

Вплив модуляції синтезу H_2S пропаргілгліцином на показники кардіогемодинаміки у старих щурів

К.О. Драчук, Н.О. Дорофєєва, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: 8701dk@ukr.net

Вивчали вплив пропаргілгліцину (ПГ) на кардіогемодинаміку при старінні у дорослих та старих щурів. Реєстрували значення тиску і об'єму лівого шлуночка з візуалізацією кривих їх залежності протягом серцевого циклу за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F. Встановлено, що після введення ПГ (11,31 мг/кг) старим щурам артеріальна жорсткість зменшувалась у 1,5 раза, а кінцево-діастолічна жорсткість міокарда – в 2,1 раза. Також слід відмітити збільшення внутрішньомітохондріальних пулів H_2S (на 112%), NO_2^- (на 162%), активність конститутивної NO -синтази (в 3 рази) та зниження вмісту маркера утворення супероксиду (O_2^-) і деградації АТФ - сечової кислоти. Це свідчить про те, що позитивні ефекти ПГ зумовленні збільшенням синтезу H_2S і NO та, навпаки, пригніченням деградації АТФ і окисного стресу.

Ключові слова: старіння; кардіогемодинаміка; сірководень; пропаргілгліцин; окисний стрес; сечова кислота.

ВСТУП

Старіння організму супроводжується прогресуючим зменшення його адаптаційних можливостей, що призводить до підвищення ризику багатьох захворювань, зокрема, серцево-судинної системи. На молекулярному рівні в основі більшості структурно-функціональних змін, що розвиваються в серці і судинах з віком є окисний стрес. Його причина – надмірне утворення активних форм кисню та азоту, порушення в клітині співвідношення між про- та антиоксидантами.

З іншого боку, останнім часом з'являється все більше даних про кардіо- та васкулопротекторний вплив сірководню (H_2S), який, разом з NO і CO належить до родини газових трансмітерів [1–3]. Одним із ферментів синтезу H_2S в серцево-судинній системі є цистатіонін-γ-ліаза (CSE), інгібітором якої є пропаргілгліцин (ПГ) [4,5]. Показано, що введення H_2S істотно попереджує пошкодження серця при ішемії-реперфузії, покращує показники скоротливої і діастолічної

функції у щурів зі спонтанною гіпертензією [6,7]. Цікавим є і той факт, що ПГ відновлює пригнічене у старих щурів ендотелій залежне розслаблення гладеньких м'язів судин [8]. Проте вплив H_2S на показники кардіогемодинаміки при старінні і роль при цьому CSE-залежного шляху утворення не з'ясовані.

Метою нашої роботи було дослідити роль CSE-залежного шляху синтезу H_2S у регуляції кардіогемодинаміки у старих щурів та встановити можливі її механізми.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на щурах-самцях лінії Вістар, масою 280-350 г, які були розподілені на дві групи по 8 тварин у кожній: дорослі (6-8 міс) та старі (22-24 міс). Всі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986р. (86/609/ЕЕС). Щурів наркотизували за допомогою уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревинно). Тиск і об'єм лівого шлуночка (ЛШ) під час

серцевого циклу визначали за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F («Millar Instruments», США). Катетер вводили через сонну артерію ретроградно у ЛШ, що давало змогу одночасно реєструвати сигнали тиску і об'єму з візуалізацією кривих їх залежності протягом серцевого циклу [9]. Активність CSE пригнічували за допомогою ПГ, який вводили внутрішньом'язово в концентрації 11,31 мг/кг. Реєстрували основні кардіогемодинамічні показники: кінцево-сistolічний тиск (КСТ), кінцево-діастолічний тиск (КДТ), кінцево-сistolічний об'єм ЛШ (КСО), кінцево-діастолічний об'єм ЛШ (КДО), ударний об'єм (УО), хвилинний об'єм крові (ХОК), фракцію викиду, частоту серцевих скорочень (ЧСС), максимальну швидкість наростання тиску ЛШ (dP/dt_{max}), максимальну швидкість зниження тиску ЛШ (dP/dt_{min}). Для оцінки здатності міокарда до розтягнення кінцево-діастолічну жорсткість (КДЖ) визначали під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця. Артеріальну жорсткість розраховували як відношення КСТ до УО. Співвідношення тиску і об'єму ЛШ реєстрували за допомогою програми PVAN 3,6 («Millar Instruments», США).

