УДК 577.161.6/577.217+612.172/612.67

Аміногуанідин відновлює ендогенний синтез сірководню, конститутивний синтез оксиду азоту, ендотелійзалежну вазодилатацію та пригнічує відкривання мітохондріальної пори у серці старих щурів

Н. А. Струтинська, А. Ю. Лучкова, Л. А. Мись, Ю. В. Коркач, В. Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua

Показано, що розвиток старіння супроводжується суттєвим зменшенням активності конститутивної Ca^{2+}/кальмодулінзалежної NO-синтази (cNOS) на тлі збільшення кальційнезалежного індуцибельного синтезу оксиду азоту (iNOS) та маркерів окисного стресу (супероксидного радикала, дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду). Застосування аміногуанідину як інгібітора iNOS (20 мг/кг) значно знижувало активність iNOS, що призводило до відновлення конститутивного синтезу NO у серцево-судинній системі старих тварин. При цьому ми спостерігали активацію ендогенного синтезу сірководню (H_2S), який є потужним ліпофільним антиоксидантом і біологічним модулятором роботи деяких ферментів. Так, його вміст у плазму крові старих щурів відновлювався до значень контролю і становив 2,36 ± 0,12 нмоль/мг білка, а в мітохондріях збільшувався у 1,5 раза (4,32 ± 0,23 нмоль/мг білка) порівняно з дорослими тваринами (2,78 ± 0,18 нмоль/мг білка). Зростання конститутивного синтезу NO та вмісту H_2S, відомих модуляторів неспецифічної мітохондріальної пори (МП), призводило до зменшення її чутливості до Ca^{2+}, що характеризувалося підвищення порогової концентрації індуктора, який спричиняє набухання мітохондрій серця у старих тварин. Протекторні ефекти аміногуанідину у старих щурів виявлялися також у суттєвому збільшенні майже втричі амплітуди розслаблення гладеньких м'язів аорти, що свідчить про відновлення зниженої з віком ендотеліальної функції. Таким чином, застосування аміногуанідину у старих щурів призводило до посилення конститутивного синтезу оксиду азоту і ендогенного сірководню на тлі уповільнення окисних процесів, що сприяло пригніченню МП у серці та відновленню ендотелійзалежного розслаблення судин аорти.

Ключові слова: аміногуанідин; конститутивна NO-синтаза; сірководень; мітохондріальна пора; вазодилатація.

ВСТУП

Відомо, що газові трансмітери оксид азоту (NO) і сірководень (H_2S) є важливими сигнальними молекулами, що регулюють низку біохімічних і фізіологічних процесів у нормі та при патології, при цьому активно вивчається їх роль в підтриманні нормального функціонування серцево-судинної системи і судинного гомеостазу в цілому [1, 2].

Оксид азоту, який синтезується індуцибельною Ca^{2+}-незалежною NO-синтазою (iNOS), продукується у великих кількостях за патологічних умов та старінні, знижуючи вміст субстрату L-аргініну для роботи конститутивних Ca/кальмодулінзалежних NOS (cNOS), а саме ендотеліальної (eNOS) та нейрональної (nNOS) ізоформ [3]. За цих умов знижується також біодоступність NO внаслідок неспряження (uncoupling) cNOS (зниження індексу спряження cNOS), що характеризується перенесенням електронів від

© Н. А. Струтинська, А. Ю. Лучкова, Л. А. Мись, Ю. В. Коркач, В. Ф. Сагач

НАДФН на молекулярний кисень з утворенням супероксидного радикала замість NO [3, 4]. Як відомо, NO-синтази для своєї роботи потребують НАДФН, ФМН, ФАД, кальмодуліну, гему та кофактора тетрагідробіоптерину (BH4) [5].

Вважається, що з віком мітохондрії стають основним джерелом супероксидного радикала ($^{\bullet}O_2^-$), який самостійно чи взаємодіючи з NO, утворює високореакційні сполуки – гідроксильний аніон-радикал ($^{\bullet}OH$) і пероксинітрит ($ONOO^-$). За фізіологічних значеннь pH пероксинітрит стабільний, проте при патологічних станах дуже швидко розпадається і окиснює внутрішньоклітинні мішені, індукує пошкодження ДНК і мутації, пригнічує функцію ферментів, призводить до апоптозу чи некрозу тощо. Негативні ефекти NO у високих концентраціях проявляються насамперед в інгібуванні мітохондріальних ферментів дихального ланцюга і, як наслідок, зниженні вироблення АТФ. Різні компоненти дихального ланцюга, а саме: комплекс I, залізо-сірчані кластери, цитохромоксидаза с були ідентифіковані як мішені для дії NO, і також різні механізми впливу NO (від конкурентного і неконкурентного зв'язування, до незворотних ушкоджень) нині виявлені для пояснення механізмів дії цього газового медіатора [5].

