© Заічко Н.В., Юрченко П.О.

УДК: 546.221.1: 616.83: 616.153

Заічко Н.В., Юрченко П.О.
Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, кафедра біологічної та загальної хімії (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

ВПЛИВ ВІТАМІНІВ B_6, B_9, B_{12} ТА ЕСМІНУ НА СИСТЕМУ ГІДРОГЕНСУЛЬФІДУ В МОЗКУ ЩУРІВ З ІЗОЛЬОВАНОЮ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ

Резюме. *Досліджено вплив вітамінів B_6, B_9, B_{12} та полімікроелементного препарату есміну на вміст H_2S, активність H_2S-*

синтезуючих ензимів та показники утилізації H_2S в мозку щурів з ізольованою гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ). Показано, що застосування композиції вітамінів B_6, B_9, B_{12} у поєднанні з есміном викликає найбільший гіпогомоцистеїнемічний ефект, запобігає зниженню активності H_2S-синтезуючих ензимів, порушенню процесів утилізації H_2S та формуванню дефіциту H_2S в мозку щурів за умов ГГЦ.

Ключові слова: *гомоцистеїн, гідрогенсульфід, вітаміни, мікроелементи, есмін, мозок.*

Вступ

Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є незалежним фактором ризику нейродегенеративних та цереброваскулярних захворювань [Пентюк та ін., 2008; Petras et al., 2014]. В процесі обміну сірковмісних амінокислот в мозку за участі В6-залежних ензимів (цистатіонін-β-синтази, цистеїнамінотрансферази) та В6-незалежних ензимів (3-меркаптопіруватсульфуртрансферази) синтезується вазоактивний медіатор, нейромодулятор, антиоксидант гідрогенсульфід (H_2S) [Kimura, 2013]. Порушення обміну H_2S можуть бути інтегровані в патогенез ГГЦ-асоційованих патологічних станів. З метою корекції ГГЦ застосовують комплекси вітамінів (переважно В6, В9, В12) та мікроелементів (цинк, селен та ін.), що входять до складу ензимів обміну гомоцистеїну (ГЦ) та/або проявляють антиоксидантний ефект [Пентюк та ін., 2008]. Залишається невизначеним як впливають засоби з гіпогомоцистеїнемічною дією на стан системи H_2S в мозку за умов ГГЦ.

Метою роботи було встановити вплив вітамінів B_6, B_9, B_{12} та полімікроелементного препарату есміну на вміст H_2S, активність H_2S-синтезуючих ензимів та показники утилізації H_2S в мозку щурів з ізольованою ГГЦ. Есмін - це вітчизняний лікарський засіб, створений на основі композиції поліядерних комплексів мікроелементів (Fe, Cu, Zn, Co, Mn, Cr) із N-2,3-диметилфенілантраніловою кислотою та кисеньвмісних солей V, Mo, Se. Раніше було показано, що есмін зменшував вік-асоційований дефіцит H_2S в міокарді та судинах у щурів [Заічко та ін., 2014].

Матеріали та методи

Досліди проведені на 50 білих лабораторних щурах-самцях масою 250-270 г. Тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч, воду і корм отримували *ad libitum*. Під час експериментів тварин годували напівсинтетичною крохмально-казеїновою дієтою із збалансованим вмістом всіх макро- та мікронутрієнтів [Пентюк та ін., 2004]. Дослідження проведено за загальними етичними принципами експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986), інших міжнародних угод та національного законодавства.

Тварин випадковим чином розподіляли на групи, по 10 особин в кожній. Ізольовану ГГЦ (n=40) моделювали шляхом в/шл введення тіолактону D,L-гомоцистеїну (Sigma, США) в дозі 100 мг/кг маси 1% крохмальному гелі на упродовж 28 діб. Три групи щурів з метою корекції ГГЦ отримували: суміш вітамінів B_6, B_9, B_{12} (B_6 - 714 мкг, B_9 - 143 мкг, B_{12} - 14,3 мкг на 1 кг маси на добу); мікроелементний комплекс есмін (Есмін, АТ "Київський вітамінний завод") 35 мг/кг маси на добу або поєднання вітамінів B_6, B_9, B_{12} та есміну упродовж 28 діб. Такі добові дози вітамінів B_6, B_9, B_{12} виявляють максимальний гіпогомоцистеїнемічний ефект і при цьому не мають токсичної дії, не стимулюють ріст тварин [Артемчук, 2006]. Щурам контрольних груп вводили еквівалентні кількості 1% крохмального гелю. Знеживлювали тварин методом декапітації під пропофоловим наркозом ("Fresenius Kabi" 60 мг/кг в/о).

Вміст H_2S в головному мозку визначали як описано [Wilinski et al., 2011]. Мозок промивали холодним 1,15% розчином KCl, наважку тканини гомогенізували 1-2 хв. в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50% ТХО, центрифугували при 1200 g 15 хв., в супернатанті визначали вміст H_2S за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном.

