

Вплив пропаргілгліцину на ендотелійзалежне розслаблення судин і утворення супероксидного аніона при старінні

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

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

Вивчали вплив інгібітора цистатіонін- γ -ліазазалежного шляху синтезу сірководню (H_2S), пропаргілгліцину на ендотелійзалежне розслаблення судин та активність основних шляхів утворення супероксидного аніона, індуктора оксидативного стресу у старих тварин. У досліді показано, що у старих тварин ацетилхолін індукване ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти пригнічене ($7,5 \pm 1,4\%$) порівняно з дорослими ($64,9 \pm 3,5\%$). Додавання до перфузату пропаргілгліцину призводило до покращення, середнє значення амплітуди збільшувалось з $7,5 \pm 1,4$ до $44,5 \pm 3,2\%$. Ці ефекти супроводжувалися зниженням в тканинах аорти вмісту супероксидного аніона через пригнічення активності ксантинооксидазного шляху його утворення.

Ключові слова: старіння; ендотелійзалежне розслаблення; оксидативний стрес; супероксидний аніон; пропаргілгліцин.

ВСТУП

Оксид азоту (NO) – ключовий фактор, що забезпечує нормальну реалізацію ендотелійзалежного розслаблення. Основним шляхом синтезу NO в судинах є окисний метаболізм L-аргініну під дією кальційзалежної конститутивної NO-синтази. Цей фермент активується при дії хімічних факторів (ацетилхолін, брадикінін, естрогени, інсулін тощо) або при збільшенні “напруження зсуву”. Синтезований в ендотелії NO дифундує в гладенькі м’язи (ГМ), активує гуанілатциклазу і збільшує утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ). У результаті активується цГМФ-залежна протеїнкіназа, яка стимулює відтік внутрішньоклітинного Ca^{2+} і розслаблення ГМ [1]. Існують докази і про прямий релаксуючий вплив NO на ГМ, при якому відбувається цГМФ-незалежна активація Ca^{2+} -АТФ-ази саркоплазматичного ретикула і зменшення вмісту цитозольного Ca^{2+} [2]. Головною причиною порушення ендотелійзалежного розслаблення є змен-

шення біодоступності NO. Останнє виникає, зокрема, через оксидативний стрес [3].

Однією із речовин, яка пригнічує оксидативний стрес і потенційно може відновлювати біодоступність NO та ендотелійзалежне розслаблення є пропаргілгліцин. Він є інгібітором цистатіонін- γ -ліази, одного із трьох ферментів синтезу сірководню [4]. Показано здатність пропаргілгліцину зменшувати вміст супероксидного аніона ($\cdot O_2^-$) в тканинах серця старих тварин та покращувати діастолічну функцію [5].

Метою нашої роботи було дослідити вплив пропаргілгліцину на ендотелійзалежне розслаблення судин, вміст $\cdot O_2^-$ та активність основних шляхів його утворення у старих шурів.

МЕТОДИКА

Фізіологічні дослідження. Досліди проводили на ізольованих препаратах грудної аорти шурів-самців лінії Вістар віком 8 міс (дорослі, n = 10) та 22–24 міс (старі, n = 20), масою 300–370 г з дотриманням усіх вимог щодо роботи

з лабораторними тваринами (міжнародна конвенція, Страсбург, 1986).

Для цих досліджень у щурів виділяли грудну аорту, нарізали на кільцеві препарати і за загальноприйнятою методикою в режимі, наближеному до ізотонічного, реєстрували скорочувальну активність ГМ[6]. Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину додавали норадреналін (10^{-5} моль/л, "Sigma", США). Стійкий рівень норадреналінзалежного скорочення («плато») приймали за 100%. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скоротливих реакцій ГМ аорти на ацетилхолін (10^{-5} моль/л, "Sigma", США). Пропаргілгліцин (10^{-3} моль/л, "Sigma", США) використовували для інкубації кільцевих препаратів аорти (30 хв), а також додавали в перфузійні розчини на час експерименту.

