

СТАН СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ НЕФРОПАТІЇ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ

Стан системи гідроген сульфід у печінки щурів при експериментальній нефропатії за умов введення мелатоніну

I. О. Коляник, I. В. Геруш

Буковинський державний медичний університет,
м. Чернівці

Резюме. Метаболічні порушення, що виникають при нефропатії, супроводжуються продукцією вільних радикалів, що призводить до структурно-функціональних порушень клітинних мембран різних органів і систем, у тому числі й печінки. Гідроген сульфід (H_2S) – це газотрансмітер і важлива сигнальна молекула, що регулює безліч фізіологічних та патофізіологічних процесів. Мелатонін, як гормон епіфіза, володіє імуностимулюючими, детоксикаційними та антиоксидантними властивостями. Однак залишаються нез'ясованими всі механізми дії мелатоніну, зокрема його вплив на систему гідроген сульфід у нефропатії.

Мета дослідження – з'ясувати вплив мелатоніну на стан системи гідроген сульфід у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

Матеріали і методи. Експеримент проведено на 84 нелінійних щурах-самцях масою 0,16–0,18 кг. Експериментальну нефропатію моделювали за допомогою одноразового внутрішньочеревного введення фолієвої кислоти в дозі 250 мг/кг маси тіла. Мелатонін вводили інтрагастрально упродовж 7-ми днів після моделювання нефропатії в дозі 10 мг/кг. У постмітохондріальній фракції печінки щурів визначали продукцію та концентрацію гідроген сульфід, а також активність H_2S -генеруючих ензимів: цистатіонін- γ -ліази (CSE), цистатіонін- β -синтази (CBS) та цистеїнамінотрансферази (CAT).

Результати. При експериментальній нефропатії встановлено зниження продукції та концентрації H_2S на 27,9 % і 45,2 % відповідно, а також зниження активності H_2S -продукуючих ензимів: CSE – на 31,7 %, CBS – на 32,1 % та CAT – на 32,7 % відповідно порівняно з групою контрольних тварин. Введення мелатоніну сприяло підвищенню H_2S -продукції та концентрації на 20,9 % і 33,0 %, а також активності H_2S -продукуючих ензимів CBS та CAT на 23,7 % і 25,4 % відповідно, порівняно з показниками тварин із нефропатією, але все ще достовірно відрізнялося від показників контрольних тварин.

Висновки. Нефропатія призводить до зниження концентрації та продукції H_2S у печінці щурів, через

The state of the liver hydrogen sulfide system in rats with experimental nephropathy under conditions of melatonin introduction

I. O. Koliyanuk, I. V. Gerush

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi

e-mail: gerushiv@ukr.net

Summary. Metabolic disorders occurring with nephropathy are associated with the production of free radicals resulting in structural-functional disturbances of the cellular membranes of different organs and systems including the liver. Hydrogen sulfide (H_2S) is a gas transmitter and an important signal molecule regulating a number of physiological and pathophysiological processes. Melatonin as a hormone produced by the pineal body possesses immune stimulating, disintoxicating and antioxidant properties. Meanwhile, all the mechanisms of melatonin action still remain uncertain, in particular its effect on the hydrogen sulfide system with nephropathy.

The aim of the study – to determine melatonin effect on the hydrogen sulfide system state in the liver of rats under conditions of experimental nephropathy.

Materials and Methods. The experiment was carried out on 84 nonlinear male rats with the body weight of 0.16–0.18 kg. Experimental nephropathy was simulated by means of a single introduction of folic acid into the peritoneum in the dose of 250 mg/kg of the body weight. Melatonin was introduced into the stomach during 7 days in the dose of 10 mg/kg after nephropathy was simulated. The production and concentration of hydrogen sulfide, activity of H_2S -generating enzymes such as cystathionine γ -lyase (CSE), cystathionine β -synthase (CBS) and cysteine aminotransferase (CAT) were determined in the post-mitochondrial liver fraction of rats.

Results. With experimental nephropathy the production and concentration of H_2S 27.9 % and 45.2 % decreased respectively, and the activity of H_2S -generating enzymes decreased as well: CSE by 31.7 %, CBS by 32.1 % and CAT by 32.7 %, in comparison with the group of control animals. Melatonin introduction promoted increase of H_2S -production and concentration by 20.9 % and 33.0 %, as well as the activity of H_2S -producing enzymes CBS and CAT by 23.7 % and 25.4 % respectively, in comparison with the parameters of animals with nephropathy, but they differed reliably from the parameters of the control animals.