Активність H_2S-синтезуючих ензимів цистатіонін-β-синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) разом із 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою (3-МСТ, КФ 2.8.1.2), тіосульфатдитіолсульфідтрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5) в постядерному супернатанті гомогенатів мозку оцінювали за приростом сульфід-аніону [Заічко та ін., 2009]. Загальну швидкість утилізації H_2S в мозку визначали в модельній системі (Патент №87884) за зниженням концентрації сульфід-аніону в присутності постядерного супернатанту гомогенатів мозку. Активність сульфітоксидази (КФ 1.8.3.1) визначали за швидкістю окиснення сульфіт-аніону в присутності гексоціаноферрату калію [Cohe et al., 1971]. Вміст ГЦ в сироватці крові визначали за набором "Homocysteine EIA" (Axis-Shield, Англія). Статистичний аналіз проводили з використанням t-критерію Ст'юдента, для визначення зв'язків між показниками проводили кореляційний аналіз по Пірсону. Вірогідними вважали дані при $p<0,05$.

Результати. Обговорення

Введення тіолактону ГЦ викликало підвищення вмісту ГЦ в сироватці крові в 2,54 рази та зниження вмісту H2S в мозку в 2,1 рази (табл. 1). Введення вітамінів В6, В9, В12, есміну і, особливо, їх комбінації достовірно стримувало зростання рівня ГЦ в сироватці крові. Так, у щурів в групах "ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12}", "ГГЦ+есмін" та "ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12} + есмін" вміст ГЦ був нижчим на 27,4%, 12,5 та 41,5%, ніж у щурів з ГГЦ. За цих умов введення вітамінів B_6, B_9, B_{12} та есміну запобігало формуванню дефіциту H_2S в мозку щурів: в групах "ГГЦ +

Таблиця 1. Вплив вітамінів B_6, B_9, B_{12}та есміну на вміст гомоцистеїну в сироватці крові та H_2S в мозку у щурів з ізольованою ГГЦ (M±m, n=10).

	Групи щурів	Гомоцистеїн (сироватка), мкмоль/л	H_2S (мозок) нмоль/мг протеїну	H_2S / гомоцистеїн
1	Контроль	6,62±0,23	2,64±0,15	0,41±0,04
2	ГГЦ	16,8±0,92*	1,24±0,12*	0,08±0,01*
3	ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12}	12,2±0,88*#	1,78±0,11*#	0,16±0,02*#
4	ГГЦ + есмін	14,7±0,76*§	1,46±0,08*§	0,10±0,01*§
5	ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12} + есмін	9,82±0,09*#§&	2,42±0,13#§&	0,26±0,02*#§&

Примітки: 1. * - p<0,05 щодо групи 1; 2. # - p<0,05 щодо групи 2; 3. § - p<0,05 щодо групи 3; 4. & - p<0,05 щодо групи 4.

деградації H_2S у мітохондріях (окиснення сульфітів до сульфатів). Введення вітамінів B_6, B_9, B_{12} та есміну стримувало формування дисбалансу у шляхах утилізації H2S за умов ГГЦ, при цьому найбільш суттєвий ефект реєструвався в групі "ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12} + есмін": активність сульфітоксидази була достовірно вищою на 72,8%, а швидкість утилізації H_2S - нижчою на 34,6%, ніж у щурів з ГГЦ.

Механізми гіпогомоцистеїнемічної дії вітамінів B_6, B_9, B_{12} є добре вивченими і описані в багатьох роботах [Пентюк та ін., 2004; 2008; Артемчук, 2006], однак їх вплив на систему H_2S в мозку за умов ГГЦ залишався не визначеним. Результати наших досліджень засвідчили, що композиція вітамінів B_6, B_9, B_{12} не тільки забезпечує елімінацію надлишку гомоцистеїну, а й змен-

Таблиця 2. Показники обміну H_2S в мозку щурів з ізольованою ГГЦ за умов корекції вітамінами B_6, B_9, B_{12} та есміном (M±m, n=10).

	Групи щурів	Активність H_2S-синтезуючих ензимів, нмоль H_2S /хв·мг протеїну			Сульфітоксидаза, нмоль / хв·мг протеїну	Швидкість утилізації H_2S, нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну
		ЦБС	ЦАТ/3-МСТ	ТСТ		
1	Контроль	0,451±0,023	0,393±0,021	1,96±0,05	4,10±0,29	0,187±0,017
2	ГГЦ	0,297±0,018*	0,305±0,026*	1,34±0,09*	2,24±0,39*	0,318±0,014*
3	ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12}	0,372±0,022*#	0,362±0,017	1,59±0,07*#	3,02±0,20*	0,255±0,028*#
4	ГГЦ + есмін	0,341±0,045*	0,331±0,018*	1,44±0,09*	2,82±0,25*	0,261±0,034*
5	ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12} + есмін	0,438±0,016#§&	0,386±0,022#	1,87±0,15#&	3,87±0,31#§&	0,203±0,017#&

Примітки: 1. * - p<0,05 щодо групи 1; 2. # - p<0,05 щодо групи 2; 3. § - p<0,05 щодо групи 3; 4. & - p<0,05 щодо групи 4.