У мітохондріях серця дорослих та старих щурів визначали стаціонарні ендогенні пули H_2S , вміст стабільного метаболіту оксиду азоту (NO) – нітрит-аніона (NO_2^-) та активність конститутивної NO-синтази – cNOS [8,10]. Інтенсивність окисного стресу оцінювали за зміною маркерів ферментативного утворення супероксид-аніона (O_2^-): сечової кислоти (маркер утворення O_2^- нуклеотидною ксантиноксидазою) і ейкозаноїдів пептидолейкотрієну C_4 (маркер утворення O_2^- ліпоксигеназою) і тромбоксану B_2 (маркер утворення O_2^- циклооксигеназою). Крім стаціонарних пулів, визначали також скоординовані зміни цих показників під впливом ПГ, який вводили внутрішньом'язово в концентрації 11,31 мг/кг за 30 хв до декапітації тварин. Після цього, з тканин серця виділяли мітохондрії послі-

довним центрифугуванням гомогенату. Осад останніх суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і зберігали при 4 °С. Вміст загального білка в суспензії мітохондрій вимірювали за методом Лоурі.

Статистичну обробку проводили програмами Microsoft Excel та OriginPro 8.5 («Microcal Inc.», США). Вірогідність показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При аналізі показників кардіогемодинаміки виявлено, що у дорослих і старих щурів введення ПГ не супроводжувалося зміною показників насосної функції серця (КСО, КДО, УО, ХОК). Водночас сприяло незначному збільшенню показника скоротливої активності міокарда dP/dt_{max} і ЧСС в обох групах. ПГ мав потужний вплив на артеріальну жорсткість, яка містить в собі такі основні елементи судинного навантаження, як загальний периферичний опір, податливість, імпеданс. У старих щурів після введення ПГ цей показник зменшувався в 1,5 раза, що свідчить про зниження постнавантаження на серце (рис. 1). Відомо, що при старінні підвищується артеріальна жорсткість як через структурне ремоделювання судинної стінки, в першу чергу за рахунок збільшення

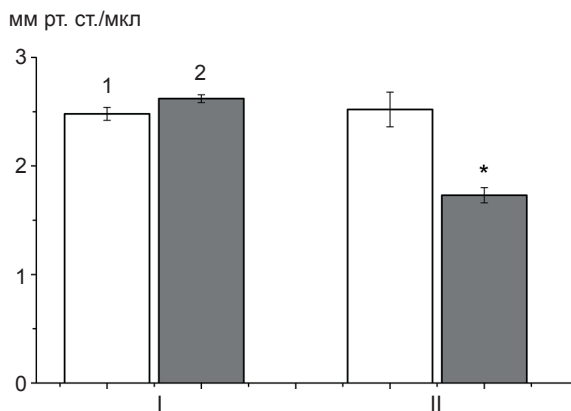


Рис. 1. Зміни артеріальної жорсткості до (1) і після (2) введення пропаргілгліцину дорослим (I) і старим (II) щурам. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем у своїй групі

відкладання колагену і зменшення – еластину, так і через функціональні зміни – підвищення тонуусу гладеньком'язових клітин судин [11]. Основним регулятором тонуусу останніх є оксид азоту, потужний ендogenous вазорелаксант. Його біодоступність, яка залежить від співвідношення утворення NO до деградації, при старінні зменшується, зокрема, через окисний стрес. Раніше проведені нами експерименти на ізольованих сегментах грудної аорти показали, що ПГ, через стимуляцію синтезу NO, здатен відновлювати ендотелій-залежне розслаблення судин за умов старіння [8]. Невирішеним залишається питання, щодо можливого впливу ПГ на окисний стрес.

