

МЕТАБОЛІЗМ ЦИСТЕЇНУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГІПЕР- ТА ГІПОТИРЕОЗІ В ЩУРІВ

Вступ. Сірковмісні амінокислоти забезпечують процеси життєдіяльності клітин, підтримують цілісність їх редокс-потенціалу, знешкоджують вільні радикали та токсичні агенти, забезпечують процеси метилування і транссульфування. Відомо, що цистеїн утворюється в клітинах з гомоцистеїну, а використання може, залежно від потреб клітини, на синтез білка, глутатіону, в десульфуразному шляху з утворенням гідроген сульфіді. Регуляція метаболізму сірковмісних амінокислот здійснюється на різних рівнях, у тому числі й ендокринною системою, зокрема тиреоїдними гормонами.

Мета дослідження – в експерименті вивчити вплив функціонального стану щитоподібної залози на активність ензимів циклу обміну цистеїну в тканинах печінки, нирок, мозку, міокарда, встановити вміст цистеїну, відновленого глутатіону та гідроген сульфіді в крові.

Методи дослідження. У роботі використано 40 щурів-самців масою 150–180 г. Для моделювання гіпер- і гіпотиреозу тваринам щоденно протягом 14-ти і 21-ї діб ентерально вводили розчин L-тироксину (200 мкг/добу на 1 кг маси) або мерказолілу (10 мг/добу на 1 кг маси). У мозку щурів визначали десульфуразну активність ензимів цистатіонін-β-синтази і цистатіонін-γ-ліази, в крові – вміст цистеїну, гомоцистеїну і гідроген сульфіді.

Результати й обговорення. Щурам вводили L-тироксин та мерказоліл для моделювання станів гіпер- та гіпотиреозу, які підтверджували за вмістом вільного трийодтироніну, вільного тироксину і тиреотропного гормону в крові. В органах тварин з гіпотиреозом спостерігали зниження активності цистатіонін-β-синтази, цистатіонін-γ-ліази і цистеїнаміотрансферази. Водночас введення L-тироксину призводило до підвищення активності даних ензимів у нирках та мозку. Гіпертиреоз супроводжувався зниженням, а гіпотиреоз не вплинув на концентрацію глутатіону в крові та на його вміст в органах тварин. Встановлено достовірне зниження концентрації гідроген сульфіді в крові при гіпотиреозі.

Висновок. Ураження серцево-судинної системи при гіпотиреозі може бути наслідком порушення процесів десульфуровання в органах і тканинах, введення L-тироксину призводить до зниження синтезу глутатіону в сироватці та органах тварин, що може бути однією з причин розвитку оксидативного стресу в пацієнтів з гіпертиреозом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тиреоїдні гормони; цикл десульфуровання; цистеїн; глутатіон.

ВСТУП. Цистеїн – це сірковмісна амінокислота, що відіграє важливу біологічну роль в організмі людини: бере участь у формуванні вторинної структури білків, протеїновому фолдингу, посттрансляційних перетвореннях [1]. Він є складовою глутатіону (GSH) та коензиму А. Співвідношення цистеїн/цистин та GSH/GSSG визначає редокс-потенціал у клітинах [2, 3]. Відомо, що цистеїн бере участь у реакціях кон'югації ксенобіотиків та використовується для синтезу таурину.

Катаболізм цистеїну відбувається двома шляхами: синтез глутатіону й окиснення його тіольних груп. Перший шлях каталізує γ-глута-

мілцистеїнліаза (γ-ГЦЛ, КФ 6.3.2.2), внаслідок чого синтезується γ-глутамілцистеїн. У подальшій реакції синтезується глутатіон у результаті взаємодії γ-глутамілцистеїну з гліцином. Відомо, що глутатіон є потужним антиоксидантом, бере участь у процесах знешкодження ксенобіотиків, відіграє роль нейромодулятора та цитопротектора. Другий шлях утилізації цистеїну відбувається з участю цистеїндіоксигенази (ЦДО, КФ 1.13.11.20) з утворенням цистеїнсульфіату [1]. Останній цистеїнсульфіатдекарбоксилазою (ЦСД, КФ 4.1.1.29) перетворюється до гіпотаурину, який окиснюється до таурину. Частина цистеїнсульфіату в реакції трансамінування з участю цистеїнсульфіатаміотрансферази

(ЦСАТ, КФ 2.6.1.75) перетворюється в β -сульфінілпіруват, який розщеплюється до пірувату та сульфїту, що окиснюється до сульфатів сульфїт-оксидазою (СО, КФ 1.8.3.1).

Десульфуразний шлях обміну цистеїну є досить важливим, оскільки з ним асоціюється продукція сигнальної газової молекули гїдроген сульфїду (H_2S) [4]. На сьогодні відомо, що H_2S відіграє велику роль у регуляції судинного тону-су та агрегації тромбоцитів, скоротливості міо-карда, нейротрансмісії, секреції інсуліну, попе-реджує розвиток апоптозу клітин [5]. Метаболїзм H_2S тісно пов'язаний з тіолдисульфїдним обмі-ном та синтезом глутатїону [6].

Синтез H_2S із цистеїну каталїзується кількома ензимами: цистеїнамїнотрансферазою (ЦАТ, КФ 2.6.1.3), цистатїонїн- γ -ліазою (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) і цистатїонїн- β -синтазою (ЦБС, КФ 4.2.1.22) [7–9]. Також H_2S може синтезуватись шляхом віднов-лення тіосульфату з участю тіосульфатдїтіол-сульфїдтрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5) [10].