віт. B_6, B_9, B_{12}", "ГГЦ+есмін" та "ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12} + есмін" вміст H_2S був вищим на 43,5; 17,7 та 95,2%, ніж у щурів з ГГЦ. Адитивний ефект поєднання вітамінів B_6, B_9, B_{12} з есміном на вміст H_2S в мозку підтвердили відмінності у співвідношенні H_2S / гомоцистеїн, яке в групі "ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12} + есмін" виявилось достовірно вищим на 62,5 та 160%, ніж у тварин у групах "ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12}" та "ГГЦ+есмін", відповідно.

Розвиток ГГЦ супроводжувався зниженням активності H_2S-синтезуючих ензимів: у групі ГГЦ активність ЦБС, ЦАТ/3-МСТ та ТСТ була на 34,1; 22,4; 31,6% меншою, ніж у контролі (табл. 2). Введення вітамінів B_6, B_9, B_{12} та есміну запобігало зниженню активності H_2S-синтезуючих ензимів в мозку щурів з ГГЦ. Так, у щурів в групі "ГГЦ + віт. B_6, B_9, B_{12}" активність ЦБС, ЦАТ та ТСТ була на 25,3; 18,7 та 18,6% вищою, ніж у щурів з ГГЦ. Зниження активності ЦБС, ЦАТ та ТСТ у щурів в групі "ГГЦ + есмін" було менш виразним, ніж у щурів з ГГЦ, і становило 24,4; 15,8; 26,5%. Найбільш сприятливий ефект щодо H_2S-синтезуючих ензимів у мозку спостерігався у щурів в групі "ГГЦ + віт. ВВ$_6$, B_9, B_{12} + есмін": активність ЦБС, ЦАТ та ТСТ практично не відрізнялась від контролю і достовірно перевищувала на 47,4; 26,6; 39,6% ці показники в групі щурів з ГГЦ. За умов ГГЦ в мозку достовірно зростала (на 70%) загальна швидкість утилізації H_2S, але знижувалась (на 45,4%) активність сульфітоксидази - ензиму, що каталізує кінцевий етапів шує його депримуючий ефект на активність H_2S-синтезуючих ензимів (особливо на ЦБС); відновлює баланс у шляхах утилізації H_2S, і як наслідок запобігає формуванню дефіциту H_2S в мозку. Здатність есміну потенціювати дію композиції вітамінів B_6, B_9, B_{12} може пояснюватись його власним гіпогомоцистеїнемічним ефектом, адже мікроелементи у його складі необхідні для ензимів утилізації гомоцистеїну та синтезу H_2S. Зокрема, іони цинку забезпечують активацію гомоцистеїну при ресинтезі метіоніну за участі B_{12}-залежної метіонінсинтетази [Abdel-Azeim et al., 2011], залізо входить до складу B_6-залежної ЦБС [Gadalla, Snyder, 2010], а молібден - до складу сульфітоксидази [Klein et al., 2012].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Ізольоване застосування композиції вітамінів B_6, B_9, B_{12} та есміну викликає гіпогомоцистеїнемічний ефект, запобігає зниженню активності H_2S-синтезуючих ензимів (ЦБС, ЦАТ, ТСТ), порушенню процесів утилізації H_2S та формуванню його дефіциту в мозку щурів за умов ГГЦ.

2. При поєднанні вітамінів B_6, B_9, B_{12} з полімікроелементним препаратом есміном гіпогомоцистеїнемічний ефект потенціюється та ефективно стримується розвиток дисбалансу в системі H_2S в мозку щурів при

введенні тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг 28 діб).

Дисбаланс у системі H_2S у мозку може бути інтегрованим у патогенез ГГЦ-асоційованих нейродегенеративних захворювань і потребувати корекції в клінічних умовах. Виникає питання, чи буде ефективною дія вітамінів та мікроелементних комплексів за умов сформованого несприятливого метаболічного патерну в мозку при ГГЦ. Вирішення цього завдання є перспективним напрямком подальших досліджень у галузі медичної біохімії.

Список літератури

Артемчук М. А. Профілактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпергомоцистеїнемії / М. А. Артемчук // Biomedical and Biosocial Anthopology. - 2006. - №7. - С. 17-20.

