артерії ГЦ виявляє непряму констрикторну дію, яка опосередковується через зменшення чутливості ендотелію судин до вазодилатуючої дії ацетилхоліну.

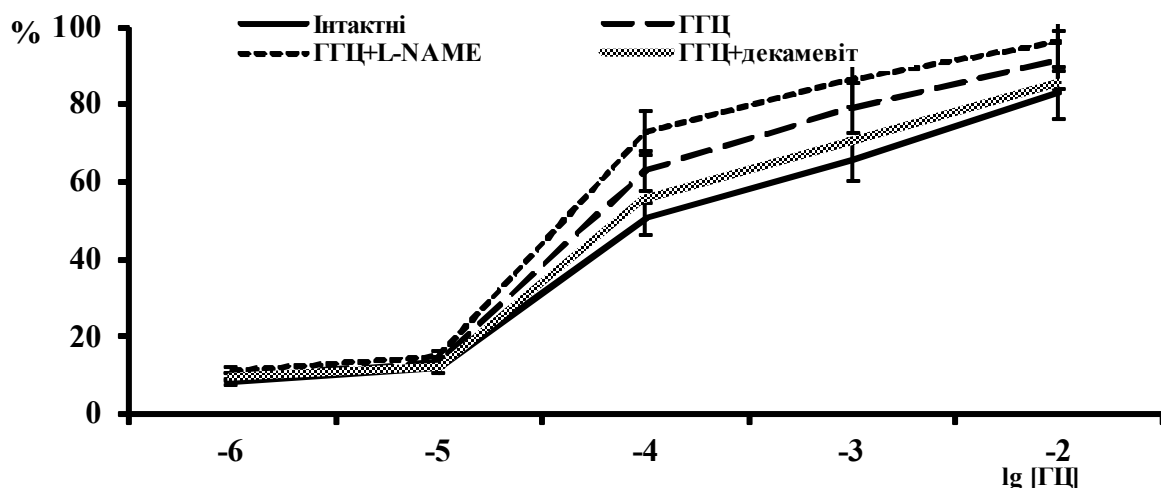


Рис. 1. Дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів стегнових артерій щурів під впливом ГЦ за умов ГЦ, її поєднанням з уведенням L-NAME та декамевіту. По осі абсцис – десятиковий логарифм концентрації ГЦ (моль/л) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетилхолін-індукованого розслаблення фрагментів ниркових артерій під впливом ГЦ.

Примітка. ГЦ – гомоцистеїн; ГГЦ – гіпергомоцистеїнемія

Таблиця

Середні ефективні концентрації (EC₅₀) H₂S та гомоцистеїн для стегнових артерій щурів дослідних груп

№ з/п	Характеристика груп тварин	EC ₅₀ , мкМ	
		H ₂ S	ГЦ
1	Контроль	82,0±4,35	86,4±4,87
2	ГГЦ	104±5,10*	62,6±4,89*
3	ГГЦ+L-NAME	122±5,32*#	46,2±5,12*#
4	ГГЦ+декамевіт	87,8±4,21#	78,5±4,12#

Примітка. * - p<0,05 відносно контрольної групи; # - p<0,05 відносно групи ГГЦ; інші умовні позначки такі ж, як у рис 1 і 2

За умов ГГЦ та, особливо, її комбінації з уведенням L-NAME значно зростає констрикторний потенціал ГЦ по відношенню до стегнової артерії. Так, у тварин, яким вводили лише тіолактон ГЦ чи тіолактон разом з L-NAME, відмічалось значне зміщення кривих «доза-ефект» ліворуч. Також реєструвалося достовірне (на 27,5 та 46,5% відповідно) зменшення концентрацій ГЦ, за яких настає часткове (на 50,0%) блокування ацетилхолін-індукованої ендотелійзалежної релаксації стегнових артерій.

Застосування декамевіту значно зменшує здатність ГЦ інгібувати ендотелій – залежну вазодилатацію стегнових артерій. Зокрема, у тварин, які отримували гіпогомоцистеїнемічний засіб, криві «доза-ефект» наближалися до таких у контрольних щурів, а середні ефективні концентрації ГЦ виявилися на 25,0% (p<0,05) вищими, ніж у тварин із ГГЦ, які не отримували лікування.