Conclusions. Nephropathy leads to decrease of the concentration and production of H_2S in the liver of animals

пригнічення H_2S -продукуючої активності ензимів, що генерують H_2S . Введення мелатоніну сприяло підвищенню вмісту гідроген сульфідів як за рахунок підвищення активності CBS та CAT, так, ймовірно, і за рахунок безпосередньої участі мелатоніну в знешкодженні вільних радикалів та зниженні окиснювальної модифікації протеїнів, зокрема і досліджуваних ензимів.

Ключові слова: гідроген сульфід; нефропатія; печінка; мелатонін.

ВСТУП

Одна з актуальних проблем у сучасній медицині – захворювання нирок. Метаболічні порушення, що виникають при нефропатії, супроводжуються продукцією вільних радикалів, що призводить до структурно-функціональних порушень клітинних мембран та посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів, що спричинятиме ушкодження різних органів і систем, у тому числі й печінки.

Добре відомо, що печінка бере участь у метаболізмі глюкози та ліпідів, антиоксидантному захисті та метаболізмі ксенобіотиків. Також вона забезпечує розщеплення сірковмісних амінокислот та утворення гідроген сульфідів (H_2S) [1].

За останнє десятиліття гідроген сульфід зацікавив вчених як газотрансмітер та важлива сигнальна молекула поряд із монооксидом вуглецю (CO) та монооксидом азоту (NO) [2, 3]. Він утворюється в результаті різноманітних ферментативних та неферментативних реакцій, і регулює безліч фізіологічних та патофізіологічних процесів у різноманітних клітинах та тканинах. Гідроген сульфід діє як судинорозширювальний, цитопротекторний та протизапальний засіб при низьких концентраціях, але також здатний викликати цитотоксичну дію при більш високих концентраціях.

У наш час H_2S залишається предметом інтенсивних досліджень, направлених на те, щоб краще зрозуміти його біологічну роль та можливості застосування для досягнення терапевтичного ефекту.

Мелатонін, як гормон епіфіза, володіє широким спектром фізіологічних функцій: регулює циркадні ритми, артеріальний тиск, володіє протипухлинною, імуностимулюючою, детоксикаційною та антиоксидантною діями. Оскільки мелатонін легко проникає через біологічні мембрани, то його ефекти проявляються в кожній клітині організму [4]. Проте залишаються нез'ясованими всі механізми дії мелатоніну, зокрема, його вплив на систему гідроген сульфідів при нефропатії.

Метою дослідження було вивчити вплив мелатоніну на систему H_2S -продукуючих ензимів, концентрацію та продукцію H_2S у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

due to inhibition of H_2S -producing activity of enzymes generating H_2S . Melatonin introduction promoted increase of hydrogen sulfide content both at the expense of increased activity of CBS and CAT, and probably at the expense of a direct participation of melatonin in neutralization of free radicals and reduction of protein oxidative modification, and the examined enzymes in particular.

Key words: hydrogen sulfide; nephropathy; liver; melatonin.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експеримент проводили на 84 білих статевозрілих щурах-самцях масою 0,16–0,18 кг. Моделювання нефропатії здійснювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення фолієвої кислоти (Sigma-Aldrich, США) у дозі 250 мг/кг маси тіла [5]. Тварин поділили на 3 групи: перша – інтактна група тварин; друга – експериментальні тварини, із змодельованою нефропатією (7 днів); третя – тварини, яким на тлі моделювання експериментальної нефропатії щоденно вводили мелатонін (Sigma-Aldrich, USA) в дозі 10 мг/кг маси тіла внутрішньошлунково упродовж 7 днів.

Усі маніпуляції з експериментальними тваринами проведені з дотриманням основних положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006), Директиви Ради Європи 2010/63 EU щодо експериментів на тваринах.

Активність цистатіонін-γ-ліази (CSE), цистатіонін-β-синтази (CBS) та цистеїнамінотрансферази (CAT) оцінювали за кількістю утвореного гідроген сульфідів [6] в постмітохондріальній фракції гомогенатів печінки. Продукцію та концентрацію гідроген сульфідів визначали спектрофотометричним методом, що ґрунтується на реакції між сульфід-аніоном та N, N-диметилпарафенілендіаміном у кислому середовищі в присутності іонів Fe^{3+} [7, 8]. Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [9]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Agilent Cary 60.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона. Результати вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

За умов експериментальної нефропатії спостерігалось зниження концентрації гідроген сульфідів (рис. 1) в печінці щурів на 45,2 % та продукції гідроген сульфідів (рис. 2) на 27,9 %, що супроводжувалося і зниженням активності H_2S -синтезуючих ензимів (рис. 3): CSE – на 31,7 %, CBS – на 32,1%, CAT – на 32,7 % порівняно з показниками групи контрольних тварин.

