

ИНГИБИРОВАНИЕ ЦИСТАТИОНИН-Υ-ЛИАЗЫ УВЕЛИЧИВАЕТ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ СТАРЫХ КРЫС

*Драчук К.О., Коцюруба А.В., Добровольский Ф.В., Сагач В.Ф.
Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

Известно, что при старении увеличивается риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Одной из причин этого является развивающаяся с возрастом дисфункция эндотелия, обусловленная многочисленными нарушениями, в т.ч., синтеза оксида азота. В последнее время в литературе появляется все больше данных о кардио- и васкуло- протекторном действии сероводорода (H_2S) [3]. Данный газ относится к семейству газовых трансммиттеров, как NO и CO. Уникальность газовых трансммиттеров состоит в том, что они с легкостью проникают через клеточные мембраны, не связываются ни с какими рецепторами на поверхности клетки и взаимодействуют непосредственно с внутриклеточными структурами [4]. Одним из ферментов *de novo* синтеза H_2S в сосудистой системе является цистатионин- γ -лиаза (CSE), которая в значительной степени ингибируется пропаргилглицином (ПГ). Целью нашей работы было показать влияние блокады CSE-зависимого пути синтеза H_2S на эндотелий зависимое расслабление гладких мышц (ГМ) сосудов у старых животных.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на крысах линии Вистар-Киото возрастом 6 (взрослые) и 24 мес. (старые), массой 300-350 г ($n=16$).

Физиологические исследования. У крыс разного возраста выделяли грудную аорту, нарезали кольцевые сегменты и за общепринятой методикой, в режиме близкому к изотоническому, регистрировали сократительную активность ГМ на эндотелий зависимый агонист [1]. Активация выделенных препаратов осуществлялась путем добавления к раствору для перфузии раствора норадреналина (НА, $10^{-5}M$). Стойкий уровень НА-зависимого сокращения ("плато") принимали за 100%. От него проводили расчеты изменения амплитуды эндотелийзависимых сократительных реакций ГМ аорты на ацетилхолин (АХ, $10^{-5}M$). Активность фермента CSE угнетали с помощью ПГ в концентрации $10^{-4}M$ путем инкубации сегмента аорты в течение 30 мин и добавления блокатора в растворы для перфузии, содержащие НА и АХ.

Биохимические исследования. В опытах *in vivo* ПГ ($10^{-5}M$) вводили внутримышечно за 30 мин до забоя животных. Биохимические показатели определяли в плазме крови и митохондриях (Мх) сердца крыс разного возраста по известным методикам, описанным ранее [2]. Содержание нитрит-аниона определяли с помощью реактива Грисса, активность NOS (*de novo* синтеза NO) по цитруллину, интенсивность ПОЛ по количеству маркеров - ДК и МДА. Пулы H_2S определяли колориметрически с N,N-DPD [5]. К аликватам проб добавляли 0,5 мл 1% р-ра ацетата цинка, инкубовали при

37,5°C в течении 10 мин., далее добавляли 0,5 мл 20 mM р-ра N,N-DPD и 0,5 мл 30 mM р-ра FeCl₃. После 10 мин. инкубации в темноте на холоде определяли оптическую плотность при 670 нм и количество H₂S по калибровочной кривой, построенной для NaHS.

Результаты и их обсуждение. Эксперименты на изолированных сегментах грудной аорты крыс разного возраста показали, что воздействие эндотелий зависимого вазодилатора АХ приводит к менее выраженному расслаблению гладких мышц аорты (ГМА) у старых животных (12,4%) чем у взрослых (66,3%). Добавление ПГ показало увеличение ($P < 0,05$) амплитуды расслабления ГМА старых животных с 12,4% до 49,5% (Рис.).

