

© Юрченко П.О., Заїчко Н.В.

УДК: 546.221.1: 616.83: 616.153

Юрченко П.О., Заїчко Н.В.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, кафедра біологічної та загальної хімії (вул. Пирогова, 56, Вінниця, Україна, 21018)

МАРКЕРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦІЇ ТА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ У ЩУРІВ З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ ЗА УМОВ МОДУЛЯЦІЇ ОБМІНУ ГІДРОГЕНСУЛЬФІДУ

Резюме. Досліджено вплив модуляторів обміну гідрогенсульфіду (H_2S) на вміст мозкового нейротрофічного фактору (BDNF) та нейронспецифічної енолази (NSE) в сироватці крові та поведінкові реакції в тесті "відкрите поле" у щурів за умов ізольованої гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ). ГГЦ спричиняла зростання вмісту NSE та зниження вмісту BDNF в сироватці крові щурів. Інгібітори синтезу H_2S посилюють депримуєчий вплив ГГЦ на орієнтовно-дослідницьку активність та вегетативний баланс у щурів в тесті "відкрите поле", а донори H_2S проявляють протилежний ефект.

Ключові слова: гомоцистеїн, гідрогенсульфід, мозок, поведінкові реакції, амінооксиацетат, NaHS.

Вступ

Гіпергомоцистеїнемію (ГГЦ) розглядають як незалежний фактор ризику нейроваскулярних та нейродегенеративних захворювань: інсультів, васкулярної енцефалопатії, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, депресії [Petras et al., 2014]. Нейродегенеративні та нейрозапальні процеси супроводжуються змінами вмісту мозкового нейротрофічного фактору (BDNF) та нейронспецифічної енолази (NSE) в мозку та сироватці крові. BDNF є плейотропним цитокином, який відіграє важливу роль в регуляції нейрональної активності, синаптичної пластичності, структурно-функціонального стану глутаматергічних синапсів, процесів навчання та пам'яті [Carvalho et al., 2008; Lu et al., 2014]. Дефіцит BDNF розглядають як чинник когнітивних розладів, хвороби Альцгеймера, депресії, хвороби Гантінгтона [Lu et al., 2014]. Виникає питання щодо ролі біологічно-активного метаболіту гідрогенсульфіду (H_2S) в механізмах ГГЦ-індукованої нейродегенерації, зокрема тих, що реалізуються через нейротрофіни. Метою роботи було вивчення впливу модуляторів обміну H_2S (NAHS, амінооксиаце-

тату) на вміст BDNF та NSE в сироватці крові та поведінкові реакції в тесті "відкрите поле" у щурів за умов ізольованої ГГЦ.

Матеріали та методи

Досліди проведені на 38 білих лабораторних щурах-самцях масою 220-280 г. Тварини перебували в стандартних умовах з природнім світловим режимом день/ніч, воду і корм отримували ad libitum. 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 згідно Першого національного конгресу України з біоетики (Київ, 2001) та "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986). Тварин випадковим чином розподіляли на групи, по 8-10 особин в кожній.

Модель ізольованої ГГЦ створювали шляхом вве-

дення тіолактону D,L-гомоцистеїну (Sigma, США) в/шл в дозі 200 мг/кг маси протягом 14 діб. Інгібітор синтезу H_2S амінооксиацетат (AOA) вводили в дозі 15 мг/кг 1 раз на добу в/оч, донор H_2S (NaHS) - в дозі 3 мг/кг в/оч 1 раз на добу з 10 по 14 добу. Знеживлювали тварин методом декапітації під пропофоловим наркозом ("Fresenius Kabi" 60 мг/кг в/о).

Вміст H_2S в головному мозку визначали як описано за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [Wilinski et al., 2011]. Вміст гомоцистеїну (ГЦ), нейронспецифічної енолази (NSE) та нейротрофічного фактору (BDNF) в сироватці крові визначали методом ІФА за стандартними наборами "Homocysteine EIA" (Axis-Shield, Англія); "NSE EIA KIT" (DAI, США); "BDNF Quantikine ELISA" (R&D Systems, США).