Нами виявлено, що під дією ПГ покращувалось розслаблення ЛШ, як у дорослих так і у старих щурів. КДЖ, яка визначає наповнення шлуночка в період пізньої діастоли, зменшилась в 2,1 раза у старих і в 2,5 раза у дорослих щурів (рис. 2, а), а dP/dt_{min} у дорослих щурів вірогідно збільшилась на 20% (див. рис. 2, б), а у старих не змінилась. Попередні наші дослідження показали діастолічну дисфункцію ЛШ і порушення релаксації серця у старих щурів, на що вказувало, зокрема, збільшення КДЖ [12]. Відомо, що повноцінна релаксація міокарда в ранню діастолу забезпечується енергозалежним процесом транспорту Ca^{2+} із міоплазми в саркоплазматичний ретикулум та позаклітинне середовище за участі двох

насосів – Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума і Na^{+} - Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани, відповідно [13–15]. Енергодефіцит, порушуючи роботу цих переносників, викликає діастолічну дисфункцію. З іншого боку, при старінні саме окисний стрес спричинює зниження біосинтезу АТФ і розвиток енергодефіциту в мітохондріях [16].

Таким чином, і окисний стрес, і зниження біодоступності NO можуть бути важливими біохімічними процесами, які призводять до підвищення артеріальної жорсткості і КДЖ при старінні.

Для встановлення можливих механізмів впливу ПГ на кардіогеодинаміку у старих щурів, дослідили його дію на пули H_2S , NO_2^- , активність ферменту cNOS та маркери ферментативного утворення O_2^- в мітохондріях серця. Слід відмітити, що у старих тварин пули H_2S , NO_2^- та активність cNOS знижені, а застосування ПГ парадоксальним чином їх підвищувало (рис. 3).

Крім того, в мітохондріях серця старих щурів були підвищені пули сечової кислоти, що є одночасно плейотропним маркером і утворення O_2^- ксантинооксидазою, і гіпоксичного стану, і деградації АТФ. Вміст ейкозаноїдів пептидолейкотриєну C_4 (маркер утворення O_2^- ліпоксигеназою) і тромбоксану B_2 (маркер утворення O_2^- циклооксигеназою) в мітохондріях серця старих щурів також були

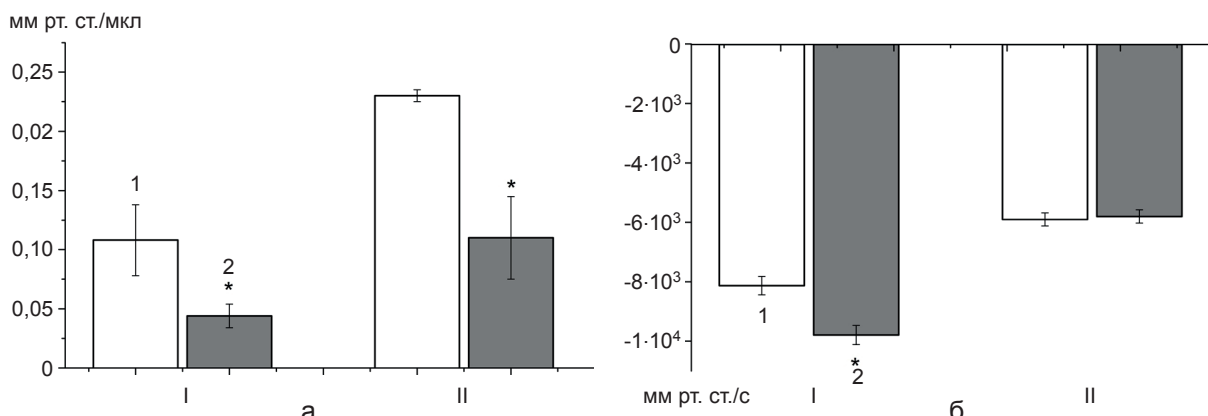


Рис. 2. Динаміка кінцево-діастолічної жорсткості (КДЖ) (а) та максимальної швидкості зниження тиску (dP/dt_{min}) (б); до (1) і після (2) введення пропаргілгліцину дорослим (I) і старим (II) щурам. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем у своїй групі