Гормони щитоподїбної залози є регуляторам-и всїх видів обміну, в тому числі обміну аміно-кислот і бїлків. Проте вплив цих гормонів на метаболїзм цистеїну все ще не зовсім зрозумїлий. Недослідженими є питання впливу тирео-їдних гормонів на вміст гїдроген сульфїду в організмі та функціональний стан ензимів, що забезпечують процеси обміну цистеїну і від функ-ціонування яких безпосередньо залежить кон-центрація H_2S у крові.

Мета дослідження – в експерименті дослі-дити вплив функціонального стану щитоподїбної залози на активність ензимів обміну цистеїну в тканинах печінки, нирок, мозку, міокарда, вста-новити вміст цистеїну і відновленого глутатїону, рївні GSH та H_2S у крові при гіпер- і гіпотиреозі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для досліджень використано 40 безпородних щурів-самців ма-сою 150–180 г, яких утримували на стандартно-му раціоні. Усїх тварин подїлили на 5 груп: 1-ша – контроль (їнтактні щури, яким вводили їнтрагастрально 1 % розчин крохмалю); 2-га – тварини, в яких викликали гіпертиреоз (щоденно протягом 14-ти дїб вводили їнтрагастрально L-ти-роксин на 1 % розчині крохмалю по 200 мкг/добу на 1 кг маси); 3-тя – тварини, в яких викликали гіпертиреоз (щоденно протягом 21-ї доби вводили їнтрагастрально L-тироксин на 1 % розчині крохмалю по 200 мкг/добу на 1 кг маси); 4-та – тварини, в яких викликали гіпотиреоз (щоденно протягом 14-ти дїб вводили їнтрагастрально мер-казолїл на 1 % розчині крохмалю по 10 мг/добу на 1 кг маси); 5-та – тварини, в яких викликали гіпотиреоз (щоденно протягом 21-ї доби вводили їнтрагастрально мерказолїл на 1 % розчині крох-

малю по 10 мг/добу на 1 кг маси). На 14-ту і 21-шу доби щурів виводили з експерименту методом цервікальної дислокації. Для дослі-джень використовували плазму крові, тканину печінки та нирок. Дослідження проведено згідно із загальними етичними принципами експери-ментів на тваринах, ухваленими на Першому національному конгресі України з біоетики (Київ, 2001), Європейської конвенції про захист хре-бетних тварин, що використовуються для до-слідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), інших міжнародних угод і національного законодавства в цїй галузі.

Печінку та нирки перфузували холодним 1,15 % розчином калїю хлориду і гомогенїзува-ли при 3000 об./хв у середовищі 1,15 % калїю хлориду (спїввідношення 1:3). Гомогенати цен-трифугували впродовж 30 хв при 1500 g і тем-пературі +4 °С, отриману пост'ядерну фракцію використовували для визначення активності ензимів, що забезпечують процеси обміну цистеїну в організмі: γ -глутамїлцистеїнліази, цистеїндїоксигенази, сульфїтоксидази, цистеїнамї-нотрансферази, цистатїонїн- γ -ліази, цистатїо-нїн- β -синтази, тіосульфатдїтіолсульфїдтранс-ферази.

Для інших досліджень міокард та мозок го-могенїзували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (рН 7,4) у спїввідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об./хв (тефлон-скло), центрифугу-вали 30 хв при 600 g і температурі 4–6 °С, отриману пост'ядерну фракцію використовували для визначення активності ензимів, що забезпе-чують процеси обміну цистеїну в організмі: γ -ГЦЛ та СО в міокарді й мозку, ЦДО і ЦБС у мозку, ЦАТ у міокарді.

Для визначення вмісту фракцій глутатїону використовували безбїлкові ТХО-екстракти печ-їнки, нирок, мозку, міокарда. Для цього їх про-мивали холодним 1,15 % розчином КСІ, подрїб-нювали ножицями, гомогенїзували в 10 % розчині трихлороцтової кислоти у спїввідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об./хв (тефлон-скло). Супернатанти відбирали в мїкропрїбїрки Eppendorf і до проведення аналізу зберїгали при тем-пературі -20 °С.

Рївень загального цистеїну визначали за реакцією з нїнгїдриним реактивом у кислому середовищі після відновлення цистину в цистеїн [11]. Вміст GSH у тканинах органів визначали за реакцією з 5,5'-дїтіобїс(2-нїтробензойною)кис-лотою [12]. Вміст H_2S у сироватці крові визнача-ли за реакцією утворення тіонїну з використан-ням N,N-дїметил-л-фенїлендїамїну [13]. Актив-ність H_2S -утворювальних ензимів у пост'ядер-ному гомогенаті органів тварин оцїнювали в адаптованих їнкубаційних середовищах за при-

ростом сульфід-аніона, який визначали за реакцією утворення метиленового синього [14]. Активність ТСТ визначали в реакції відновлення тіосульфат-аніона за утворенням сульфід-аніона [14]. Активність γ -ГЦЛ визначали за кількістю неорганічного фосфату, що утворювався при гідролізі АТФ під час взаємодії глутамату із цистеїном [15]. Активність ЦДО визначали за швидкістю перетворення цистеїну в цистеїнсульфінову кислоту [16]. Активність СО визначали за швидкістю окиснення сульфід-аніона [17].

Для підтвердження станів гіпер- та гіпотиреозу в сироватці крові визначали вміст вільного тироксину (vT_4), вільного трийодтироніну (vT_3) та тиреотропного гормону (ТТГ) імуноферментним методом з використанням наборів фірми "Диагностические системы" (Російська Федерація) відповідно до інструкцій фірми-виробника.