Разом з посиленням оксидативно-нітрозативного стресу в серці при старінні також зменшується ендогенний синтез H_2S, що в сукупності призводить до підвищенням чутливості неспецифічного мегаканалу – мітохондріальної пори (МП) до природного індуктора кальцію, і є однією з причин розвитку багатьох патологічних станів організму [4]. У разі старіння також було виявлено ендотеліальну дисфункцію, а саме порушення ендотелійзалежного ацетилхолін(АХ)-індукованого розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти. У разі дії донора сірководню пригнічувалося кальційіндуковане відкривання МП у серці та суттєво покращувалося ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти у старих щурів [6, 7].

Із літературних джерел відомо про використання терапевтичного агента аміногуанідину як інгібітора iNOS та діаміноксидази для попередження різних ускладнень діабету та запобігання віковій жорсткості артерій і гіпертрофії серця [8]. Beheshti та співавт. [9] показали захисний ефект цієї сполуки при ліпополісахаридіндукованій гепатотоксичності, яка характеризується підвищеним синтезом NO внаслідок активації iNOS. В інших дослідженнях інгібітор iNOS впливав на кількість міофібробластів та відкладення колагену в легенях щурів, що свідчило про його антифібротичний ефект [10].

Метою нашої роботи було дослідити ефекти пригнічення iNOS за допомогою інгібітора цього ферменту аміногуанідину на чутливість МП до індуктора кальцію у серці та ендотелійзалежне розслаблення ГМ у аорті старих щурів, а також встановити можливі біохімічні механізми за цих умов.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220–250 г) і старих (22–24 міс, 300–350 г) щурах лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10–12 тварин. У дослідженнях дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986). Тварин було поділено на три групи: I (контрольна) група – дорослі щури (6 міс), II група – старі щури (22–24 міс), III група – старі щури, яким внутрішньоочеревинно вводили інгібітор iNOS аміногуанідин у дозі 20 мг/кг впродовж 10 днів.

Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (4°C). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [4] і в суспензії органел визначали вміст білка за методом Лоурі. Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця

щурів. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3; pH 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при λ = 520 нм впродовж 15 хв за наявності індуктора Ca^{2+}. Амплітуду набухання, тобто зміну оптичної густини мітохондрій на 15-й хвилині, виражали як різницю відносно значень оптичної густини на 1-й хвилині ($\Delta D_{520}*10^2$). Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі без кальцію. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл.

У мітохондріях серця та плазмі крові визначали деякі біохімічні показники оксидативного стресу (швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$, пули дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіда (МДА)) як описано раніше [4]. Також вимірювали активність cNOS, як суму eNOS і nNOS, і кальційнезалежну активність iNOS [4]. При визначенні вмісту H_2S до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку, інкубували при 37,5ºC протягом 10 хв, далі додавали 0,5 мл 20 ммоль/л розчину диметил-п-фенілендиаміну та 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Після інкубації в темряві на холоді досліджували оптичну густину при λ = 670 нм [11].

Скорочувальну активність ГМ грудної аорти реєстрували на її кільцевих препаратах (3-4 мм) зі збереженим ендотелієм тензометричним методом [12]. Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину Кребса додавали норадреналін (10^{-5} моль/л, "Sigma", США). Розчин Кребса за своїм складом та концентрацією речовин є близьким до складу плазми крові і складався з (ммоль/л): NaCl – 133,0; $NaHCO_3$ – 16,3; NaH_2PO_4 – 1,38; KCl – 4,7; $MgCl_2$ – 1,05; глюкоза – 7,8; $CaCl_2$ – 2,5; pH 7,4. Стійкий рівень норадреналінзалежного скорочення («плато») приймали за 100%. Щодо нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скорочувальних реакцій ГМ аорти на аплікацію ендотелійзалежного вазодилататора ацетилхоліну (10^{-5} моль/л, "Sigma", США).

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США). Міжгрупові різниці між показниками визначали за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було показано зростання активності iNOS у плазмі у 4,4 раза, а також у 5,8 раза у мітохондріях серця старих щурів порівняно з дорослими (таблиця). За умов введення старим тваринам аміногуанідину у плазмі цей показник наблизився до значень контролю, а в органелах знижувався втричі, що переконливо свідчить про пригнічення активності iNOS. Натомість при старінні знижувалась у 4 рази активність cNOS у плазмі і 3,3 раза у мітохондріях. У разі пригнічення iNOS у старих тварин ці показники практично повністю відновлюються (див. таблицю). Отже, інгібування активності цього ферменту підтверджує дію аміногуанідину як інгібітора iNOS.