H_2S – ендогенний газотрансмітер, що утворюється в результаті ензиматичних та неензиматичних

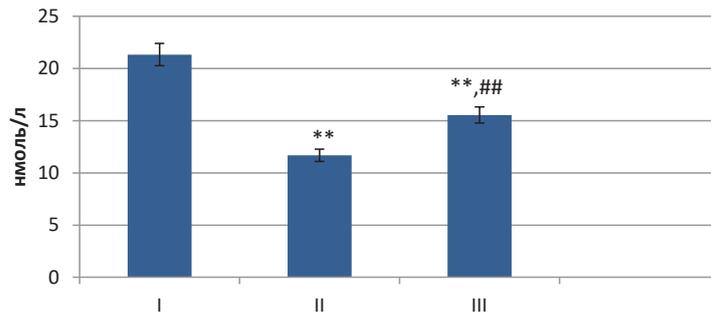


Рис. 1. Вплив мелатоніну на концентрацію гідроген сульфїду в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

Примітки: I – контроль (n=36); II– нефропатія (n=24); III – нефропатія+мелатонін (n=24); дані представлено у вигляді середня±стандартна помилка середньої (M±m).

- 1) ** – статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи тварин (p<0,01);
2) ## – статистично значущі відмінності порівняно з показниками щурів із нефропатією (p<0,01).

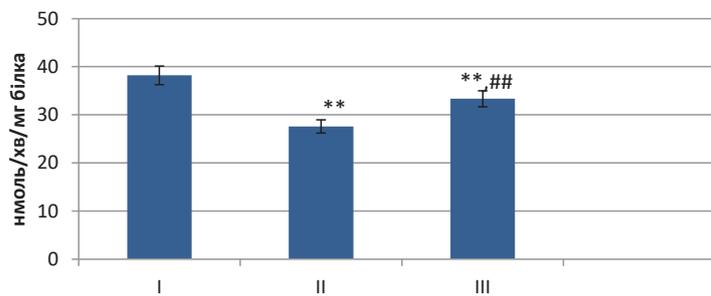


Рис. 2. Вплив мелатоніну на продукцію гідроген сульфїду в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

Примітки: I – контроль (n=36); II – нефропатія (n=24); III – нефропатія+ мелатонін (n=24); дані представлено у вигляді середня±стандартна помилка середньої (M±m).

- 1) ** – статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи тварин (p<0,01);
2) ## – статистично значущі відмінності порівняно з показниками щурів із нефропатією (p<0,01).

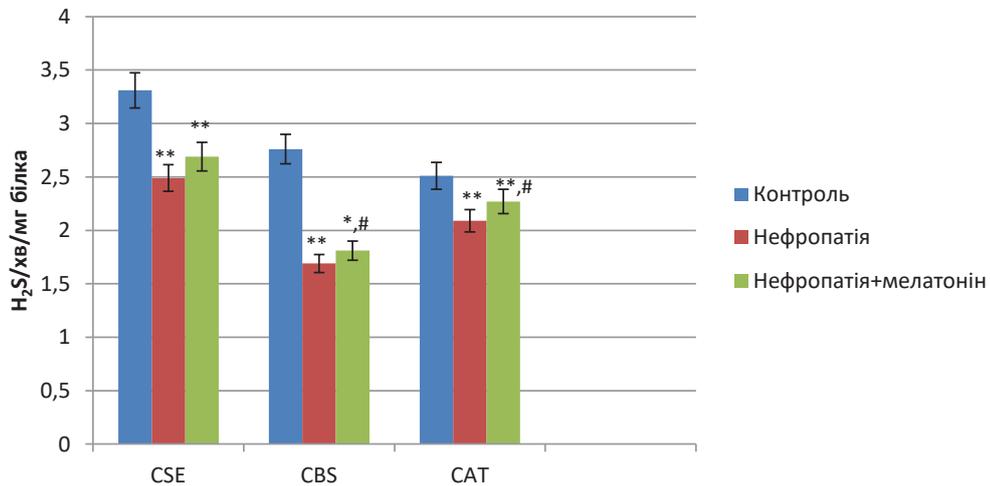


Рис. 3. Вплив мелатоніну на активність H₂S-продукуючих ензимів у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

Примітки: CSE – цистатіонін-γ-ліаза; CBS – цистатіонін-β-синтаза; CAT – цистеїнамінотрансфераза; дані представлено у вигляді середня±стандартна помилка середньої (M±m).