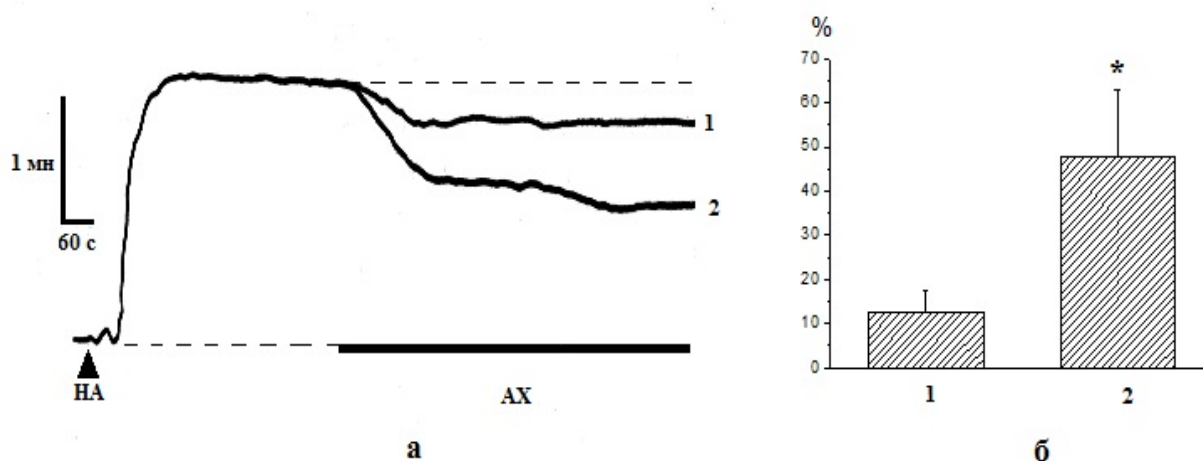


Рисунок. Влияние ацетилхолина на сократительную активность преактивированных норадреналином ГМ грудной аорты старых крыс в контроле (1) и после введения пропаргилглицина (2); а – нативная кривая, б – средние значения.

Использование ПГ в той же концентрации в опытах *in vivo* приводило к парадоксальным изменениям исследованных биохимических показателей в плазме крови и митохондриях сердца старых животных. В первую очередь, следует отметить снижение в плазме старых животных до 40% от уровня взрослого контроля, принятого за 100%, стационарных циркулирующих пулов H₂S. Транзиторные внутримитохондриальные пулы H₂S в сердце старых животных полностью нормализовались после кратковременного введения ПГ, увеличиваясь с 52% до 111% от контрольного, а не ещё больше уменьшаясь, как можно было ожидать. При этом синхронно увеличивались сниженные у старых животных митохондриальные пулы NO₂⁻ (от 54% до 141%) и, наоборот, снижались увеличенные пулы маркеров ПОЛ – ДК (от 228% до 48%) и МДА (от 264% до 106% контрольного уровня). При воздействии ПГ в сердечных Мх также наблюдали увеличение сниженной активности cNOS (с 31% до 92%) и, наоборот, уменьшение увеличенной активности iNOS (с 763% до 401%).

Таким образом, использование ПГ приводило к увеличению продукции двух мощных вазодилаторов - H₂S и NO в сердечных митохондриях и восстановлению эндотелий зависимого расслабления ГМ аорты у старых

животных. Эффекты, оказываемые каждой из этих молекул на живой организм хорошо известны и описаны, но механизм их взаимодействия друг с другом до конца не установлен. Имеются данные, что H_2S стимулирует образование фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [6]. Зная механизм действия VEGF на клетки эндотелия, можем предположить, что H_2S через VEGF активирует PI3K/Akt сигнальный путь, в результате чего происходит фосфорилирование и активация eNOS и увеличение продукции NO. Дискутабельным остается вопрос о причине увеличения продукции H_2S при блокаде одного из трех ферментов его *de novo* синтеза в сердечно-сосудистой системе. Возможно, происходит активация альтернативных путей синтеза сероводорода, или имеет значение антиоксидантная активность ПГ. Для подтверждения или опровержения данной гипотезы нами продолжена работа в этом направлении.

Литература

1. Ендотелійзалежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у щурів за умов старіння / М.М. Ткаченко [та ін.] // Фізіол. журн. – 2002. – 48, №4. – С. 3–13.
2. Вплив еналаприлу на синтез оксиду азоту, окисний метаболізм і тонус судин у старих щурів / В.Ф. Сагач [та ін.] // Фізіол. журн. – 2007. – 53, № 4. – С. 15–26.
3. Madhav, Lavu Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential / Madhav Lavu, Shashi Bhushan, David J. Lefer // Clin. Sci. – 2011. – 120. – P. 219–229.
4. Benjamin, L. Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine / Benjamin L. Predmore, David J. Lefer, Gabriel Gojon // Antiox. Redox Signal. – 2012. – 17, №1. – P. 119–140.
5. Modified methylene blue method for measurement of hydrogen sulfide level in plasma / Zheng, Y [et al.] // Sheng Li Xue Bao. – 2012. – 64(6). – P. 681–686.
6. Bir S.C., Kolluru G.K., McCarthy P. Hydrogen Sulfide Stimulates Ischemic Vascular Remodeling Through Nitric Oxide Synthase and Nitrite Reduction Activity Regulating Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Angiogenesis // J. Am. Heart Assoc. – 2012. – 1(5).

СПОСОБ ОЦЕНКИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ, СОХРАНЕННОГО НА ПОВЕРХНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО ФРАГМЕНТА СОСУДА

Паталах И.И., Таланов С.А., Сагач В. Ф.

*Институт биохимии имени О.В. Палладина НАН Украины, г. Киев
Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

Активация клеток эндотелиального слоя сосудистой стенки провоспалительными и прооксидантными агентами лежит в основе таких патологических изменений, как дезинтеграция эндотелия, усиление его адгезивных и агрегационных свойств, развитие провоспалительных ответных реакций. Активированные эндотелиоциты изменяют свой фенотип, теряя защитные функции и начиная продуцировать провоспалительные интерлей-