У подальшому ми дослідили вплив H₂S на тонус стегнових артерій у контрольних щурів та оцінили зміни судинних ефектів цього вазодилатора за умов ГГЦ, її поєднання з уведенням L-NAME та декамевіту (рис. 2). Виявилось, що у щурів контрольної групи донор H₂S (Na₂S·9H₂O) викликав дозозалежне зменшення ізометричного напруження кільцевих фрагментів стегнових артерій, попередньо скорочених фенілефрином. За низьких концентрацій H₂S (10⁻⁶-10⁻⁵М) вазорелаксація була незначною і становила 14,1% та 16,3% відповідно. Збільшення вмісту H₂S у перфузійному розчині супроводжувалося більш виразною релаксацією фрагментів стегнових артерій з максимальним ефектом (77,6%) у концентрації 10⁻²М. При цьому концентрація H₂S, за якої розслаблення кільцевих фрагментів стегнової артерії відповідало половині від максимального, знаходилась у діапазоні 78-86 мкМ.

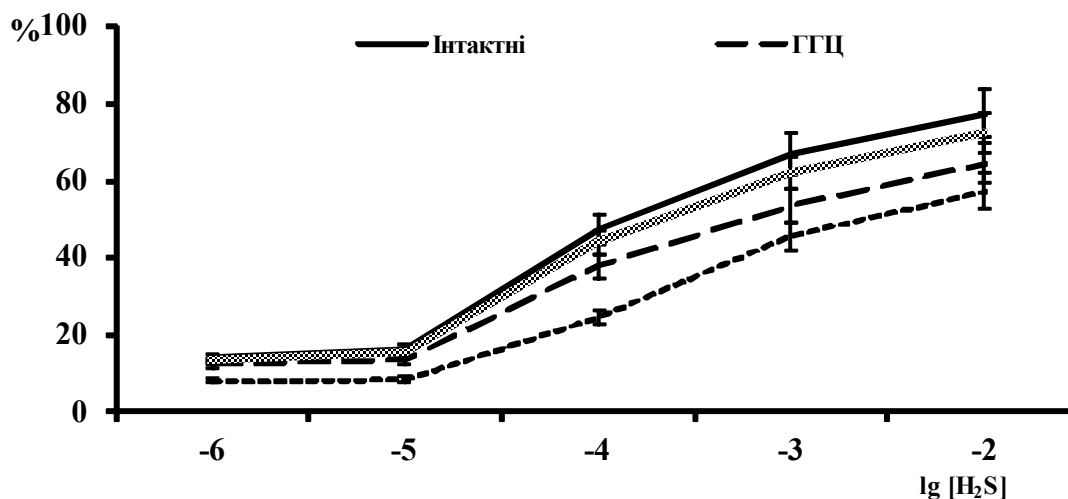


Рис. 2. Дозозалежність H₂S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів стегнових артерій у щурів з ГГЦ, її поєднанням з уведенням L-NAME та декамевіту. По осі абсцис – десятиковий логарифм концентрації H₂S (моль/л) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів ниркових артерій під впливом зростаючих концентрацій H₂S. За 100% прийнятий рівень H₂S-стимульованого розслаблення фрагментів ниркових артерій, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Примітка. H₂S – гідрогену сульфід; інші умовні позначки такі ж, як у рис 1

Отже, ГГЦ викликає порушення процесів регуляції тонуусу стегнової артерії, що супроводжується підвищенням чутливості судинної стінки до констрикторних ефектів ГЦ, зменшенням здатності до H_2S -індукованої вазодилатації. Ймовірно, зростання вазоконстрикторного потенціалу ГЦ за ГГЦ є наслідком депримуєчого впливу високих концентрацій цієї сірковмісної амінокислоти на активність ендотеліальної NO-синтази. Відомо, що за умов ГГЦ зменшується доступність L-аргініну та тетрагідробіоптерину до активного центру NO-синтази [8, 9], а також накопичується інгібітор цього ензиму – асиметричний диметиларгінін (ADMA) [7]. У той же час падіння чутливості судинної стінки стегнової артерії до релаксуючої дії H_2S , ймовірно, є наслідком ГГЦ-індукованого накопичення активних кисневих дериватів, що веде до ковалентної модифікації редокс-чутливих K^+_{ATP} -каналів – важливої мішені вазодилатуючої дії H_2S [11]. Ще однією із можливих причин зниження судинних ефектів H_2S за умов ГГЦ є зменшення активності ендотеліальної NO-синтази, адже, як нами показано раніше, ця метаболічна мішень також інтегрована в реалізацію судинних ефектів H_2S [12].