Результати виражали як середнє \pm SEM з 8 експериментів. Зміни $p < 0,05$ розглядали як статистично достовірні. Статистичний аналіз проводили, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Щоденне введення тваринам по 200 мкг/кг L-тироксину протягом 14-ти і 21-ї діб викликало стан постійного гіпертиреозу, що підтверджувалося збільшенням у крові щурів 2-ї та 3-ї груп концентрації vT_4 – відповідно, в 1,8 раза (з $(11,07 \pm 0,47)$ до $(20,23 \pm 2,10)$ пмоль/л) і 2,4 раза (з $(11,07 \pm 0,47)$ до $(26,12 \pm 1,85)$ пмоль/л). При цьому концентрація ТТГ достовірно зменшувалась: на 14-ту добу – в 2,3 раза (з $(0,34 \pm 0,03)$ до $(0,15 \pm 0,02)$ мМО/л), на 21-шу – в 4,25 раза (з $(0,34 \pm 0,03)$ до $(0,08 \pm 0,01)$ мМО/л). Концентрація vT_3 при введенні L-тироксину мала тільки тенденцію до зростання в обидва терміни експерименту, проте при статистичному аналізі зміни виявилися недостовірними.

Для пригнічення продукції синтезу тиреоїдних гормонів використовували препарат "Мерказоліл" (1-метил-2-меркаптоїмідазол), який блокує ензим пероксидазу, що бере участь у йодуванні

тироніну в щитоподібній залозі до трийод- і тетраїодтироніну та знижує інкрецію тироксину. Введення тваринам щодня по 10 мг/кг мерказолілу протягом 14-ти діб викликало зменшення вмісту vT_4 у сироватці крові в 1,6 раза (з $(11,07 \pm 0,47)$ до $(6,84 \pm 0,27)$ пмоль/л), застосування препарату протягом 21-ї доби призвело до зниження рівня vT_4 майже в 3 рази (з $(11,07 \pm 0,47)$ до $(4,25 \pm 0,42)$ пмоль/л). Щоденне введення щурам по 10 мг/кг мерказолілу протягом 14-ти і 21-ї діб спричинило достовірне зростання рівня ТТГ в 1,6 (з $(0,34 \pm 0,03)$ до $(0,54 \pm 0,05)$ мМО/л) та 6,5 раза (з $(0,34 \pm 0,03)$ до $(2,21 \pm 0,16)$ мМО/л). Водночас рівень vT_3 зменшився в сироватці крові в 3 рази на 14-ту добу (з $(2,58 \pm 0,24)$ до $(0,87 \pm 0,06)$ пмоль/л) і в 4 рази на 21-шу добу (з $(2,58 \pm 0,24)$ до $(0,67 \pm 0,04)$ пмоль/л). Усі вищенаведені дані свідчать про те, що за допомогою L-тироксину було змодельовано стан, ідентичний до гіпертиреозу, а в щурів, яким вводили мерказоліл, розвивався виражений гіпотиреоз.

Дані, наведені на рисунку 1, свідчать про те, що введення тваринам мерказолілу викликало збільшення вмісту цистеїну в крові. Водночас застосування L-тироксину на рівень цистеїну в крові практично не впливало в обидва терміни дослідження. Наведені в таблиці 1 дані показують, що введення мерказолілу призводило до зростання рівня цистеїну в тканинах: у печінці – на 28 і 44 %; у нирках – на 35 та 50 %; у серці – на 33 і 60 %; у мозку – на 38 та 50 %, відповідно, на 14-ту і 21-шу доби дослідження. Такі зміни можна пояснити посиленою утилізацією надлишкової кількості гомоцистеїну в шляху транссульфування, де цистеїн функціонує як проміжний метаболіт, що і призводить до підвищення концентрації останнього в крові та тканинах органів щурів, яким вводили мерказоліл [18].

Введення щурам мерказолілу призводило до достовірного зменшення H_2S у крові в 1,2 раза на 14-ту добу експерименту (з $(88,02 \pm 4,35)$ до $(72,9 \pm 3,50)$ мкмоль/л), а подальше введення протягом 21-ї доби спричиняло зниження концентрації H_2S в 1,3 раза (рис. 2).

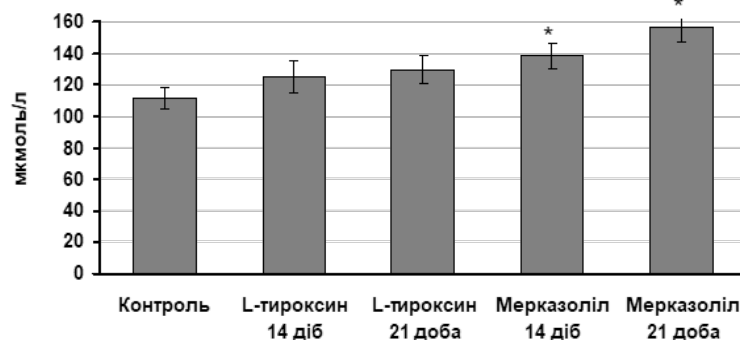


Рис. 1. Концентрація цистеїну (мкмоль/л) у сироватці крові щурів з моделлю гіпер- та гіпотиреозу.

Примітка. Тут, на рисунку 2, у таблицях 1–4: * – зміни достовірні відносно показників групи інтактних тварин.