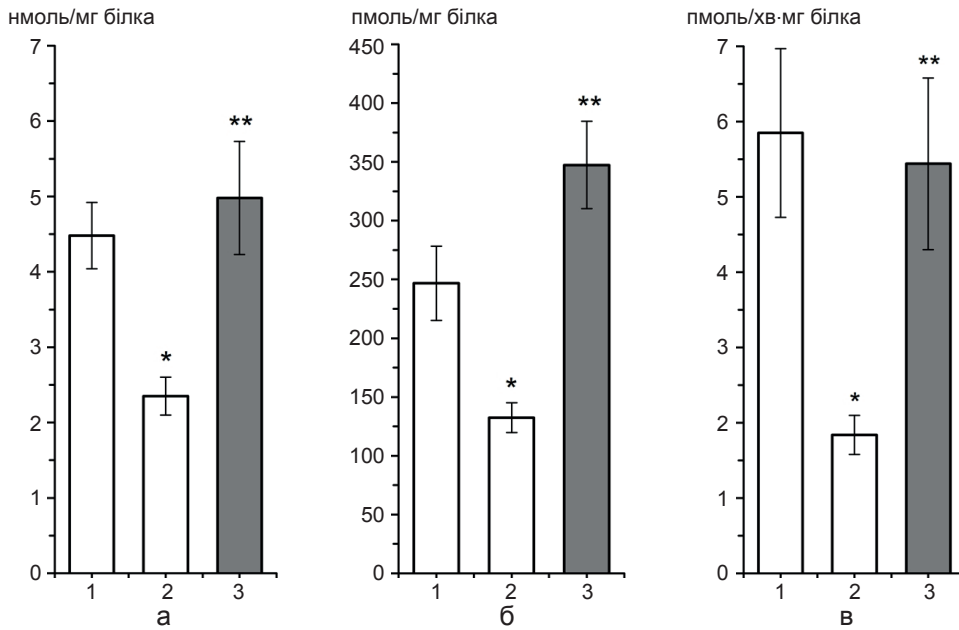


Рис. 3. Пули H₂S (а), NO₂⁻ (б) та активність конститутивної NO-синтази (в) в мітохондріях серця старих тварин за дії пропаргілгліцину (ППГ): 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури за дії ППГ. *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно значень у старих щурів

підвищені. Після введення ППГ пули сечової кислоти та тромбоксану B₂ знижувались у 3 і 3,5 раза відповідно (рис. 4).

На основі отриманих біохімічних результатів можна зробити припущення, що в основі встановлених нами позитивних ефектів ППГ на

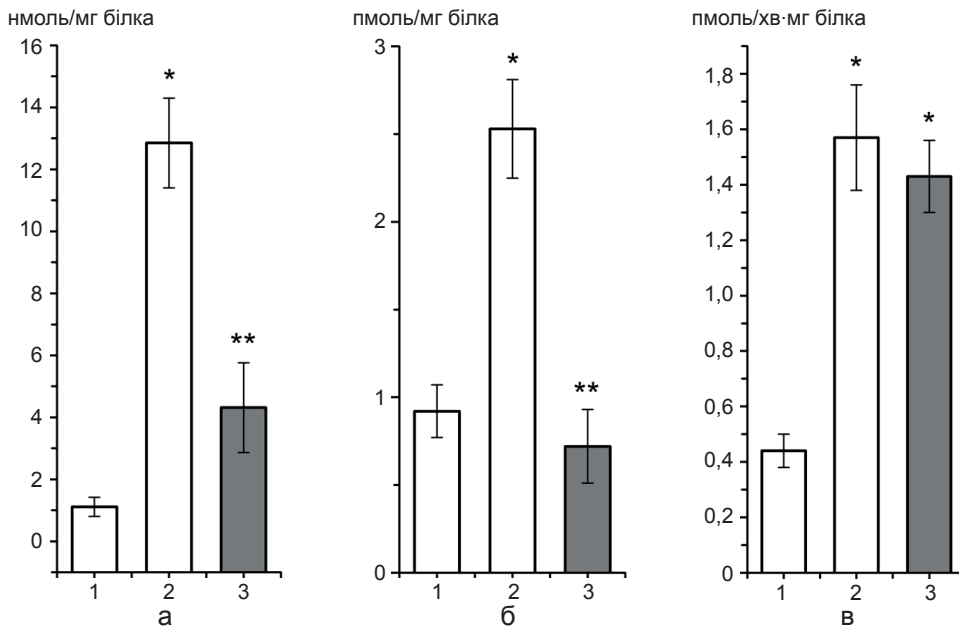


Рис. 4. Маркери ферментативного утворення O₂⁻ в мітохондріях серця старих тварин за дії пропаргілгліцину (ППГ): а – сечова кислота, б – тромбоксан B₂, в – лейкотрієн C₄; 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ППГ. *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно значень у старих щурів