Вплив полімікроелементного препарату "Есмін" на вікові зміни вмісту гідрогенсульфіду та показників про- / антиоксидантної системи в міокарді щурів / Н. В. Заічко, О. С. Ольховський, А. В. Мельник [та ін.] // Укр. біохім. журнал. - 2014. - Т. 86, № 3. - С. 61-68.

Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, К. П. Постовітенко [та ін.] // Досягнення біології та медицини. - 2004. - №1 (3). - С. 35-38.

Пат. України на корисну модель №87884 UA МПК (2013) G01N 30/22 Спосіб визначення утилізації H2S в органах тварин / Заічко Н. В., Ольховський О. С., Юрченко П. О., Мельник А. В., Штатько О. І.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М.І.Пирогова. - № u201310024; заявл. 12.08.2013; опубл. 25.02.2014; Бюл. № 4.

Патогенетичні аспекти гіпергомоцистеїнемії та перспективи створення лікарських засобів для лікування патології, асоційованої з порушеннями обміну гомоцистеїну / О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, Н. В. Заічко [та ін.] // Biomedical and Biosocial Anthropology. - 2008. - №10. - С. 297-303.

Утворення гідроген сульфіду в органах щурів / Н. В. Заічко, Н. О. Пентюк, А. В. Мельник [та ін.] // Медична хімія. - 2009. - Vol. 11, №4. - С. 7-13.

Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs / B. Wilinski, J. Wilinski, E. Somogyi [et al.] // Folia Biol. (Krakow). - 2011. - Vol. 59, № 3-4. - P. 151-155.

Cohen H. J. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties / H. J. Cohen, I. Fridovich // J. Biol. Chem. - 1971. - Vol. 246, № 2. - P. 359-366.

Gadalla M. M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M. M. Gadalla, S. H. Snyder // J. Neurochem. - 2010. - Vol. 113. - P. 14-26.

Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders / M. Petras, Z. Tatarkova, M. Kovalska [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. - 2014. - Vol. 65, №1. - P. 15-23.

Identity of the exchangeable sulfur-containing ligand at the Mo(V) center of R160Q human sulfite oxidase / E. L. Klein, A. M. Raitsimring, A. V. Astashkin [et al.] // Inorg. Chem. - 2012. - Vol. 51, № 3. - P. 1408-1418.

Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system / H. Kimura // Neurochem. Int. - 2013. - Vol. 63, № 5. - P. 492-497.

Zinc-homocysteine binding in cobalamin-dependent methionine synthase and its role in the substrate activation: DFT, ONIOM, and QM/MM molecular dynamics studies / S. Abdel-Azeim, X. Li, L.W. Chung, K. Morokuma // J. Comput. Chem. - 2011. - Vol. 32, № 15. - P. 3154-3167.

Заичко Н.В., Юрченко П.А.

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ B_6, B_9, B_{12} И ЭСМИНА НА СИСТЕМУ ГИДРОГЕНСУЛЬФИДА В МОЗГЕ КРЫС С ИЗОЛИРОВАННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

Резюме. *Исследовано влияние витаминов B_6, B_9, B_{12} и полимикроэлементного препарата эсмина на содержание H_2S, активность H_2S-синтезирующих энзимов и показатели утилизации H_2S в мозге крыс с изолированной гипергомоцистеинемией (ГГЦ). Показано, что применение композиции витаминов B_6, B_9, B_{12} в сочетании с эсмином вызывает наибольший гипогомоцистеинемический эффект, предотвращает снижение активности H_2S-синтезирующих энзимов, нарушение процессов утилизации H_2S и формирование дефицита H_2S в мозге крыс при ГГЦ.*

Ключевые слова: *гомоцистеин, гидрогенсульфид, витамины, микроэлементы, эсмин, мозг.*

Zaichko N.V., Yurchenko P.A.

EFFECT OF VITAMINS B_6, B_9, B_{12} AND ESMINE ON THE HYDROGEN SULFIDE SYSTEM IN RATS' BRAIN WITH ISOLATED HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Summary. *Study the effect of vitamins B_6, B_9, B_{12} and polymicroelement drug Esmine on H_2S level, H_2S-synthase enzyme activity and H_2S utilization rates in rats' brain with isolated hyperhomocysteinemia (HHC). Was estimated that the use of the composition of vitamins B_6, B_9, B_{12} combined with Esmine has the highest hypohomocystinemic effect, and prevents reduction of H_2S-synthase enzyme activity, H2S-utilization disorders and formation of H_2S deficiency in rats' brain with HHC.*

Key words: *homocysteine, hydrogen sulfide, vitamins, minerals, Esmine, brain.*

Стаття надійшла до редакції 05.12.2014 р.

Заічко Наталія Валентинівна - доктор медичних наук, доцент, завідувач кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 66-12-24; nzaichko@mail.ru

Юрченко Петро Олександрович - асистент кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 66-12-24, +38 093 841-75-94; peter777ah@mail.ru