Таблиця 1 – Вміст цистеїну (мкмоль/г тканини) в органах щурів з гіпер- і гіпотиреозом (M±m, n=8)

Показник	Об'єкт дослідження	Група тварин				
		інтактні	L-тироксин		мерказоліл	
			час від початку введення препаратів, доби			
			14	21	14	21
Цистеїн	Печінка	0,25±0,01	0,22±0,04	0,19±0,05	0,32±0,01*	0,36±0,02*
	Нирки	0,94±0,07	0,85±0,14	0,70±0,10	1,27±0,03*	1,42±0,02*
	Серце	0,15±0,01	0,13±0,01	0,12±0,02	0,20±0,01*	0,24±0,02*
	Мозок	0,08±0,01	0,07±0,02	0,06±0,01	0,11±0,01*	0,12±0,01*

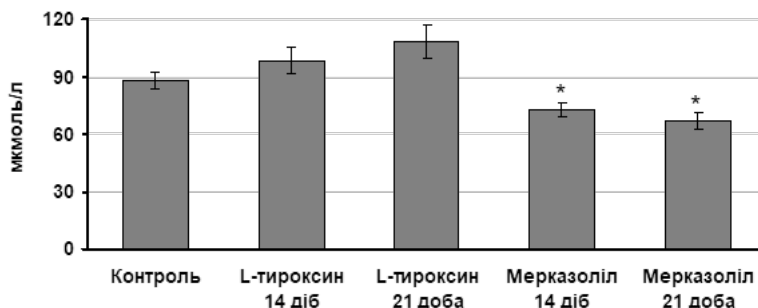


Рис. 2. Концентрація гідроген сульфїду (мкмоль/л) у сироватці крові щурів з моделлю гіпер- та гіпотиреозу.

Оскільки H_2S , як і NO , має вазодилатаційні властивості й запобігає посиленому тромбоутворенню, то таке зменшення його вмісту при зниженій концентрації тиреоїдних гормонів має несприятливий ефект. Можливо, цей факт і пояснює розвиток ендотеліальної дисфункції і кардіоваскулярних розладів, які спостерігають у хворих з гіпотиреозом. Подібний результат отримали С. Ніне та співавт. [19], які досліджували вплив тиреоїдних гормонів на продукування H_2S у печінці мишей. У тварин з гіпотиреозом було виявлено зниження активності цистатіонін-γ-ліази і зменшення вмісту відповідної мРНК в гепатоцитах. L-тироксин підвищував рівень мРНК ЦГЛ залежно від дози і терміну введення. Автори зробили висновок, що тиреоїдні гормони стимулюють транскрипцію гена ЦГЛ, а також можуть діяти на посттранскрипційному рівні.

Ми також проаналізували вплив тиреоїдних гормонів на активність ЦБС, ЦГЛ і ЦАТ, що забезпечують десульфуразні реакції в організмі (табл. 2). У тканині печінки тварин з гіпотиреозом десульфуразна активність ЦБС та ЦГЛ достовірно знижувалася тільки на 21-шу добу (на 33 %), а ЦАТ – і на 14-ту, і на 21-шу доби (відповідно, на 36 та 38 %). Введення L-тироксину не призводило до змін активності цих ензимів у тканині печінки. У тканині нирок відбувалися подібні зміни. Так, активність ЦБС при експериментальному гіпотиреозі знижувалась на 18 та 28 %, активність ЦГЛ – на 37 і 39 %, активність ЦАТ зменшувалась лише при тривалому застосуванні мерказолілу – на 19 %. Десульфуразна активність ЦБС та ЦГЛ у тканині мозку знижувалась при моделюванні тривалого експериментального гіпотиреозу на 33 і 45 %. Активність

Таблиця 2 – Активність (нмоль/хв·мг білка) ензимів синтезу гідроген сульфїду в печінці, нирках, мозку і серці щурів з моделлю гіпер- та гіпотиреозу (M±m, n=8)

Показник	Об'єкт дослідження	Група тварин				
		інтактні	модель гіпертиреозу		модель гіпотиреозу	
			час від початку введення			
			L-тироксину, доби		мерказолілу, доби	
		14	21	14	21	
ЦБС	Печінка	4,04±0,34	4,38±0,45	4,65±0,37	3,28±0,22	2,72±0,27*
	Нирки	3,31±0,10	3,33±0,22	4,01±0,20*	2,70±0,18*	2,37±0,25*
	Мозок	0,35±0,02	0,30±0,04	0,56±0,06	0,29±0,02	0,23±0,02*
ЦГЛ	Печінка	4,01±0,20	4,17±0,23	4,30±0,16	3,06±0,31	2,70±0,21*
	Нирки	0,92±0,04	1,29±0,14	1,84±0,15*	0,58±0,03*	0,56±0,03*
	Мозок	0,20±0,01	0,18±0,01	0,24±0,04	0,18±0,01	0,11±0,02*
	Серце	0,40±0,03	0,52±0,02*	0,56±0,02*	0,28±0,02*	0,25±0,03*
ЦАТ	Печінка	1,67±0,12	1,41±0,20	1,80±0,29	1,07±0,14*	1,03±0,12*
	Нирки	1,28±0,03	1,44±0,08	1,43±0,10	1,20±0,10	1,04±0,07*
	Мозок	0,21±0,03	0,34±0,03*	0,46±0,04*	0,20±0,02	0,14±0,01
	Серце	0,18±0,02	0,13±0,01	0,23±0,02	0,14±0,02	0,11±0,03

ЦАТ у тканині мозку зростала під впливом L-тироксину на 62 та 119 %. У серці тільки активність ЦГЛ зазнавала змін при моделюванні експериментального гіпер- та гіпотиреозу – при введенні L-тироксину вона підвищувалась на 30 і 40 %, водночас мерказоліл призводив до зниження активності даного ензиму на 30 та 38 %.