Поведінкові реакції тварин з ізольованою ГГЦ оцінювали за допомогою нейроетологічного тесту "відкрите поле" [Кальян, 2007; Непорада та ін., 2011]. Тест "відкрите поле" проводився до початку моделювання ГГЦ (0 доба) та наприкінці досліду (14 доба). Всі маніпуляції здійснювались у стандартних умовах з 1600 до 1900 в літній період. "Відкритим полем" слугувала камера з білого пластику, розмірами 1,0 x 1,0 x 0,5 м, дно якої було розкреслене на 25 рівних квадратів. Освітлення камери здійснювалось лампою 100 Вт, що була розташована на висоті 1,5 м від дна камери. Тривалість нахождення щура в камері становила 3 хвилини. Реєстрували: 1) показники рухової та дослідницької поведінки: горизонтальну рухову активність - кількість перетятих квадратів та амбуляцію (визначається у метрах як кількість перетятих квадратів x 0,3); вертикальну рухову активність - кількість стійок на задніх лапах (реринг); час обнюхування (с); 2) показники швидкості адаптації: латентний період першого переміщення (ЛППП, с); час в центрі майданчика (с); 3) показники вегетативного балансу - загальна кількість умивань (грумінг); кількість болюсів та уринацій.

Для оцінки відмінностей досліджуваних показників застосовували параметричний t-критерій Ст'юдента (при нормальному розподілі) та критерій Вілкоксона (при відхиленні від нормального розподілу), для оцінки зв'язків між показниками проводили кореляційний аналіз за Пірсоном. Вірогідними вважали дані при $p < 0,05$.

Результати. Обговорення

Ізольована ГГЦ характеризувалась зростанням (в 3,25 рази) сироваткового вмісту ГЦ та зниженням (в 2,0 рази) вмісту H_2S в мозку (табл. 1). Введення АOA підвищувало вміст ГЦ (в 1,54 рази), поглиблювало дефіцит H_2S в мозку (в 1,28 рази). Введення NaHS викликало підвищення вмісту H_2S в мозку та зменшення вмісту ГЦ в сироватці крові на 34,6 та 28,0%, відповідно.

ГГЦ спричиняла зростання (на 72,8%) вмісту NSE та зниження (на 34,4%) вмісту BDNF в сироватці крові щурів. За умов ГГЦ між рівнем ГЦ та вмістом NSE виявлявся достовірний прямий зв'язок та обернений зв'язок - з

рівнем BDNF ($r=0,52$; $-0,46$). В той же час, між вмістом H_2S в мозку та сироватковими рівнями NSE та BDNF виявлялись більш сильні, протилежно спрямовані, асоціації ($r=-0,55$; $0,77$).

Підвищення вмісту NSE в сироватці крові є чутливим маркером ушкодження нейронів [Woertgen et al., 2000]. Тіолактон ГЦ є токсичною речовиною і може викликати модифікацію протеїнів, аутоімунні реакції, накопичення амілоїду та загибель нейронів. Зростання вмісту тіолактону ГЦ в мозку асоціюється з розвитком епілептичних судом та хвороби Альцгеймера [Bogowczyk et al., 2012]. Одноразове інтрацеребральне введення ГЦ підвищувало експресію NSE та знижувало експресію синаптосом-асоційованих протеїнів [Kamat et al., 2013]. Введення АOA підвищувало нейротоксичність тіолактону ГЦ, в той час як введення NaHS зменшувало цей ефект. У щурів в групі ГГЦ+AOA вміст BDNF був достовірно нижчим на 16,2%, а NSE - вищим на 39,8%, ніж у щурів з ГГЦ. В той же час, у щурів в групі ГГЦ + NaHS вміст BDNF був вищим на 44,3%, а NSE - нижчим на 25,0%, ніж у щурів з ГГЦ. Отже, дефіцит H_2S в мозку впливає на стан нейронів, про що свідчать різноспрямовані зміни рівнів BDNF та NSE в сироватці крові у щурів з ГГЦ.

На наступному етапі ми оцінили показники поведінки контрольних щурів та щурів з ГГЦ в тесті "відкрите поле". За вихідними показниками дослідницької поведінки групи щурів вірогідно не відрізнялись між собою: амбуляція становила 7-8 м, кількість вертикальних стійок (реринг) - 13-15, час обнюхування - 36-40 с (табл. 2). За станом на 14 добу показники дослідницької діяльності у щурів контрольної групи практично не змінились. У щурів з ГГЦ спостерігалось достовірне пригнічення орієнтувально-дослідницької діяльності: кількість перетятих квадратів зменшилась на 44,8% і амбуляція скоротилась до 4,43 м; реринг зменшився на 40,9%; час обнюхування скоротився на 26,4% відносно вихідних показників.