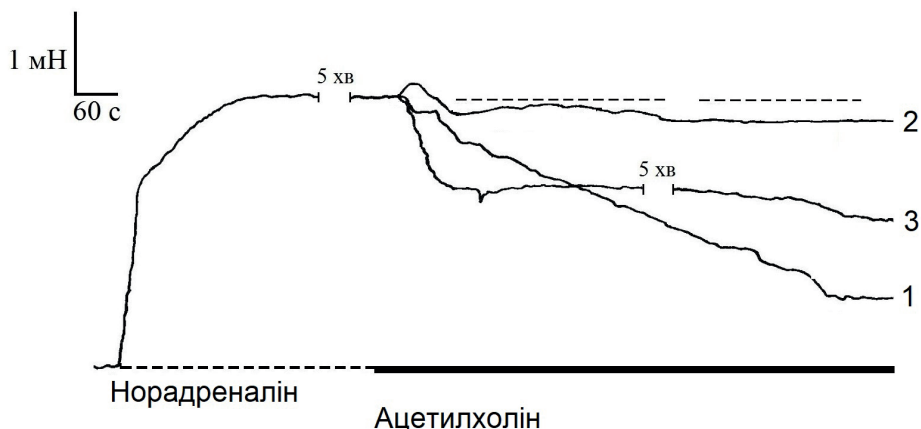
Біохімічні дослідження. Дослідження проведено за допомогою спектрофотометричного методу. В тканинах аорти дорослих і старих щурів визначали пули $\cdot O_2^-$ та активність основних шляхів його утворення: циклооксигеназного (маркер тромбоксан B_2-TxV_2), ліпооксигеназного (маркер лейкотрієн C_4 (LTC_4)) та ксантиноксидазного (маркер сечова кислота) [7, 8]. Також вивчали зміни

цих показників у групі старих тварин, яким за 30 хв до початку експерименту вводили пропаргілгліцин (внутрішньоочеревинно, 11,3 мг/кг). Така доза за нашими підрахунками давала змогу досягти концентрації його в крові 10^{-3} моль/л, що використовувалася у фізіологічних дослідженнях.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP) та Origin 6.0 (Microcall Inc., США). Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фізіологічні дослідження. Показано, що додавання ацетилхоліну (10^{-5} моль/л) до буферного розчин завжди викликало типове розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ грудної аорти дорослих щурів. Середнє значення амплітуди становило $64,9 \pm 3,5\%$ (рисунок). У старих щурів дія ацетилхоліну викликала розслаблення ГМ грудної аорти, амплітуда якого була майже в 9 разів меншою за контроль. Середнє її значення становило $7,5 \pm 1,4\%$ ($n = 10$). Додавання до перфузату пропаргілгліцину призвело до суттєвого покращення ($44,5 \pm 3,2\%$; $n = 10$;



Нативні криві впливу пропаргілгліцину на ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів: 1 – дорослі щури; 2 – старі; 3 – старі після дії пропаргілгліцину. За всією абсцис – час; за всією ординат – напруження, розвинуте препаратом. Темна лінія під кривими – тривалість дії ацетилхоліну (10^{-5} моль/л), переривчаста – вихідний рівень (внизу) тонічного напруження ГМ і заданий рівень (зверху) їх активації після введення норадреналіну, що приймається за 100%

див. рисунок) ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти старих щурів. Раніше проведені експерименти показали відсутність впливу пропаргілгліцину на розслаблення судин у дорослих тварин.

Основною причиною порушення ендотелійзалежного розслаблення при старінні є оксидативний стрес. Посилене утворення $\cdot\text{O}_2^-$ призводить до окиснення 1) тетрагідробіоптерину – кофактора cNOS [9] і 2) глутатіону із наступним глутатіонуванням молекули cNOS [10, 11]. Наслідком цих двох процесів є неспряження (uncoupling) стану cNOS. Останній при цьому утворює $\cdot\text{O}_2^-$ замість NO [12], що, з одного боку, призводить до зниження конститутивного синтезу NO і порушення ендотелійзалежного розслаблення, а з іншого – до появи хибного (самопідсилюючого) кола утворення $\cdot\text{O}_2^-$ і прогресування оксидативного стресу. Таким чином, засоби, що пригнічують продукування $\cdot\text{O}_2^-$, мають зменшувати розвиток оксидативного стресу, відновлювати спряжений стан cNOS та покращувати ендотелійзалежне розслаблення судин.