Глутатіон не лише відіграє важливу роль в інактивації активних форм кисню та підтримці тиол-дисульфідного балансу, але і регулює функцію багатьох редокс-чутливих білків. З результатів, наведених у таблиці 3, випливає, що введення піддослідним тваринам L-тироксину чи мерказолілу не викликало суттєвих змін інтенсивності синтезу глутатіону із цистеїну в печінці, нирках та мозку. Водночас у щурів з гіпертиреозом процес суттєво зростав у тканині серця. Так, тривале введення гормону (протягом 21-ї доби) призводило до зростання активності γ -ГЦЛ на 113 %. Як видно з таблиці 3, експериментальний гіпотиреоз не викликав достовірних змін концентрації відновленого глутатіону в крові. Водночас через 14 діб після введення L-тироксину його вміст зменшувався на 24 %, через 21 добу – на 34 %. Концентрація відновленого глутатіону в органах також достовірно знижувалася під впли-

вом L-тироксину: в печінці – на 18 та 25 %; у нирках – на 20 і 27 %; у серці – на 13 та 19 %; у мозку – на 15 і 21 % порівняно з контрольною групою тварин. M. Sajadian та співавт. [20] показали, що гіпертиреоз викликає зниження активності глутатіонпероксидази і призводить до розвитку оксидативного стресу в підшлунковій залозі щурів.

При вивченні цистеїнсульфінатного шляху перетворення цистеїну було встановлено, що швидкість синтезу цистеїнсульфінової кислоти в печінці щурів, яким вводили L-тироксин протягом 14-ти і 21-ї діб, мала тенденцію до зростання, проте при статистичному аналізі зміни виявилися недостовірними. Тільки моделювання тривалого гіпотиреозу протягом 21-ї доби викликало достовірне (на 43 %) пригнічення першої реакції цистеїнсульфінатного шляху в нирках експериментальних тварин. Також введення щурам мерказолілу протягом 21-ї доби призводило до пригнічення ЦДО в мозку на 29 %. Отже, мерказоліл при його тривалому застосуванні (протягом 21-ї доби) спричиняє порушення метаболізму цистеїну до сульфатів за рахунок пригнічення першого ензиму цистеїнсульфінатного шляху – ЦДО (табл. 4).

Таблиця 3 – Вміст відновленого глутатіону в органах (мкмоль/г тканини) та крові (мкмоль/л) щурів з гіпер- і гіпотиреозом

Показник	Об'єкт дослідження	Група тварин				
		інтактні	L-тироксин		мерказоліл	
			час від початку введення препаратів, доби			
		14	21	14	21	
GSH	Кров	58,5±4,31	44,3±2,90*	38,6±2,84*	60,4±4,80	59,3±3,25
	Печінка	3,55±0,15	2,91±0,11*	2,66±0,14*	3,05±0,25	3,02±0,26
	Нирки	1,35±0,07	1,08±0,05*	0,98±0,06*	1,18±0,10	1,12±0,09
	Серце	2,48±0,10	2,15±0,05*	2,01±0,10*	2,28±0,15	2,22±0,16
	Мозок	2,20±0,09	1,87±0,05*	1,73±0,09*	2,07±0,16	2,01±0,19

Таблиця 4 – Активність (нмоль/хв·мг білка) ензимів метаболізму цистеїну в печінці, нирках, мозку і серці щурів з моделлю гіпер- та гіпотиреозу (M±m, n=8)

Показник	Об'єкт дослідження	Група тварин				
		інтактні	модель гіпертиреозу		модель гіпотиреозу	
			час від початку введення L-тироксину, доби		час від початку введення мерказолілу, доби	
		14	21	14	21	
ЦДО	Печінка	1,12±0,13	0,99±0,12	1,44±0,15	0,69±0,08	0,66±0,07
	Нирки	0,42±0,03	0,58±0,04	0,85±0,07	0,30±0,03	0,24±0,03*
	Мозок	3,83±0,31	4,17±0,05	4,94±0,06	3,54±0,45	2,72±0,20*
γ -ГЦЛ	Печінка	4,50±0,86	5,76±0,82	9,65±1,93	4,35±0,12	7,30±0,88
	Нирки	2,66±0,58	3,12±0,60	5,90±0,56	3,49±0,45	4,75±0,45
	Мозок	1,46±0,71	1,71±0,25	1,64±0,32	1,98±0,28	2,68±0,59
	Серце	4,05±1,41	4,46±0,63	8,63±1,60*	4,49±2,38	4,28±1,95
ТСТ	Печінка	1,18±0,13	1,27±0,18	1,50±0,22	1,17±0,05	1,11±0,25
	Нирки	0,84±0,08	0,74±0,07	0,89±0,09	0,90±0,08	0,57±0,04*
СО	Печінка	3,77±0,30	4,12±0,45	4,33±0,31	3,19±0,31	3,11±0,42
	Нирки	3,67±0,29	3,96±0,22	4,19±0,27	2,51±0,13*	2,22±0,10*
	Мозок	0,91±0,22	2,20±0,58*	2,38±0,19*	0,52±0,06	0,56±0,05*
	Серце	1,99±0,24	1,83±0,20	2,12±0,31	1,35±0,16*	0,97±0,24*

Подібні результати отримали J. Rakoczy та співавт. [21], які показали, що експресія мРНК ЦДО в плаценті мишей у третьому триместрі вагітності здійснюється з участю тиреоїдних гормонів. Автори вважають, що механізм такого впливу тиреоїдних гормонів на обмін цистеїну в організмі мишей відіграє важливу роль у синтезі сульфатів і таурину.

Тіосульфатдитіолсульфідтрансфераза (тіосульфатсульфуртрансфераза) – ензим, що каталізує взаємне перетворення тіосульфату і гідроген сульфїду. З даних, наведених у таблиці 4, видно, що в печінці щурів, яким вводили L-тироксин та мерказоліл, активність цього ензиму достовірно не змінювалась, порівняно з інтактними тваринами, в обидва терміни дослідження. У нирках щурів активність тіосульфатсульфуртрансферази змінювалась тільки під впливом мерказолїлу (при тривалому введенні активність знизилась на 32 %).