Проведені нами дослідження показали, що уведення L-NAME значно збільшує масштабність ГГЦ-індукованих змін скоротливості стегнових артерій, що ймовірно пов'язано з її здатністю не лише інгібувати активність NO-синтази, але й посилювати гіпергомоцистеїнемію. У той же час застосування гіпогомоцистеїнемічного засобу декамевіту значною мірою стримує формування дисбалансу в системах регуляції судинного тонуусу за умов ГГЦ.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що судинна токсичність ГГЦ може бути однією із патогенетичних ланок порушення функціонування кісткового апарату за даного патологічного стану, а використання гіпогомоцистеїнемічних засобів є перспективним остеопротекторним препаратом.

Висновки

1. У стендових дослідженнях показано, що H_2S у діапазоні концентрацій 10^{-6} - 10^{-2} М викликає дозозалежну релаксацію стегнових артерій ($EC_{50}=82,0\pm 4,35$ мкМ). Гомоцистеїн проявляє непряму вазоконстрикторну дію лише у високих концентраціях 10^{-6} - 10^{-2} М, що проявляється зменшенням ацетилхолін-індукованої вазодилатації ($EC_{50}=86,4\pm 4,87$ мкМ).

2. За умов гіпергомоцистеїнемії реєструється достовірно зменшення чутливості стінки стегнової артерії до релаксуючої дії H_2S ($EC_{50}=104\pm 5,10$ мкМ) та зростання вазоконстрикторного потенціалу гомоцистеїну ($EC_{50}=62,6\pm 4,89$ мкМ). Уведення L-NAME збільшує виразність гіпергомоцистеїнемії-індукованих змін судинних ефектів гомоцистеїну та H_2S на стінку стегнової артерії.

3. Насичення щурів декамевітом стримує формування дизрегуляції тонуусу стегнових артерій. За цих умов EC_{50} гомоцистеїну та H_2S у стег-

новій артерії достовірно не відрізнялися від таких у щурів контрольної групи.

Перспективи подальших досліджень. Зв'язок високого рівня гомоцистеїну з ураженням судин підтверджений як клінічно, так і експериментально, однак безпосередньо молекулярні механізми пошкоджуючої дії надлишку гомоцистеїну та його поєднання з дефіцитом вазоактивних речовин (NO, H_2S) залишаються невідомими і тому потребують подальшого з'ясування. Це дало б можливість розробити патогенетично обґрунтовані підходи до корекції несприятливої дії надлишку гомоцистеїну на судинну систему.

Література

1. А. с. 1028315 СССР, МКИ А 61 В 5/10. Устройство для исследования реакций мышц / И.А. Назарук, С.А. Бернштейн, А.И. Соловьев [и др.] (СССР). – № 1028315 А 61 В 5/10; заявл. 23.11.81; опубл. 15.07.83, Бюл. № 26.
2. Артемчук М.А. Профилактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпергомоцистеїнемії / М.А. Артемчук // Biomedical and Biosocial Anthology. – 2006. – №7. – С. 17-20.
3. Ткаченко М.М. Вікові особливості змін скоротливості судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження / М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк // Фізіолог. ж. – 2005. – Т. 51, N 3. – С. 32-41
4. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / Пентюк О.О., Луцюк М. Б., Андрушко І.І., Постовітенко К.П. // Укр. біохім. ж. – 2003. – Т. 75, № 1. – С. 5-17.
5. Пентюк О.О. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О.О. Пентюк, М.Б. Луцюк, К.П. Постовітенко // Досягнення біології та медицини. – 2004. – № 1 (3). – С. 35-38.
6. Электрофизиологический анализ возбуждающего действия серотонина на коронарные артерии / А.В. Гурковская, В.А. Бурый, Н.И. Гокина, М.Ф. Шуба // Физиол. ж. – 1998. – Т. 34, № 5. – С. 66-72
7. Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and renal function – is there a relation? / R. Široká, L. Trefil, D. Rajdl [et al.] // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. – 2005. – Vol. 43, № 10. – P. 1147-1150.
8. Effect of homocysteine on the L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in human platelets / J. Li, Y. Zhang, X. Yao [et al.] // Heart Vessels. – 2002. – Vol. 16, № 2. – P. 46-50.
9. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport / L. Jin, R.B. Caldwell, T. Li-Masters, R.W. Caldwell // J. Physiol Pharmacol. – 2007. – Vol. 58, № 2. – P. 191-206.
10. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart / O. Pechanova,