- 1) * – статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи тварин (p<0,05);
2) # – статистично значущі відмінності порівняно з показниками щурів із нефропатією (p<0,05);
3) ** – статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи тварин (p<0,01);
4) ## – статистично значущі відмінності порівняно з показниками щурів із нефропатією (p<0,01).

реакцій. У випадку використання неензиматичних систем, персульфіди, тиосульфати та полісульфіди можуть перетворюватися в ендogenous гідроген сульфід в присутності NADPH⁺ та NADH⁺ [10]. У процесі ензиматичного шляху CSE та CBS – цитозольні піридоксальзалежні ензими, призводять до утворення гідроген сульфід у використанні L-цистеїну та гомоцистеїну в якості основних субстратів. CAT також використовує в якості субстрату цистеїн та α-кетоглутарат, з утворенням проміжного продукту 3-меркаптопірувату, перетворення якого призводить до продукції гідроген сульфід [11, 12]. Більша частина CAT локалізується в мітохондріях, оскільки саме там концентрація L-цистеїну в 3 рази вища, ніж в цитоплазмі [10, 13].

H₂S здатний підтримувати мітохондріальні функції, пригнічуючи утворення активних форм кисню (АФО), та цим самим виявляючи антиоксидантні ефекти та сприяти репарації мітохондріальної ДНК шляхом прямої взаємодії з ензимами репарації ДНК [2].

Зміни в системі H₂S при експериментальній нефропатії можуть призводити до порушення внутрішньоклітинного метаболізму, формування нативної структури білків, синтезу глутатіону та інших важливих біологічно активних сполук.

Введення мелатоніну упродовж 7 днів сприяло підвищенню показників H₂S-продукції та H₂S-концентрації у печінці щурів на 20,9 та 33,0 % відповідно, порівняно з показниками тварин із нефропатією, але все ще достовірно відрізнялося від показників контролю. Підвищення рівня гідроген сульфід, на нашу думку, досяглося за рахунок зростання гідроген сульфідпродукуючої активності CBS на 23,7 % та CAT – на 25,4 % порівняно з показниками тва-

рин із нефропатією. Однак показники активності ензимів, що беруть участь у генерації H₂S під впливом введення мелатоніну, все ще достовірно відрізнялися від значень контрольних тварин.

Позитивний вплив мелатоніну на систему H₂S можливий за рахунок здатності мелатоніну безпосередньо перехоплювати вільні радикали, знижуючи окиснювальний стрес, та забезпечуючи ефективне функціонування дихального ланцюга мітохондрій [14]. Також H₂S збільшує активність цистин/глутаматного антипортера, тим самим збільшуючи транспорт цистину в клітини, де той, у свою чергу, відновлюється до цистеїну та включається в глутатіон – основний внутрішньоклітинний антиоксидант [15].

Дані зміни також можуть свідчити про здатність мелатоніну підвищувати вміст H₂S, який сам здатний забезпечувати захист клітин від окиснювального стресу та сприяє підвищенню рівня відновленого глутатіону [15]. А цистеїн, що міститься в складі глутатіону, у свою чергу, бере участь у метаболізмі гідроген сульфід.

ВИСНОВКИ

Нефропатія призводить до зниження концентрації та продукції H₂S у печінці щурів, через пригнічення H₂S-генеруючої активності ензимів: CSE, CBS та CAT.

Введення мелатоніну сприяло підвищенню вмісту гідроген сульфід як за рахунок підвищення гідроген сульфідпродукуючої активності CBS та CAT, так, ймовірно, і за рахунок безпосередньої участі у знешкодженні вільних радикалів та зниженні окиснювальної модифікації протеїнів, зокрема і досліджуваних ензимів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hydrogen sulfide as a novel regulatory factor in liver health and disease / D. D. Wu, D. Y. Wang, H. M. Li [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – No. 2019.
2. Szabo C. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors / C. Szabo, A. Papapetropoulos // *Pharmacological Reviews*. – 2017. – No. 69 (4). – P. 497–564.
3. Wei W. The content of hydrogen sulfide in plasma of cirrhosis rats combined with portal hypertension and the correlation with indexes of liver function and liver fibrosis / W. Wei, C. Wang, D. Li. // *Exp. Ther. Med.* – 2017. – No. 14 (5). – P. 5022–5026.
4. Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits / S. Tordjman, S. Chokron, R. Delorme [et al.] // *Current Neuropharmacology*. – 2017. – No. 15 (3). – P. 434–443.
5. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state / A. Gupta, V. Puri,