Активність кінцевого ензиму цистеїнсульфінатного шляху – СО, що перетворює неорганічні сульфїти до сульфатів, у печінці практично не залежала від вираження і тривалості експериментального гіпер- та гіпотиреозу. В нирках при введенні мерказолїлу спостерігали достовірне зниження активності цього ензиму в обидва терміни дослідження (на 32 та 40 %).

У мозку щурів, у яких моделювали гіпертиреоз протягом 14-ти діб, активність СО була на 142 % вищою порівняно з інтактними тваринами, подальше введення препарату призвело до її зростання на 162 %. На відміну від L-тироксину, лише тривале введення мерказолїлу спричинило

зменшення швидкості утворення сульфатів із сульфїтів. На 21-шу добу експерименту активність ензиму в мозку знижувалася майже на 38 % порівняно із щурами, яким препарат не вводили. Лише введення мерказолїлу призводило до змін активності СО в серці тварин – вона достовірно зменшувалася на 32 та 51 %.

ВИСНОВКИ. 1. Нестача тиреоїдних гормонів в організмі супроводжується пригніченням десульфуразної активності трьох основних ферментів – цистатіонін- β -синтази, цистатіонін- γ -ліази і цистеїнамінотрансферази та, як наслідок, зниженням концентрації H_2S у крові. Можливо, це є одним із патогенетичних факторів розвитку гіпертензії та гіперкоагуляції в пацієнтів з гіпотиреозом.

2. У всіх органах щурів з гіпертиреозом сповільнюється процес синтезу глутатіону.

3. Гіпотиреоз призводить до достовірного підвищення рівня цистеїну в сироватці крові, що є результатом пригнічення цистеїнсульфінатного шляху та реакцій десульфурування цистеїну.

4. Під впливом L-тироксину зазнає пригнічення процес синтезу глутатіону в органах тварин, що може бути однією з причин розвитку оксидативного стресу в пацієнтів з гіпертиреозом.

5. Подальші дослідження впливу тиреоїдних гормонів на різні аспекти метаболізму сірковмісних амінокислот дозволять покращити розуміння механізмів формування патологічних станів, що асоційовані з порушеннями їх синтезу, та оптимізувати підходи до їх фармакотерапії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Stipanuk M. H. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur / M. H. Stipanuk, I. Ueki // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2011. – **34** (1). – P. 17–32. doi: 10.1007/s10545-009-9006-9.

2. Pajares M. A. Mammalian sulfur amino acid metabolism: a nexus between redox regulation, nutrition, epigenetics and detoxification / M. A. Pajares, D. Pérez-Sala // *Antioxid. Redox Signal.* – 2017 – **30**. doi: 10.1089/ars.2017.7237.

3. S-sulfhydration as a cellular redox regulation / M. Iciek, D. Kowalczyk-Pachel, A. Bilaska-Wilkosz [et al.] // *Biosci Rep.* – 2015 – **36** (2). pii: e00304. doi: 10.1042/BSR20150147.

4. A review of hydrogen sulfide (H_2S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications / C. R. Powell, K. M. Dillon, J. B. Matson // *Biochem. Pharmacol.* – 2017. pii: S0006-2952(17)30695-0. doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.014.

5. The effect of taurine on cholesterol metabolism / W. Chen, J. X. Guo, P. Chang // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2012. – No. 56 (5). – P. 681–690. doi:10.1002/mnfr.201100799.

6. Wang R. Hydrogen sulfide: the third gasotransmitter in biology and medicine // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – No. 12 (9). – P. 1061–1064.

7. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions / H. Kimura // *Amino Acids.* – 2011. – **41** (1). – P. 113–121. doi: 10.1007/s00726-010-0510-x.

8. Paul B. D. H₂S: A novel gasotransmitter that signals by sulfhydration / B. D. Paul, S. H. Snyder // *Trends in biochemical sciences*. – **40**, No. 11. – P. 687–700. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.08.007.

9. Regulation of cystathionine gamma-lyase/H₂S system and its pathological implication / K Zhao, H. Li, S. Li [et al.] // *Front Biosci. (Landmark Ed)*. – 2014. – **19**. – P.1355–1369.

10. Thiosulfate: a readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing / K. R. Olson, E. R. DeLeon, Y. Gao [et al.] // *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2013. – **305**, No. 6. – P. 592–603. DOI: 10.1152/ajpregu.00421.2012.

11. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid / M. K. Gaitonde // *Biochem. J.* – 1967. – No. 104 (2). – P. 627–633.

12. Glutathione disulfide as an index of oxidative stress during postischemic reperfusion in isolated rat hearts / R. J. Verbunt, W. G. van Dockum, E. M. Bastiaanse [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 1995 – **144** (1). – P. 85–93.

13. Пат. України на корисну модель № 52136 У, МПК G01N 33/68. Спосіб визначення вмісту гідроген сульфідів в плазмі крові / Заїчко Н. В., Пентюк Н. О., Мельник А. В. ; заявник і патентовласник НДІ реабілітації інвалідів Вінниц. нац. мед. ун-ту імені М. І. Пирогова. – № у 201003158 ; заявл. 19.03.10 ; опубл. 10.08.10, Бюл. № 15.

14. Пат. України на корисну модель № 45018 У, МПК G01N 33/00. Спосіб визначення продукції гідроген сульфідів в органах щурів / Заїчко Н. В., Пен-

тук Н. О., Мельник А. В., Штатко О. І. ; заявник і патентовласник Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів (навчально-лікувальний комплекс) Вінниц. нац. мед. ун-ту імені М. І. Пирогова. – № у 2009 04434 ; заявл. 05.05.09 ; опубл. 26.10.09, Бюл. № 20.