Ми також визначили швидкість генерації супероксидного радикала як результат функціонування ксантиноксидази, НАДФН-оксидази чи дихального ланцюга мітохондрій, що характеризує наявність окисного стресу. Як видно з таблиці, швидкість генерації $^{\bullet}O_2^-$ як у мітохондріях, так і в плазмі при старінні була вищою від контрольних значень у 6,6 і 5,7 раза відповідно, що спричиняє посилення вільнорадикальних процесів. За умов введення аміногуанідину спостерігали часткове зниження значень, що свідчить про уповільнення окисних процесів.

За дії вільних радикалів відбувається також окисна деградація ліпідів, а саме перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ). У наших дослідженнях його інтенсивність оцінювали за зміною вмісту первинних продуктів окиснення – ДК та кінцевого продукту – МДА. Виявили, що вміст продуктів ПОЛ у плазмі крові та мітохондріях серця вірогідно зростав з віком, що вказує на інтенсифікацію цього

Зміни активності конститутивної (cNOS) та індуцибельної (iNOS) NO-синтаз, а також деяких показників, що характеризують оксидативний стрес – швидкість генерації супероксидного радикала ($\cdot O_2^-$) і вміст продуктів неферментативного окиснення ліпідів, а саме дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА)

Схема досліду, група тварин	NO-синтаза, пмоль/хв· мг білка		Супероксидний радикал, нмоль/хв·мг білка	Дієнові кон'югати, нг/мг білка	Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка
	конститутивна	індуцибельна			
Мітохондрії					
дорослі щури	5,99 ± 0,32	1,59 ± 0,17	2,12 ± 0,36	1,8 ± 0,16	3,16 ± 0,22
старі щури	1,79 ± 0,32*	9,25 ± 0,62*	14,07 ± 1,62*	10,77 ± 1,02*	9,66 ± 0,59*
старі щури, яким вводили аміногуанідин	4,87 ± 0,34**	3,11 ± 0,13**	5,1 ± 0,34**	3,81 ± 0,11**	3,14 ± 0,42**
Плазма					
дорослі щури	5,65 ± 0,21	1,58 ± 0,27	1,1 ± 0,08	1,45 ± 0,11	2,51 ± 0,29
старі щури	1,39 ± 0,13*	6,92 ± 0,27*	6,34 ± 0,73*	4,77 ± 0,15*	7,37 ± 0,46*
старі щури, яким вводили аміногуанідин	3,65 ± 0,05**	1,14 ± 0,14**	2,81 ± 0,11**	2,04 ± 0,13**	3,16 ± 0,12**

*P < 0,05 відносно значень у дорослих тварин, **P < 0,05 відносно значень у старих тварин

процесу. Так, значення ДК у мітохондріях і плазмі при старінні перевищували контрольні у 6,0 і 3,3 раза відповідно, при цьому вміст МДА втричі був більшим як у органел, так і плазмі (див. таблицю). Натомість, на тлі зменшення активності iNOS вміст продуктів неферментативного окиснення ліпідів (ДК та МДА) знижувався, що вказує на пригнічення ПОЛ.

Ідентифікуючи мембранозв'язаний фермент NOS, що міститься в мітохондріях (mtNOS), повідомляють про різні його варіанти. Нині існування мітохондріальної ізоформи ферменту залишається дискутивним питанням. Так, за інформацією деяких авторів, ізоформа iNOS була виявлена у органелах клітин печінки і тимуса щурів, а також у мітохондріях кардіоміоцитів свині, eNOS містилася у органелах клітин скелетних м'язів і печінки щурів та nNOS описано у мітохондріях клітин скелетних м'язах щурів та серця мишей. Таким чином, сімейство mtNOS охоплює широкий спектр структурно та імунологічно різних білків, що може бути результатом транскрипційних або трансляційних модифікацій. Однак повідомлялося про відмінності у послідовності амінокислот між mtNOS та класичними ізоформами NOS [13]

Відомо, що посилення продукції супероксидного радикала і пероксиду водню у мітохондріях є наслідком реакцій NO з компонентами дихального ланцюга. Було показано, що L-аргінін може стимулювати вивільнення H_2O_2 через активацію mtNOS у органелах печінки [14]. Мітохондріальний редокс-статус тканин мозку щурів корелював зі змінами активності і рівнем експресії mtNOS: продукція пероксиду водню в мітохондріях була максимальною у новонароджених і помітно зменшувалась у дорослих тварин [13]. Ці дослідження встановлюють зв'язок між синтезом NO і виробленням активних форм кисню у мітохондріях. Отже, існує хитка межа діапазону концентрацій, в яких NO у мітохондріях здійснює або фізіологічну регуляцію, або пошкоджувальну. У наших експериментах інгібування iNOS на рівні цілого організму уповільнювало оксидативно-нітрозативний стрес і відновлювало конститутивний синтез NO у старих щурів.