Біохімічні дослідження. Як видно з таблиці, в тканинах аорти старих щурів дійсно розвивався оксидативний стрес. Так, сумарна швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ перевищувала значення у дорослих в 5,8 раза. Ми визначили інтенсивність декількох основних шляхів утворення радикала. Відомо, що важливими джерелами генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в клітині є дихальний ланцюг мітохондрій, діяльність

ксантиноксидази, циклооксигенази, ліпооксигенази, неспряженої cNOS [3, 13]. У процесі деградації пуринових нуклеотидів за участю ксантиноксидази одночасно утворюються $\cdot\text{O}_2^-$ і сечова кислота [14]. При цьому остання реакція активується в умовах гіпоксії [15]. Таким чином, сечова кислота є одночасно маркером активності ксантиноксидазного шляху продукції $\cdot\text{O}_2^-$, інтенсивності розпаду пуринових нуклеотидів, зокрема, АТФ і гіпоксії. У тканинах аорти старих щурів пули сечової кислоти перевищували значення дорослих тварин у 8,3 раза (таблиця). Пули LTC₄ маркера ліпооксигеназного генератора $\cdot\text{O}_2^-$, були більшими за контрольні значення у 2,7 раза, а пули TxB₂, маркера циклооксигеназного шляху генерації супероксиду, не відрізнялися від значення у дорослих тварин (див. таблицю).

Після введення пропаргілгліцину повністю нормалізувалась швидкість утворення $\cdot\text{O}_2^-$. Середнє її значення зменшилось в 4,2 раза. Це відбулося внаслідок зниження активності ксантиноксидазного (вміст сечової кислоти зменшився майже в 2,2 раза) шляху генерації $\cdot\text{O}_2^-$. При цьому ліпідні оксигенази на введення пропаргілгліцину не зреагували (див. таблицю). На основі цього можна зробити висновок, що саме ксантиноксидаза була основним генератором супероксиду в тканинах аорти старих щурів, а пригнічення її активності зменшило утворення $\cdot\text{O}_2^-$. Наслідком останнього і стало суттєве покращення ендотелійзалежного розслаблення.

Зміни пулів маркерів ферментативного утворення $\cdot\text{O}_2^-$ в тканинах аорти старих щурів за дії пропаргілгліцину ($M \pm m$, $n = 5$)

Група тварин	Швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, ум.од.	Тромбоксан B ₂ , пмоль/мг білка	Лейкотрієн C ₄ , пмоль/мг білка	Сечова кислота, нмоль/мг білка
Дорослі щури	4,58 ± 0,77	1,88 ± 0,32	0,65 ± 0,05	5,16 ± 0,83
Старі щури	26,67 ± 3,01*	2,26 ± 0,27	1,78 ± 0,28*	42,7 ± 5,75*
Старі щури, яким вводили пропаргілгліцин	6,36 ± 0,65**	1,28 ± 0,13	1,04 ± 0,12	19,5 ± 2,7***

*різниця достовірна ($P < 0,05$) щодо значення у дорослих, **щодо значення у старих щурів.

ВИСНОВКИ

1. Пропаргилгліцин, інгібітор цистатіонін- γ -ліази, одного із трьох ферментів синтезу сірководню, суттєво покращував пригнічене у старих щурів ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти.

2. Встановлений ефект зумовлений пригніченням активності ксантиоксидази і зменшенням утворення супероксидного аніона, ініціатора оксидативного стресу.

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.