- I. Bernatova, V. Pelouch, P. Babal // *Physiol Res.* – 1999. – Vol. 48, № 5. – P. 353-362.
11. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // *Pharmacological Reports.* – 2007. – Vol. 59. – P. 4-24.
12. 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. – Vol. 42, № 2. – P. 126-131
13. The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review / Herrmann M., Peter Schmidt J., Umanskaya N. [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2007. – Vol. 45, № 12. – P. 1621-1632.

ВЛИЯНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА И ГИДРОГЕНА СУЛЬФИДА НА ТОНУС БЕДРЕННЫХ АРТЕРИЙ КРЫС И ЕГО ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ МОДУЛИРОВАНИИ ОБМЕНА СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ

Ю.А. Бессмертный¹, Н.В. Заичко¹, А.В. Мельник²

Резюме. Изучено влияние гомоцистеина (ГЦ) и гидрогена сульфида (H₂S) на тонус бедренных артерий крыс *in vitro* и оценено, как изменяются сосудистые эффекты указанных соединений при гипергомоцистеинемии (ГГЦ). ГЦ в высоких концентрациях (10⁻⁴-10⁻²М) существенно уменьшал способность бедренных артерий к ацетилхолин-инициированной вазодилатации и практически не влиял на сосудистый тонус при низких концентрациях (10⁻⁶-10⁻⁵М). В то же время, H₂S в широком диапазоне концентраций (10⁻⁶-10⁻²М) вызывал дозозависимую релаксацию бедренных артерий крыс. При ГГЦ, и особенно при ее сочетании с введением неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME, регистрировалось усиление непрямого вазоконстрикторного эффекта ГЦ и уменьшения вазодилатирующего эффекта H₂S. Применение гипогомоцистеинемического средства декамевита предотвращало развитие дисрегуляции тонуса бедренных артерий у крыс.

Ключевые слова: гидрогена сульфид, гомоцистеин, бедренные артерии, гипергомоцистеинемия, декамевит.

THE INFLUENCE OF HOMOCYSTEINE AND HYDROGENE SULFIDE ON THE TONE OF THE RAT FEMORAL ARTERIES AND ITS CHANGES UNDER THE CONDITIONS OF MODULATING SULFUR AMINO ACIDS METABOLISM

Y.O. Bezsmertnyi¹, N.V. Zaichko¹, A.V. Melnyk²

Abstract. The influence of homocysteine (Hcy) and hydrogen sulfide (H₂S) on the tone of the rat femoral arteries were investigated *in vitro* and the way the vascular effects of the said compounds change in case hyperhomocysteinemia (HHcy) was estimated. Hcy in high concentrations (10⁻⁴-10⁻²М) essentially reduced the ability of the of femoral arteries to acetylcholine-initiated vasodilation and practically did not influence on the vascular tone at low concentrations (10⁻⁶-10⁻⁵М). At the same time, H₂S in a wide range of concentrations (10⁻⁶-10⁻²М) caused a dose-dependent relaxation of the femoral arteries of rats. With HHcy, and especially in case of its combination with nonselectiv inhibitor of NO-synthases L-NAME administration, an enhancement of the indirect vasoconstrictive effect of Hcy and a reduction of the H₂S vasodilative effect were registered. The application of the hypohomocysteinemic medicinal agent Decamevitum prevented the development of dysregulation of the tone of the rat femoral arteries.

Key words: hydrogene sulfide, homocysteine, femoral arteries, hyperhomocysteinemia, Decamevitum.

Scientific research institute of invalid rehabilitation of national Pirogov Memorial Medical University¹ (Vinnytsia)
Vinnytsia national M.I. Pirogov Memorial Medical University² (Vinnytsia)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 4 (60). – P. 82-86

Надійшла до редакції 30.08.2011 року