показники кардіогемодинаміки (артеріальна жорсткість, КДЖ) у старих щурів знаходиться його здатність збільшувати продукцію як NO, так і сірководню. Перша дія ПГ зумовлюється його активацією NO-незалежного утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) і наступною активацією ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [17], друга – активацією шляху синтезу H₂S у мітохондріях за участю ферменту 3-меркаптопіруват сульфуртрансферази (3-MPST). Відомо також, що одними із головних механізмів кардіо- і васкулопротекторного ефекту сірководню, крім здатності стимулювати синтез NO, є його антиоксидантна дія [1,2]. Також він спроможен зв'язувати і нейтралізувати вільні радикали: супероксид-аніон, пероксинітрит, пероксид водню та підвищувати активність ендогенних ферментів-антиоксидантів: супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази [1].

Отримані нами біохімічні результати підтверджують здатність H₂S пригнічувати утворення вільних радикалів кисню, зокрема, супероксиду, блокуючи його нуклеотидний (ксантиноксидазу) і один з ліпідних (циклооксигеназу) генераторів. Позаяк вміст сечової кислоти відображає ступінь деградації АТФ у мітохондріях серця, можна припустити, що за дії ПГ вона знижується, тим самим зростає ефективність енергозалежних процесів у серці і зменшується загибель кардіоміоцитів через мітохондріозалежний апоптоз у старих щурів. Цікавим є встановлений нами факт, що підвищення пулів H₂S супроводжувалося зростанням утворення NO. Згідно з останніми даними, H₂S здатен збільшувати продукцію NO як через фосфорилування eNOS за PI3K/Akt сигнальним механізмом, так і незалежно від нього [2,18].

Отже, можна стверджувати, що в основі встановлених нами позитивних фізіологічних ефектів ПГ на кардіогемодинаміку у старих щурів лежить здатність його пригнічувати окисний стрес і деградацію АТФ та, навпаки, стимулювати утворення NO і H₂S.

ВИСНОВКИ

1. Блокатор ферменту de novo синтезу сірководню цистатіонін-γ-ліази ПГ зменшував показники АЖ і КДЖ у старих щурів.

2. Застосування ПГ викликало збільшення знижених у старих тварин внутрішньомітохондріальних пулів H₂S та NO₂⁻ та стимулювало активність cNOS.

3. Введення ПГ знижувало пули маркерів утворення O₂⁻ в мітохондріях серця старих тварин: сечової кислоти та тромбоксану B₂.

К.О. Драчук, Н.А. Дорофеева, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

ВЛИЯНИЕ ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ КАРДИОГЕМОДИНАМИКИ У СТАРЫХ КРЫС

Изучали влияния пропаргилглицина (ПГ) на кардиогемодинамику при старении у взрослых и старых крыс. Регистрировали значения давления и объема левого желудочка с визуализацией кривых их зависимости в течение сердечного цикла с помощью ультраминиатюрного катетера 2F. Установлено, что после введения ПГ (11,31 мг/кг) старым крысам артериальная жесткость уменьшалась в 1,5 раза, а конечно-диастолическая жесткость миокарда – в 2,1 раза. Также увеличивались митохондриальные пулы H₂S (на 112%), NO₂⁻ (на 162%), активность конститутивной NO-синтазы (в 3 раза) и снижались пулы маркера деградации АТФ и образования супероксида (·O₂⁻) – мочево́й кислоты. Это свидетельствует о том, что положительные физиологические эффекты ПГ при старении обусловлены стимуляцией синтеза H₂S и NO и, наоборот, угнетением деградации АТФ и окислительного стресса.

Ключевые слова: старение; кардиогемодинамика; сероводород; пропаргилглицин; окислительный стресс; мочево́я кислота.