Поглиблення дефіциту H_2S в мозку за умов ГГЦ посилювало пригнічення орієнтувально-дослідницької діяльності. На 14 добу в групі ГГЦ+AOA кількість перетятих квадратів зменшилась на 55,8%, амбуляція скоротилась до 3,27 м, реринг - на 59,8%, час обнюхування - на 32,3%. У щурів в групі ГГЦ+NaHS порушення дослідницької діяльності виявились менш виразними, ніж в групі ГГЦ: амбуляція скоротилась до 5,4 м, реринг зменшився на 31,8%, а час обнюхування - на 22,6%.

Модуляція обміну H_2S впливала на показники адаптації та вегетативного балансу тварин з ГГЦ (табл. 3). В групі ГГЦ+AOA на 14 добу ЛППП та час в центрі майданчика були достовірно вищими (на 75-76%) порівняно з вихідним рівнем і на 36-37% перевищували показники у тварин в групі ГГЦ. Після 14-добового введення тіолактону ГЦ у щурів спостерігалось підвищення (на 57-60%) кількості актів грумінгу, дефекацій та уринацій. Прояви вегетативного дисбалансу у щурів з ГГЦ поси-

Таблиця 1. Біохімічні маркери нейродегенерації у щурів з ГГЦ за умов модуляції обміну H₂S (M±m, n=8-10).

Групи щурів		H ₂ S (мозок), нмоль/мг протеїну	Сироватка крові		
			Гомоцистеїн, мкмоль/л	BDNF, пг/мл	NSE, нг/мл
1	Контроль	2,72±0,19	6,58±0,40	154±13,0	1,25±0,11
2	ГГЦ	1,33±0,15*	21,4±1,42*	101±6,01*	2,16±0,17*
3	ГГЦ + АОА	0,95±0,06*#	33,1±2,51*#	84,5±4,69*#	3,02±0,26*#
4	ГГЦ + NaHS	1,79±0,08*#§	15,4±0,86*#§	122±7,44*#§	1,62±0,13*#§

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

Таблиця 2. Вплив модуляторів обміну H₂S на рухову активність та дослідницьку поведінку щурів з ГГЦ в тесті "відкрите поле" (M±m, n=8-10).

Групи щурів		Умови досліджу	Показники рухової та дослідницької поведінки			
			Кількість перетягів квадратів	Амбуляція, м	Реринг	Час обнюхування, с
1	Контроль	0 доба	25,2±1,89	7,57±0,57	13,9±0,81	143±6,35
		14 доба	23,4±1,85	7,03±0,55	12,8±1,15	138±6,39
2	ГГЦ	0 доба	26,8±2,21	8,03±0,66	14,1±1,11	140±5,98
		14 доба	14,8±1,52*	4,43±0,45*	8,33±1,17*	103±11,1*
3	ГГЦ + АОА	0 доба	24,7±2,03	7,40±0,61	14,4±0,82	138±5,77
		14 доба	10,9±0,95*#	3,27±0,28*#	5,78±0,43*	93,4±4,60*
4	ГГЦ + NaHS	0 доба	24,6±2,02	7,38±0,61	13,5±0,82	146±6,44
		14 доба	18,0±1,56*	5,40±0,47*	9,20±0,66*	113±6,80*

Примітки: 1. * - p<0,05 відносно вихідного стану (0 доба) в групі; 2. # - p<0,05 відносно групи 2.

Таблиця 3. Вплив модуляторів обміну H₂S на швидкість адаптації та вегетативний баланс щурів з ГГЦ в тесті "відкрите поле" (M±m, n=8-10).