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

ВЛИЯНИЕ ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА НА ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ СОСУДОВ И АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ ПУТЕЙ ОБРАЗОВАНИЯ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОНА ПРИ СТАРЕНИИ

Снижение биодоступности NO в сосудах при старении приводит к нарушению эндотелийзависимого расслабления и повышению риска таких заболеваний, как атеросклероз, артериальная гипертензия, диабетическая ангиопатия и др. Изучали влияние ингибитора цистатіонін- γ -ліазазависимого пути синтеза сероводорода (H_2S), пропаргилгліцину на ендотелійзависимое расслабление сосудов и активность основных путей образования супероксидного аниона, индуктора оксидативного стресса, у старых животных. Опыты показали, что у старых животных ацетилхолининдуцированное эндотелійзависимое расслабление гладких мышц аорты снижено ($7,5 \pm 1,4\%$) по сравнению со взрослыми ($64,9 \pm 3,5\%$). Добавление к перфузату пропаргилгліцину приводило к его улучшению, среднее значение амплитуды увеличивалось с $7,5 \pm 1,4$ до $44,5 \pm 3,2\%$. Данные эффекты сопровождалось снижением в тканях аорты содержания супероксидного аниона через подавление активности ксантиоксидазного пути его образования. Ключевые слова: старение; эндотелійзависимое расслабление; оксидативный стресс; супероксидный анион; пропаргилгліцин.

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

THE EFFECT OF PROPARGYLGLYCINE ON THE ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION AND ACTIVITY OF MAIN SOURCES OF SUPEROXIDE ANION GENERATION DURING AGING

Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail:8701dk@ukr.net

The objective of the present study was to investigate the effect of propargylglycine (PAG), an inhibitor of the CSE-dependent pathway of hydrogen sulfide synthesis, on the endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle (SM) in old rats. It was found a violation of SM relaxation in this group of animals. The average value of its amplitude was $7.5 \pm 1.4\%$ compared with $64.9 \pm 3.5\%$ in healthy adult rats. PAG significantly improved endothelium-dependent relaxation in old rats, the average value of its amplitude increased from $7.5 \pm 1.4\%$ to $44.5 \pm 3.2\%$. This effect was due to suppression of superoxide anion generation by inhibition of xanthine oxidase activity.

Key words: aging; endothelium-dependent relaxation; oxidative stress; superoxide anion; propargylglycine.

REFERENCES

1. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):525-63.
2. Van Hove CE, Van der Donck C, Herman AG, Bult H, Franssen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):920-30.
3. El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol.* 2012;28,3:132.
4. Asimakopoulou A. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE) 2013.
5. Drachuk KO, Dorofeyeva NA, Kotsjuruba AV, Sagach VF. Effect of propargylglycine upon cardiohemodynamics in old rats. *FiziolZh.* 2015;61(4):35-40. [Ukrainian].
6. Sagach VF, Bondarenko AI, Bazilyuk OV, Kotsuruba AV. Endothelial dysfunction: Possible mechanisms and ways of correction. *Exp Clin Cardiol.* 2006;11(2):107-10.
7. Sharipov RR, Kotsjuruba AV, Kop'jak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *FiziolZh.* 2014;60(3):11-7. [Ukrainian].
8. Dorofeyeva NA, Kotsuruba AV, Kop'jak BS, Sagach VF. Physical exercise training cancels constitutive NOS uncoupling and induced violations of cardiac hemodynamics

- in hypertension (part III). Fiziol Zh. 2015;61(4):11-21. [Ukrainian].
9. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. Free Radic Res. 2003;37(2):121-7.
 10. Galougahi KK, Liu CC, Gentile C, Kok C, Nunez A, Garcia A, et al. Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. J Am Heart Assoc. 2014;3(2):e000731.
 11. Hill BG, Bhatnagar A. Protein S-glutathiolation: redox sensitive regulation of protein function. J Mol Cell Cardiol. 2012;52(3):559-67.
 12. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. Cardiovascul Res. 2005;66(2):286-94.
 13. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabino-vitchPS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. LongevHealthspan.2014;6(3).
 14. Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, Nawata H, Utsumi H. Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. Free Radic Res. 2003;37(3):767-72.
 15. Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei D, Repine JE. Hypoxia injures endothelial cells bu increasing endogenous xanthine oxidase activity. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(8):3362-6.

*Матеріал надійшов до
редакції 01.06.2020*