У мітохондріях серця щурів, а також сироватці крові загалом контрольних дорослих щурів визначили базальний вміст сірководню, який становив 2,78 ± 0,18 та 2,56 ± 0,08

нмоль/мг білка відповідно (рис. 1). У разі старіння його вміст знижувався як у мітохондріях серця (у 1,9 раза), так і сироватці (в 1,75 раза), що може свідчити про порушення його ендогенного синтезу H_2S-синтезувальними ферментами – цистатіонін-γ-ліазою (CSE) в цитозолі та/або 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою (MPST) у мітохондріях. Раніше основним ферментом синтезу H_2S у серцево-судинній системі вважали CSE, оскільки було показано, що вона наявна у великій кількості в серці та артеріях, а саме в кардіоміоцитах, ендотеліальних і гладеньком'язових клітинах. Проте наразі вважається, що саме MPST є важливим ферментом синтезу сірководню в коронарних артеріях і клітинах серця. Ген фермента MPST експресується також у клітинах ендотелію та ГМ судин [15]. У разі пригнічення індуцибельного синтезу NO не лише відновлювався вміст сірководню у мітохондріях до значень контролю, а й помірно збільшувався (до 4,32 ± 0,23 нмоль/мг білка). За цих умов у сироватці крові також спостерігали зростання цього показника до значень 2,36 ± 0,12 нмоль/мг білка, що наближалось до таких контролю. Таким чином, ми спостерігали відновлення синтезу сірководню при старінні, ймовірно, внаслідок зниження інтенсивності нітрозативного стресу і/або можливої активації H_2S-синтизувальних ферментів. Отже, серце і судини є важливими джерелами утворення ендогенного H_2S, який безсумнівно може впливати на їх функціонування.

Нині відомо, що порушення ендогенного синтезу H_2S супроводжують розвиток таких патологічних станів, як гіпертензія, атеросклероз, діабет, серцева недостатність, нейродегенеративні захворювання тощо [16]. Більшість із цих станів характерні і частіше всього розвиваються у старих організмів, у яких синтез сірководню суттєво знижений [2, 7]. Антиоксидантні властивості сірководню ґрунтуються на його здатності вступати в реакцію з іншими сполуками, зокрема активними формами кисню, азоту, які при цьому втрачають свою активність та ушкоджувальну дію на білки або ліпіди [16, 17]. З іншого боку, сірководень стимулює антиоксидантну систему організму, підвищуючи активність їх ферментів, що в сукупності характеризує цитопротекторні ефекти газової молекули [18].

Отримані результати свідчать про те, що на тлі пригнічення індуцибельного синтезу NO, як одного із складників оксидативно-нітрозативного стресу, збільшується концентрація ендогенного H_2S у біологічно активній формі, що сприяє прояву його потужних

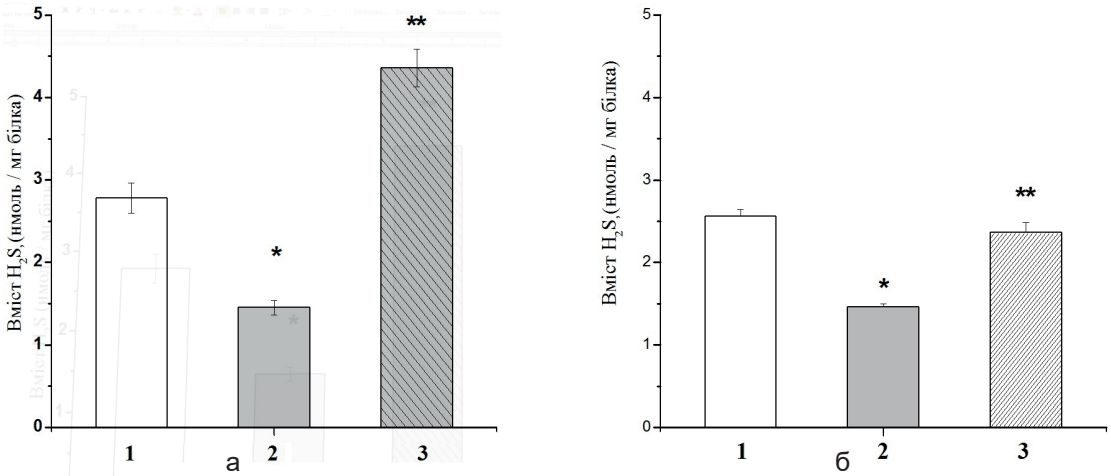

Рис. 1. Вміст сірководню у мітохондріях серця (а) і плазмі крові (б) дорослих (1) та старих (2) щурів, а також за умов введення *in vivo* інгібітора індуцибельної NO-синтази аміногуанідину (3) старим тваринам (20 мг/кг). *P < 0,05 відносно значень у дорослих тварин, **P < 0,05 відносно значень у старих тварин

антиоксидантних властивостей. Наслідком цих процесів є здатність газового медіатора нейтралізувати супероксидні радикали, а також опосередковано запобігати неферментативному окисненню ліпідів.