15. Orłowski M. Partial reaction by γ -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate / M. Orłowski, A. Mrister // *J. Biol. Chem.* – 1971. – **246**, No. 23. – P. 7095–7105.

16. Catabolism of cyst(e)ine by rat renal cortical tubules / M. H. Stipanuk, J. De la Rosa, L. L. Hirschberger // *J. Nutr.* – 1990. – **120**, No. 5. – P. 450–458.

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

18. Sulphur-containing amino acids exchange in cases of experimental hyper- and hypothyroidism in rats / V. Nechiporuk, N. Zaichko, M. Korda [et al.] // *Georgian Medical News*. – **10** (271). – P. 96–102.

19. Hypothalamic-pituitary axis regulates hydrogen sulfide production / C. Hine, H. J. Kim, Y. Zhu [et al.] // *Cell Metabolism*. 2017. – **25**, No. 6. – P. 1320–1333. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.05.003.

20. The effect of experimental thyroid dysfunction on markers of oxidative stress in rat pancreas / M. Sajadian, M. Hashemi, S. Salimi [et al.] // *Drug Development Research*. – 2016. – **77**, No. 4 – P. 199–205. DOI: 10.1002/ddr.21312.

21. Placental and fetal cysteine dioxygenase gene expression in mouse gestation / J. Rakoczy, S. Lee, S. J. Weerasekera [et al.] // *Placenta*. – 2015. – **36**, No. 8. – P. 956–959. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.06.003.

REFERENCES

1. Stipanuk, M.H., & Ueki, I. (2011) Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **34** (1), 17-32. doi: 10.1007/s10545-009-9006-9.

2. Pajares, M.A., & Pérez-Sala, D. (2017). Mammalian sulfur amino acid metabolism: a nexus between redox regulation, nutrition, epigenetics and detoxification. *Antioxid. Redox. Signal.* doi: 10.1089/ars.2017.7237.

3. Iciek, M., Kowalczyk-Pachel, D., Bilska-Wilkosz, A., Kwiecień, I., Górny, M., & Włodek, L. (2015). S-sulfhydration as a cellular redox regulation. *Biosci. Rep.*, **36** (2). pii: e00304. doi: 10.1042/BSR20150147.

4. Powell, C.R., Dillon, K.M., & Matson, J.B. (2017) A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* pii: S0006-2952(17)30695-0. doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.014.

5. Chen, W., Guo, J.X., & Chang, P. (2012). The effect of taurine on cholesterol metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.*, **56** (5), 681-690. doi: 10.1002/mnfr.201100799.

6. Wang, R. (2010). Hydrogen sulfide: the third gasotransmitter in biology and medicine. *Antioxid. Redox Signal*, **12** (9), 1061-1064.

7. Kimura, H. (2011) Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids*, **41** (1), 113-121. doi: 10.1007/s00726-010-0510-x.

8. Paul, B.D., & Snyder, S.H. (2015) H₂S: A novel gasotransmitter that signals by sulfhydration. *Trends in Biochemical Sciences*, **40** (11), 687-700. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.08.007.

9. Zhao, K., Li, H., Li, S., & Yang, G. (2014) Regulation of cystathionine gamma-lyase/H₂S system and its pathological implication. *Front Biosci. (Landmark Ed)*, **19**, 1355-1369.

10. Olson, K.R., DeLeon, E.R., Gao, Y., Hurley, K., Sadauskas, V., Batz, C., & Stoy, G.F. (2013). Thiosulfate: a readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **305** (6), 592-603. DOI: 10.1152/ajpregu.00421.2012.

11. Gaitonde, M.K. (1967) A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid. *Biochem. J.*, **104** (2), 627-633.

12. Verbunt, R.J., van Dockum, W.G., Bastiaanse, E.M., Egas J.M., & van der Laarse, A. (1995) Glutathione

disulfide as an index of oxidative stress during postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Mol. Cell Biochem.*, 144 (1), 85-93.

13. Zaichko, N.V., Melnyk, A.V., & Pentiuk, N.O. (2010). Sposib vyznachennia vmistu hidrohen sulfidu plazmy krvi [Method for determination of content of hydrogensulfide in blood serum]. *Patent UA*, No. 52136 [in Ukrainian].

14. Zaichko, N.V., Pentiuk, N.O., Melnyk, A.V., & Shtatko, O.I. (2009). Sposib vyznachennia produktsii hidrohen sulfidu v orhanakh shchuriv [Method for determination of production of hydrogen-sulfide in animal organs]. *Patent UA*, No. 45018 [in Ukrainian].

15. Orłowski, M., & Mrister, A. (1971). Partial reaction by γ -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate. *J. Biol. Chem.*, 246 (23), 7095-7105.

16. Stipanuk, M.H., De la Rosa J., Hirschberger L.L. (1990) Catabolism of cyst(e)ine by rat renal cortical tubules. *J. Nutr.*, 120 (5), 450-458.

17. Cohen, H.J., & Fridovich, I. (1971) Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 246 (2), 359-366.

18. Nechiporuk, V., Zaichko, N., Korda, M., Melnyk, A., & Koloshko, O. (2017). Sulphur-containing amino acids exchange in cases of experimental hyper- and hypothyroidism in rats. *Georgian Medical News*, 10 (271), 96-102.

19. Hine, C., Kim, H.J., Zhu, Y., Harputlugil, E., Longchamp, A., Matos, M.S., ... Ramadoss, P. (2017). Hypothalamic-pituitary axis regulates hydrogen sulfide production. *Cell Metabolism*, 25 (6), 1320-1333 DOI: 10.1016/j.cmet.2017.05.003.

20. Sajadian, M., Hashemi, M., Salimi, S., & Nakhae, A. (2016). The effect of experimental thyroid dysfunction on markers of oxidative stress in rat pancreas. *Drug Development Research*, 77 (4), 199-205. DOI: 10.1002/ddr.21312.