Групи щурів		Умови досліджу	Швидкість адаптації		Вегетативний баланс	
			ЛППП, с	Час в центрі майданчика, с	Кількість вмивань (грумінг)	Кількість болюсів та уринацій
1	Контроль	0 доба	2,78±0,40	3,89±0,51	2,22±0,40	2,33±0,33
		14 доба	2,56±0,53	3,67±0,47	2,11±0,31	2,44±0,29
2	ГГЦ	0 доба	2,89±0,35	3,22±0,46	2,33±0,24	2,22±0,32
		14 доба	3,56±0,41	4,33±0,41	3,67±0,29*	3,56±0,34*
3	ГГЦ + АОА	0 доба	2,78±0,43	3,67±0,29	2,11±0,26	2,56±0,38
		14 доба	4,89±0,42*#	5,44±0,34*#	3,89±0,26*	3,67±0,24*
4	ГГЦ + NaHS	0 доба	2,90±0,31	3,60±0,48	2,30±0,21	2,40±0,27
		14 доба	3,50±0,37	4,10±0,43	3,40±0,27*	3,10±0,31*

Примітки: 1. * - p<0,05 відносно вихідного стану (0 доба) в групі; 2. # - p<0,05 відносно групи 2.

лювались при введенні АОА і зменшувались при введенні NaHS.

Таким чином, ГГЦ викликає зміни поведінкових реакцій щурів в тесті "відкрите поле", які свідчать про пригнічення орієнтовно-дослідницької діяльності, емоційно-мотиваційних реакцій, формування вегетативного дисбалансу та підвищення тривожності у дослідних тварин. Модулятори обміну H₂S достовірно впливають на поведінковий патерн тварин з ГГЦ. При цьому інгібітори синтезу H₂S потенціюють негативний вплив високих рівнів ГЦ на рухову активність та емоційно-мотиваційну сферу тварин, а донори H₂S проявляють протилежний ефект.

Отримані нами результати узгоджуються із результатами інших досліджень щодо здатності ГЦ та модуляторів обміну H₂S впливати на когнітивні функції у тварин. Показано, що гостра ГГЦ, індукована одноразовим в/в введенням ГЦ, викликала порушення коротко- та довготривалої пам'яті та зниження BDNF в гіпокампі у щурів [Matt et al., 2009]. У щурів з тривалою метоніновою ГГЦ знижувався рівень серотоніну та дофаміну в гомогенатах кори головного мозку, зменшувався вміст BDNF в спинномозковій рідині та виникали когнітивні розлади [Gao et al., 2012]. Введення NaHS зменшувало дефіцит пам'яті у мишей, викликаний одноразовим інтрацеребральним введенням ГЦ [Kamat et al., 2013];

покращувало моторні рефлекси, процеси пам'яті та навчання, підвищувало експресію BDNF в гіпокампі мишей в умовах гіпоксії [Wang et al., 2013]. Зміни поведінкових реакцій у тварин з ГГЦ узгоджуються зі змінами сироваткового вмісту BDNF, який визначає репаративний та трофічний потенціал нейронів, синаптичну пластичність.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Введення інгібітору цистатіонін- β -синтази амінооксиацетату (15 мг/кг) поглиблює дефіцит H_2S в мозку, потенціює підвищення вмісту NSE та зниження вмісту BDNF в сироватці крові, підвищує нейротоксичний

ефект ізольованої ГГЦ. Введення NaHS (3 мг/кг) зменшує виразність ГГЦ, підвищує вміст H_2S в мозку, що асоціюється з регресом порушень вмісту нейроспецифічних маркерів в сироватці крові.

2. Модулятори обміну H_2S (амінооксиацетат, NaHS) впливають на поведінковий патерн тварин з ГГЦ: інгібітори синтезу H_2S посилюють депримируючий вплив високих рівнів гомоцистеїну на орієнтовно-дослідницьку активність та вегетативний баланс у щурів в тесті "відкрите поле", а донори H_2S проявляють протилежний ефект.

Вивчення ролі нейротрофінів в механізмах впливу модуляторів обміну H_2S на функціональний стан центральної нервової системи та когнітивні функції тварин є перспективним напрямком подальших досліджень.