Як відомо, cNOS для своєї роботи потребує кофактора BH4, а її неспряження може відбуватися через дефіцит цього кофактора, виснаження субстрату L-аргініну, накопичення ендогенного інгібітора NO-синтаз – асиметричного диметиларгініну (ADMA) та S-глутатіонілювання eNOS [13]. Ймовірно, що послаблення окисних процесів на тлі відновлення ендогенного синтезу сірководню при старінні попереджає окиснення кофактора BH4 до дигідробіоптерину BH2, що може сприяти спряженій роботі cNOS і відновленню активності ферменту у цій моделі дослідження.

У нашій роботі ми застосували інгібування індуцибельного синтезу NO, щоб оцінити його участь у відкриванні МП та ендотелійзалежному розслабленні гладеньких м'язів аорти старих щурів. У дослідах *in vitro* на ізольованих мітохондріях для активації відкривання МП у серці використовували природний індуктор Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л. Зміни амплітуди спонтанного набухання мітохондрій (контроль у безкальцієвому середовищі), кальційіндукованого набухання органел, що відбувалося внаслідок відкривання МП, та за умов інгібування *in vivo* ферменту iNOS у серці старих щурів показано на рис. 2. Спостерігали зменшення амплітуди Ca^{2+}-індукованого набухання ізольованих мітохондріях серця старих щурів у разі пригнічення індуцибельного синтезу оксиду азоту у них. Цей факт може свідчити про зниження проникності мембран мітохондрій до індукторів з віком за досліджуваних умов. Крім того, використовування аміногуанідину сприяло зниженню чутливості МП до індуктора, як це продемонстровано на рис. 3. Показано дозозалежний ефект дії Ca^{2+} (10^{-7}–10^{-4} моль/л) на набухання мітохондрій серця у різних груп тварин. При цьому у старих щурів чутливість органел до кальцію підвищувалася (рис. 3, крива 2). Натомість у разі дії аміногуанідину спостерігали зниження цього показника внаслідок підвищення порогової його концентрації, яка призводить до набухання органел. Вважаємо, що насамперед відновлення концентрації мітохондріального оксиду азоту і зростання ендогенного сірководню ініціювало мітопротекторні механізми, які дали змогу попере-

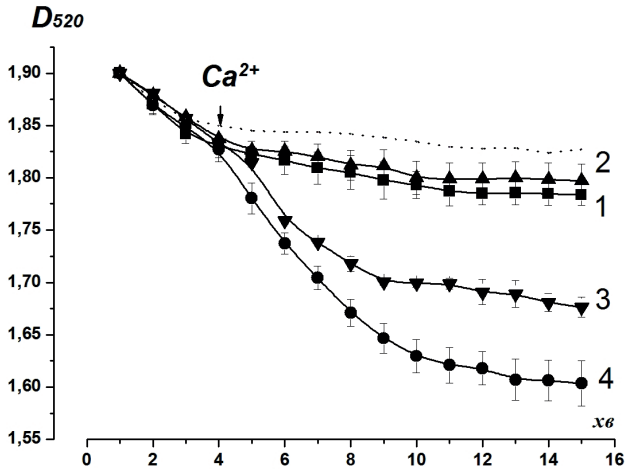

Рис. 2. Зміни оптичної щільності суспензії мітохондрій серця старих щурів за умов дії індуктора мітохондріальної пори Ca^{2+} та після введення *in vivo* інгібітора індуцибельної NO-синтази аміногуанідину: 1 – контроль (старі щури); 2 – дія аміногуанідину (20 мг/кг) у безкальцієвому середовищі; 3 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 4 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) і введення аміногуанідину; пунктиром показаний контроль (дорослі щури)