K.O. Drachuk, N.A. Dorofeyeva, A.V. Kotsjuruba, V.F. Sagach

EFFECT OF PROPARGYLGLYCINE UPON CARDIOHEMODYNAMICS IN OLD RATS

Aging increases the risk of cardiovascular diseases. The objective of this study was to show the effect of propargylglycine (PPG) upon cardiohemodynamics in old rats. We used pressure-volume (PV) conductance catheter system (Millar Instruments, USA) in order to evaluate systolic and diastolic function in vivo. It has been shown that introduced PPG (11,31 mg/kg) decreases both arterial stiffness (by 1,5 times) and end-diastolic stiffness (by 2,1 times) in old rats. Using PPG

in heart mitochondria resulted in increasing levels of H₂S (by 112%), NO₂⁻ (by 162%) and in growing activity of cNOS (by 3 times). Additionally, PPG decreased the mitochondrial pools of the uric acid, the marker of the superoxide (*O₂⁻) formation and of the ATP degradation. These results suggest that PPG activates alternative ways of H₂S synthesis, stimulates the NO and H₂S synthesis and suppresses the ATP degradation and *O₂⁻ formation. These actions of PPG improve arterial stiffness and end-diastolic stiffness.

Key words: aging; cardiohemodynamic; hydrogen sulfide; propargylglycine; oxidative stress; uric acid

REFERENSES

1. Streeter E, HH Ng, Hart JL. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Med Gas Res.* 2013;3(1):1–9.
2. Kondo K, Bhushan S, King AL, Prabhu SD, Hamid T, Koenig S, et al. H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2013;127(10):1116–27.
3. Zhou X, An G, Chen J. Hydrogen sulfide improves left ventricular function in smoking rats via regulation of apoptosis and autophagy. *Apoptosis.* 2014 Jun;19(6):998-1005.
4. Gil V, Gallego D, Jiménez M. Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br J Pharmacol.* 2011 Sep; 164(2b):485–98.
5. Xue H, Yuan P, Ni J, Li C, Shao D, Liu J, et al. H(2) S inhibits hyperglycemia-induced intrarenal renin-angiotensin system activation via attenuation of reactive oxygen species generation. *PLoS One.* 2013;8(9).
6. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV. Effects of stimulation and blockade of the synthesis of endogenous hydrogen sulfide at myocardial ischemia-reperfusion. *Fiziol Zh.* 2013;59(4):8–15[Ukrainian].
7. Dorofeyeva NA, Kuzmenko MA, Sagach VF. Effects of hydrogen sulfide donor on the heart function of spontaneously hypertensive rats. *TMB Visnyk.* 2012;15(3):92–4[Ukrainian].
8. Drachuk KO, Kotsjuruba AV, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle in old rats. *Fiziol Zh* 2014; 60(4):3–10 [Ukrainian].
9. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc.* 2008;9:1422–34.
10. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria of brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014;60(3):11–17 [Ukrainian].
11. López-Andrés N, Calvier L, Labat C, Fay R, Díez J, Benetos A, et al. Absence of cardiotrophin 1 is associated with decreased age-dependent arterial stiffness and increased longevity in mice. *Hypertension.* 2013;61(1):120–9.
12. Dorofeyeva NA, Drachuk KO, Sagach VF. Cardiohemodynamics and efficiency of Frank–Starling mechanism during aging. *Fiziol Zh.* 2014;60(6):22–6 [Ukrainian].
13. Asp ML, Martindale JJ, Heinis FI, Wang W, Metzger JM. Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(4):895-900.
14. Dai DF, Santana LF, Vermulst M, Tomazela DM, Emond MJ, MacCoss MJ, et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation.* 2009;119(21):2789-97.
15. Shareef MA, Anwer LA, Poizat C. Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure. *Eur J Pharmacol.* 2014;724:1-8.
16. Gouspillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Biran M, Deschodt-Arsac V, et al. Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell.* 2014;13(1):39–48.
17. Salloum FN, Sturz GR, Yin C, Rehman S, Hoke NN, Kukreja RC, et al. Beetroot juice reduces infarct size and improves cardiac function following ischemia-reperfusion injury: Possible involvement of endogenous H2S. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;doi:10.1177/1535370214558024. PMID:25361774.
18. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(8):3182-7.

Матеріал надійшов до редакції 03.03.2015