Список літератури

- Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О.О. Пентюк, М. Б. Луцок, К. П. Поставітенко [та ін.] // *Досягнення біології та медицини*. - 2004. - № 1 (3). - С. 35-38.
- Кальян В.В. Поведінкові реакції самиць-щурів, матері яких підлягали дії різних рухових режимів, в умовах відкритого поля / В.В. Кальян // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна*. Серія: біологія. - 2007. - Вип.6, № 788. - С. 134-139.
- Непорада К.С. Механізми стреспротекторної дії меланіну на підшлункову залозу залежно від стресостійкості організму / К.С. Непорада, Н.М. Слободяник, В.М. Слободяник // *Медична хімія*. - 2011. - Т.13, № 1 (46). - С. 5-8.
- Borowczyk K. Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1 / K. Borowczyk, D.M. Shih, H. Jakubowski // *J. Alzheimers Dis.* - 2012. - 30, №2. - P. 225-231.
- Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs / Wiliński B., Wilinski J., Somogyi E. [et al.] // *Folia Biol (Krakow)*. - 2011. - 59, №3-4. - P. 151-155.
- Cognitive and neurochemical alterations in hyperhomocysteinemic rat / Gao L., Zeng X.N., Guo H.M. [et al.] // *Neurol Sci.* - 2012. - 33, № 1. - P. 39-43.
- Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice / Kamat P.K., Kalani A., Givvimani S. [et al.] // *Neuroscience*. - 2013. - № 252. - P. 302-319.
- Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders / Petras M., Tatarikova Z., Kovalska M. [et al.] // *J Physiol Pharmacol.* - 2014. - 65, №1. - P. 15-23.
- Hyperhomocysteinemia reduces glutamate uptake in parietal cortex of rats / Matt? C., Mussulini B.H., dos Santos T.M. [et al.] // *Int. J. Dev. Neurosci.* - 2010. - Т. 28, № 2. - P. 183-187.
- Lu B. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction / B. Lu, G. Nagappan, Y. Lu // *Handb. Exp. Pharmacol.* - 2014. - 220. - P. 223-250.
- Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses / A.L. Carvalho, M.V. Caldeira, S.D. [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* - 2008. - Vol. 153, Suppl 1. - P. 310-324.
- Sodium hydrosulfide prevents hypoxia-induced behavioral impairment in neonatal mice / Wang Z., Zhan J., Wang X. [et al.] // *Brain Res.* - 2013. - № 1538. - P. 126-134.
- Woertgen C. Time profile of neuron specific enolase serum levels after experimental brain injury in rat / C. Woertgen, R.D. Rothoerl, A. Brawanski // *Acta Neurochir.* - 2000. - 76, Suppl. - P. 371-373.

Юрченко П.А., Заичко Н.В.

МАРКЕРЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У КРЫС С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ ПРИ МОДУЛЯЦИИ ОБМЕНА ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА

Резюме. Исследовано влияние модуляторов обмена гидроген сульфида (H_2S) и, а содержание мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и нейронспецифической эналазы (NSE) в сыворотке крови и поведенческие реакции в тесте "открытое поле" у крыс в условиях изолированной гипергомоцистеинемии (ГГЦ). ГГЦ вызывала повышение уровня NSE и снижение уровня BDNF в сыворотке крови крыс. Ингибиторы синтеза H_2S усиливают депримирующее влияние ГГЦ на ориентировочно-исследовательскую активность и вегетативный баланс у крыс в тесте "открытое поле", в то время как доноры H_2S оказывают противоположный эффект.

Ключевые слова: гомоцистеин, гидрогенсульфид, мозг, поведенческие реакции, аминоксиацетат, NaHS.

Yurchenko P.A., Zaichko N.V.

MARKERS OF NEURODEGENERATION AND BEHAVIORAL RESPONSES IN RATS WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA UNDER MODULATION OF HYDROGEN SULFIDE METABOLISM

Summary. It was estimated the effect of hydrogen sulfide (H_2S) metabolism modulators on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neuron-specific enolase (NSE) serum and behavioral responses in the "open field" test in rats with HHC. HHC caused an increase of NSE serum level and decrease of BDNF serum level in rats. H_2S synthase inhibitor enhance the HHC inhibition of oriented-experimental activity and vegetative balance in rats in the test "open field" and H_2S donors have the opposite effect.

Key words: homocysteine, hydrogen sulfide, brain, behavioral responses, aminoxyacetate, NaHS.

Стаття надійшла до редакції 3.12.2014 р.

ORIGINAL ARTICLES

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

Заїчко Наталія Валентинівна - доктор медичних наук, доцент, завідувач кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ імені М.І. Пирогова