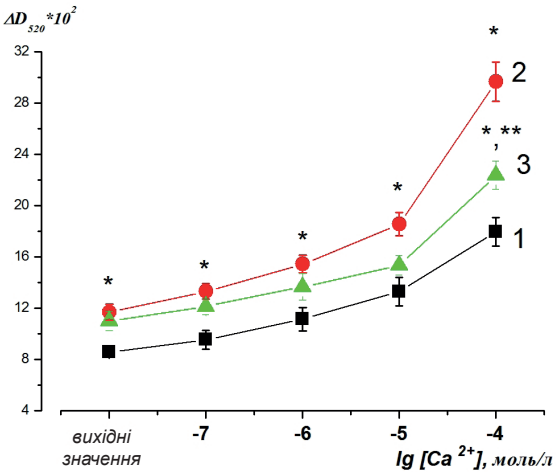

Рис. 3. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора Ca^{2+} у серці дорослих (1) та старих (2) щурів, а також за умов введення *in vivo* інгібітора індуцибельної NO-синтази аміногуанідину (3) старим тваринам (20 мг/кг). *P < 0,05 відносно у дорослих тварин, **P < 0,05 відносно значень у старих тварин

дити дисфункцію органел.

Таким чином, у цих дослідах спостерігали зниження чутливості МП до індуктора Ca^{2+}. Аналізуючи отримані результати досліджень, ми припускаємо активацію процесу біосинтезу сірководню, а також відновлення конститутивного синтезу оксиду азоту, які беруть участь у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, що може бути важливим регуляторним фактором у розвитку серцево-судинних захворювань.

На препаратах грудної аорти показали суттєве зниження (9,6 ± 2,6%) амплітуди розслаблення у старих щурів. Введення цим тваринам аміногуанідину призводило до збільшення майже втричі амплітуди розслаблення ГМ (26,4 ± 2,8%) порівняно зі старими контрольними тваринами (9,6 ± 2,6%; рис. 4). Отже, за умов пригнічення індуцибельного синтезу NO відновлювалася знижена у старих тварин ендотеліальна функція. Припускаємо, що у відновленні ендотелійзалежної вазодилатації у старих щурів також задіяні H_2S- і NO-залежні механізми.

Відомо, що газові трансмітери сірководень і оксид азоту відіграють важливу біологічну роль у регуляції фізіологічних функцій організму, зокрема тонусу кровоносних судин. Вони можуть взаємно впливати один на одного як на рівні спільних мішеней дії, так і ферментів синтезу. H_2S здебільшого реалізує свою дію через активацію АТФ-залежних калієвих каналів ГМ. Наразі він відіграє роль ендотелійзалежного гіперполяризуючого фактора, який індукує розслаблення ГМ судин. NO, як основний ендотелійзалежний вазодилататор, активує гуанілатциклазу, наслідком чого є утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), який також має властивість розслабляти ГМ судин [19]. Газові трансмітери можуть посилювати клітинні ефекти один одного. Так, донор сірководню здатен взаємодіяти із eNOS, збільшуючи генерацію NO, внаслідок чого зменшується рівень оксидативного стресу та апоптозу. Це сприяє цитопротекторній дії та захисту судин та серця під час серцево-судинних захворювань [20].

Результати досліджень свідчать про участь конститутивного синтезу NO та ендогенного H_2S на тлі уповільнення окисних процесів у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран у серці та судинних реакціях аорти у старих щурів, що може бути важливим регуляторним фактором у попередженні серцево-судинних захворювань. Отже, у разі старіння аміногуанідин чинить стабілізуючу дію на мембрани мітохондрій,

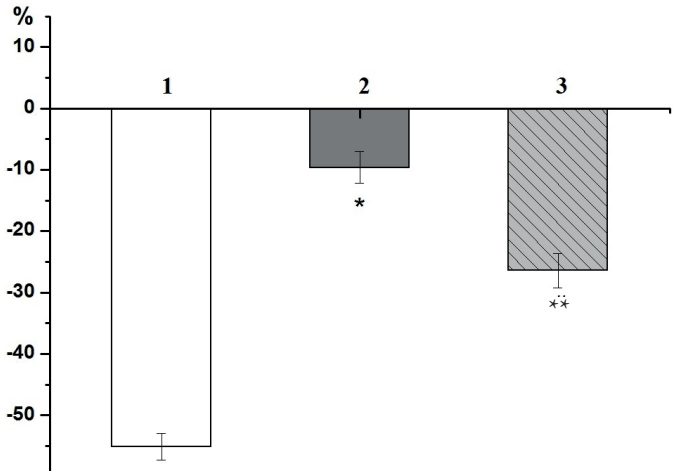

Рис. 4. Вплив аміногуанідину на ацетилхоліндуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів: 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури, яким вводили аміногуанідин (20 мг/кг). *P < 0,05 відносно у дорослих тварин, **P < 0,05 відносно значень у старих тварин

підвищуючи тим самим резистентність органел до індуктора МП – іонів кальцію та відновлюючи знижену у старих тварин ендотеліальну функцію.

ВИСНОВКИ

1. За умов курсового введення аміногуанідину старим щурам суттєво знижувалася активність індуцибельного синтезу оксиду азоту в плазмі та мітохондріях серця, що підтверджує його інгібіторні властивості.