21. Rakoczy, J., Lee, S., Weerasekera, S.J., Simmons, D.G., & Dawson, P.A. (2015). Placental and fetal cysteine dioxygenase gene expression in mouse gestation. *Placenta*, 36 (8), 956-959. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.06.003.

В. М. Нечипорук¹, М. М. Корда²

**ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА¹
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО²**

МЕТАБОЛИЗМ ЦИСТЕИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПЕР- И ГИПОТИРЕОЗЕ У КРЫС

Резюме

Вступление. Серосодержащие аминокислоты обеспечивают процессы жизнедеятельности клеток, поддерживают целостность их редокс-потенциала, обезвреживают свободные радикалы и токсические агенты, обеспечивают процессы метилирования и транссульфурирования. Известно, что цистеин образуется в клетках с гомоцистеина, а использоваться может, в зависимости от потребностей клетки, на синтез белка, глутатиона, в десульфурозном пути с образованием сероводорода. Регуляция метаболизма серосодержащих аминокислот осуществляется на разных уровнях, в том числе и эндокринной системой, в частности тиреоидными гормонами.

Цель исследования – в эксперименте изучить влияние функционального состояния щитовидной железы на активность энзимов цикла обмена цистеина в тканях печени, почек, мозга, миокарда, установить содержание цистеина, восстановленного глутатиона и сероводорода в крови.

Методы исследования. В работе использовано 40 крыс-самцов массой 150–180 г. Для моделирования гипер- и гипотиреоза животным ежедневно в течение 14-ти и 21-х суток энтерально вводили раствор L-тироксина (200 мкг/сутки на 1 кг массы) или мерказолила (10 мг/сутки на 1 кг массы). В мозге крыс определяли десульфурозную активность энзимов цистатионин- β -синтазы и цистатионин- γ -лиазы, в крови – содержание цистеина, гомоцистеина и сероводорода.

Результаты и обсуждение. Крысам вводили L-тироксин и мерказолил для моделирования состояний гипер- и гипотиреоза, которые подтверждали по содержанию свободного трийодтиронина, свободного тироксина и тиреотропного гормона в крови. В органах животных с гипотиреозом наблюдали снижение активности цистатионин- β -синтазы, цистатионин- γ -лиазы и цистеинаминотрансферазы. В то же время введение L-тироксина приводило к повышению активности данных энзимов в почках и мозге. Гипертиреоз сопровождался снижением, а гипотиреоз не повлиял на концентрацию глутатиона в крови и на его содержание в органах животных. Установлено достоверное снижение концентрации сероводорода в крови при гипотиреозе.

Вывод. Поражение сердечно-сосудистой системы при гипотиреозе может быть следствием нарушения процессов десульфирования в органах и тканях, введение L-тироксина приводит к снижению синтеза глутатиона в сыворотке и органах животных, что может быть одной из причин развития оксидативного стресса у пациентов с гипертиреозом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиреоидные гормоны; цикл десульфирования; цистеин; глутатион.

V. M. Nechiporuk¹, M. M. Korda²

M. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY¹
I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY²

METABOLISM OF CYSTEINE IN EXPERIMENTAL HYPER- AND HYPOTHYROIDISM IN RATS

Summary

Introduction. Sulfur-containing amino acids provide vital processes of the cell, maintain the integrity of the redox potential, neutralize free radicals and toxic agents that provide remethylation cycle and transsulfuration processes. It is known that cysteine is formed in cells from homocysteine, and can be used, depending on the needs of the cell for the synthesis of protein, glutathione, in a desulfuration pathway with the formation of hydrogen sulfide (H₂S). Regulation of the metabolism of sulfur-containing amino acids is carried out at different levels, including the endocrine system, in particular, thyroid hormones.

The aim of the study – to investigate experimentally the influence of thyroid gland functional state on the main enzymatic systems of the cysteine cycle in the tissues (liver, kidneys, brain, heart), concentration of cysteine and reduced glutathione and hydrogen sulfide in the blood.

Research Methods. 40 male rats weighing 150–180 g were used in the study. To model hyper- and hypothyroidism, animals were daily enterally administered with a solution of L-thyroxine (200 µg / day per 1 kg of weight) or mercazolil (10 mg / day per 1 kg) for the 14th and 21st days. In the brain of animals, the desulfurase activity of cystathionine-β-synthase (CBS) and cystathionine-γ-lyase (CGL) enzymes was determined, and cysteine, GC, and hydrogen sulfide content in the blood.

Results and Discussion. The rats were administered with L-thyroxine and mercazolil to simulate the states of hyper- and hypothyroidism, which were confirmed by the content of fT₃, fT₄ and TSH in the blood. In organs of animals with hypothyroidism, a decrease in the activity of CBS, CGL, and CAP was observed. At the same time, the introduction of L-thyroxin led to an increase in the activity of these enzymes in the kidney and brain. Hyperthyroidism was accompanied by a decrease, and hypothyroidism did not affect the concentration of glutathione in the blood and its content in the organs of animals. A significant decrease in the concentration of hydrogen sulfide in the blood with hypothyroidism was established.

Conclusion. The disorder of the cardiovascular system in hypothyroidism may be a consequence of the disorders of desulfuration processes in organs and tissues, the administration of L-thyroxin leads to a decrease in the synthesis of glutathione in the serum and animal organs may be one of the causes of the result formation of oxidative stress in patients with hyperthyroidism.

KEY WORDS: thyroid hormones; desulfuration cycle, cysteine, glutathione.

Отримано 12.10.17

Адреса для листування: В. М. Нечипорук, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна, e-mail: nechiporuk@vnmu.edu.ua.