- R. Sharma, R. Puri. // *Exper. and Toxic. Pathol.* – 2012. – No. 64 (3) – P. 225
6. Stipanuk M. H. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat / M. H. Stipanuk, P. W. Beck. // *Biochem. J.* – 1982 (2). – No. 206. – P. 267–277.
7. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous KATP channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // *European Molecular Biology Organization*. – 2001. – No. 20. – P. 6008–6016.
8. Siegel L. M. A direct microdetermination for sulfide / L. M. Siegel // *Analytical Biochemistry*. – 1965. – No. 11. – P. 126–132.
9. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – No. 193 (1). – P. 265–275.
10. Implications of hydrogen sulfide in liver pathophysiology: Mechanistic insights and therapeutic potential / H. J. Sun, Z. Y. Wu, X. W. Nie [et al.] // *Journal of Advanced Research*. – 2021. – No. 27. – P. 127–135.

11. Loisel J. J. Hydrogen sulfide and hepatic lipid metabolism - a critical pairing for liver health / J. J. Loisel, G. Yang, L. Wu // *Br. J. Pharmacol.* – 2020. – No. 177. – P. 757–768.

12. Changes in hydrogen sulfide in rats with hepatic cirrhosis in different stages / N. Zhang, Y. Zheng, W. Chen [et al.] // *Curr. Med. Sci.* – 2017. – No. 37 (5). – P. 705–710.

13. Kimura H. Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide / H. Kimura // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2015. – No. 22 (5). – P. 362–376.

14. Luhnich N. Effects of 7-day melatonin introduction on the hydrogen sulfide production and glutathione system in the liver of alloxan induced diabetic rats. / N. Luhnich, I. Gerush // *Georgian Med. News.* – 2019. – No. 289. – P. 135–139.

15. Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide / H. Kimura // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2014. – No. 20 (5). – P. 783–793.

REFERENCES

1. Wu DD, Wang DY, Li HM, Guo JC, Duan SF, Ji XY. Hydrogen sulfide as a novel regulatory factor in liver health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019.

2. Szabo C, Papapetropoulos A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacological reviews.* 2017;69(4): 497-564.

3. Wei W, Wang C, Li D. The content of hydrogen sulfide in plasma of cirrhosis rats combined with portal hypertension and the correlation with indexes of liver function and liver fibrosis. *Exp Ther Med.* 2017;14(5): 5022-26.

4. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current neuropharmacology.* 2017;15(3): 434-43. Available from: <https://doi.org/10.2174/1570159X14666161228122115>.

5. Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri R. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Exper and Toxic Pathol.* 2012;64(3): 225-32.

6. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.* 1982;206(2): 267-77.

7. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous KATP channel opener. *EMBO J.* 2001;20: 6008-16.

8. Siegel LM. A direct microdetermination for sulfide. *Analytic.Biochem.* 1965;11: 126-32.

9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1): 265-75.

10. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Wang XY, Bian JS. Implications of hydrogen sulfide in liver pathophysiology: Mechanistic insights and therapeutic potential. *J Advanced Research.* 2021;27: 127-35.

11. Loisel JJ, Yang G, Wu L. Hydrogen sulfide and hepatic lipid metabolism - a critical pairing for liver health. *Br J Pharmacol.* 2020;177(4): 757-68.

12. Zhang N, Zheng Y, Chen WG, Li R, Song LX, Xu LH, et al. Changes in hydrogen sulfide in rats with hepatic cirrhosis in different stages. *Curr Med Sci.* 2017;37(5): 705-10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11596-017-1792-y>.

13. Kimura H. Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide. *Antioxidants & redox signaling.* 2015;22(5): 362-76.

14. Luhnich N, Gerush I. Effects of 7-day melatonin introduction on the hydrogen sulfide production and glutathione system in the liver of alloxan induced diabetic rats. *Georg Med News.* 2019;289: 135-9.

15. Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxidants & redox signaling.* 2014;20(5): 783-93.

Отримано 04.02.21