2. На тлі зменшення активності iNOS пригнічувався окисний стрес, в тому числі ПОЛ, що супроводжувалося частковим відновленням активності cNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові старих щурів.

3. Застосування аміногуанідину призводило до відновлення у плазмі крові та мітохондріях серця старих щурів вмісту H_2S, який є потужним ліпофільним антиоксидантом, і, ймовірно, біологічним модулятором роботи деяких ферментів.

4. За цих умов у серці старих тварин значною мірою зменшувалася чутливість МП до Ca^{2+}, що характеризується підвищення порогової концентрації індуктора, який спричиняє набухання органел. Ми припускаємо участь H_2S і NO у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, що може бути важливим регуляторним фактором у попередженні серцево-судинних захворювань.

5. Пригнічення індуцибельного синтезу NO у старих щурів збільшувало амплітуду розслаблення ГМ грудної аорти, що свідчить про відновлення зниженої з віком ендотеліальної функції.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Н. А. Струтинская, А. Ю. Лучковая, Л. А. Мысь, Ю. В. Коркач, В. Ф. Сагач

АМИНОГУАНИДИН ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЭНДОГЕННЫЙ СИНТЕЗ СЕРОВОДОРОДА, КОНСТИТУТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА, ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМУЮ ВАЗОДИЛАТАЦИЮ И УГНЕТАЕТ ОТКРЫВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС

Показано, что развитие старения сопровождается существенным уменьшением активности конституитивной Ca^{2+}/кальмодулинзависимой NO-синтазы (cNOS) на

фоне увеличения кальцийнезависимого индуцибельного синтеза оксида азота (iNOS) и маркеров окислительного стресса (супероксидного радикала, диеновых конъюгатов и малонового диальдегида). Применение аминогуанидина как ингибитора iNOS (20 мг/кг) значительно снижало активность iNOS, что приводило к восстановлению конститутувного синтеза NO в сердечно-сосудистой системе старых животных. При этом мы наблюдали активацию эндогенного синтеза сероводорода (H_2S), который является мощным липофильным антиоксидантом и биологическим модулятором некоторых ферментов. Так, его содержание в плазме крови старых крыс восстанавливалось до значений контроля и составило 2,36 ± 0,12 нмоль /мг белка, а в митохондриях увеличилось у 1,5 раза (4,32 ± 0,23 нмоль/мг белка) по сравнению со взрослыми животными (2,78 ± 0,18 нмоль/мг белка). Увеличение конститутивного синтеза NO и H_2S, известных модуляторов неспецифической митохондриальной поры (МП), приводило к уменьшению ее чувствительности к индуктору Ca^{2+}, что характеризовалось повышением пороговой концентрации индуктора, который приводит к набуханию митохондрий сердца у старых животных. Протекторные эффекты аминогуанидина у старых крыс проявлялись также в существенном увеличении почти в три раза амплитуды расслабления гладких мышц аорты, что свидетельствует о восстановлении пониженной с возрастом эндотелиальной функции. Таким образом, применение аминогуанидина у старых крыс приводило к усилению конститутивного синтеза оксида азота и эндогенного сероводорода на фоне замедления окислительных процессов, что способствовало ингибированию МП в сердце и восстановлению эндотелийзависимого расслабления сосудов аорты.

Ключевые слова: аминогуанидин; конститутивная NO-синтаза; сероводород; митохондриальная пора; вазодилатация.

N.A. Strutynska, Yu.V. Korkach, L.A. Mys, A.Yu. Luchkova, V.F. Sagach

AMINOGUANIDINE RESTORES ENDOGENOUS HYDROGEN SULFIDE SYNTHESIS, CONSTITUTIVE NITRIC OXIDE SYNTHESIS, ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASODILATION AND INHIBITS MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN THE HEART OF OLD RATS

It has been shown that the development of aging is accompanied by a significant decrease in the activity of constitutive Ca^{2+}/calmodulin-dependent NO-synthase (cNOS) against the increasing of an inducible calcium-dependent synthesis of nitric oxide (iNOS) and formation of oxidative stress markers (superoxide radical, diene conjugates and malonic dialdehyde). The use of aminoguanidine as an iNOS inhibitor (20 mg/kg) significantly reduced iNOS activity, leading to the restoration of constitutive NO synthesis in the cardiovascular system of old animals. In doing so, we observed an activation of endogenous hydrogen sulphide (H_2S) synthesis, which is a potent lipophilic antioxidant and a biological modulator of some enzymes. Thus, its content in the blood plasma of old rats was restored to the same values as in adult rats and amounted to 2.36±0.12 nmol/mg of protein, and the values of mitochondrial hydrogen sulfide increased 1.5 times (4.32±0.23 nmol/mg of protein) compared with adult animals (2.78 ± 0.18 nmol/mg of protein). The increase in constitutive synthesis of NO and H_2S, well known modulators of nonspecific mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, led to a decrease in its sensitivity to Ca^{2+}. This was characterized by an increase in the threshold concentration of the inducer which leads to swelling of the mitochondria of the heart in old animals. The protective effects of aminoguanidine were also manifested in a significant increase (almost threefold) in the aortic relaxation amplitude in old rats (26.4±2.8%) if compared with old animals (9.6±2.6%). This indicates the recovery of decreased endothelial function in old rats. Thus, the use of aminoguanidine in old rats led to an increase in the constitutive nitric oxide and endogenous hydrogen sulfide synthesis against the slowing oxidative processes, which contributed to the inhibition of mPTP in the heart and the restoration of endothelium-dependent relaxation of aortic vessels.

Key words: aminoguanidine; cNOS; hydrogen sulphide; mPTP; vasodilation.

Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine; e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua

REFERENCES

1. Bryan NS, Lefer DJ. Update on gaseous signaling molecules nitric oxide and hydrogen sulfide: strategies to capture their functional activity for human therapeutics. Mol Pharmacol. 2019 Jul;96(1):109-14.
2. Rajendran S, Shen X, Glawe J, Kolluru GK, Kevil CG. Nitric oxide and hydrogen sulfide regulation of ischemic vascular growth and remodeling. Compr Physiol. 2019 Jun 12;9(3):1213-47.
3. Roe ND and Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. Vasc Pharm. 2012;57:168-72.
4. Strutynska NA, Kotsiuruba AV, Budko AYu, Mys LA, Sagach VF. Mitochondrial dysfunction in the aging heart is accompanied by constitutive no-synthases uncoupling on the background of oxidative and nitrosative stress. Fiziol Zh. 2016; 62(2):3-11 [Ukraininan].
5. Li H, Forstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. Curr Opinion in Pharm. 2013;13:1-7.
6. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca^{2+}-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. Fiziol Zh. 2011; 57(6):3-13. [Ukraininan].
7. Drachuk KO, Kotsjuruba AV, Sagach VF. Hydrogen sulfide donor, NaHS, recovers constitutive NO synthesis and

endothelium-dependent relaxation of isolated aorta in old rats. Fiziol Zh. 2015; 61(6):3-10. [Ukrainian].
8. Nilsson BO. Biological effects of aminoguanidine: an update. Inflamm Res. 1999;48(10):509-15.
9. Beheshti F, Hosseini M, Taheri Sarvtin M, Kamali A, Anaeigoudari A. Protective effect of aminoguanidine against lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity and liver dysfunction in rat. Drug Chem Toxicol. 2019;29:1-7.
10. Chen C, Yun XJ, Liu LZ, Guo H, Liu LF, Chen XL. Exogenous nitric oxide enhances the prophylactic effect of aminoguanidine, a preferred iNOS inhibitor, on bleomycin-induced fibrosis in the lung: Implications for the direct roles of the NO molecule in vivo. Nitric Oxide. 2017;1;70:31-41.
11. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. Anal Biochem. 1980;107:51-5.
12. Tkachenko MM, Sahach VF, Kotsiuruba AV, Baziliuk OV, Bukhanevych OM, Mehed' OF, et al. Endothelium-dependent contractile reactions of vascular smooth muscles and content of oxygen free radicals in aging rats. Fiziol Zh. 2002; 48(4):3-13.
13. Riobo NA, Melani M, Sanjuan N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ. The Modulation of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase Activity in Rat Brain Development. J Biol Chem. 2002;277(45):42447-55.
14. Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, Giulivi, C. The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. J Biol Chem. 2001; 276, 6945-9.
15. Kuo MM, Kim DH, Jandu S, Bergman Y. Tan S, Wang H, Pandey DR, Abraham TP, Shoukas AA, Berkowitz DE, Santhanam L. MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016;310:H71-9.
16. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol Rev, 2012;92:791-896.
17. Liu Y-H, Lu M, Hu, L-F, Wong PT-H, Webb GD, Bian J-S. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. Antioxidants & Redox Signaling. 2012;17(1):141-85.
18. Wang R. Hydrogen sulfide: a new EDRF. Kidney Int. 2009; 76(7):700-4.
19. Sun, WH, Liu F, Chen Y, Zhu YC. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. Biochem and Biophys Res Comm, 2012;421(2):164-9.
20. Polhemus, DJ, Lefer DJ. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. Circul Res. 2014;114:730-7.

Матеріал надійшов
до редакції 19.09.2019