

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА СИСТЕМУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ

І.В. Геруш, Н.П. Григор'єва І.О., Коляник, Є.О. Ференчук, М.В. Дікал

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

Гідро­ген сульфід - газотрансмітер, який у межах фізіологічних кон­центрацій проявляє антиоксидантні, протизапальні та інші регулюючі впливи. Його дефіцит може сприяти прогресуванню нефропатії та пов'язаних з цим ускладнень.

***Мета роботи** - вивчити вплив мелатоніну на систему H_2S -продукуючих ферментів, кон­центрацію та продукцію H_2S у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.*

***Матеріали і методи.** Експеримент проводили на 86 білих статево­зрілих щурах-самців із масою тіла 160 - 180г. Експериментальну нефропатію моделювали шляхом введення фолієвої кислоти внутрішньоочеревинно в дозі 250 мг/кг. Мелатонін (Sigma, США) вводили інтрагастрально в дозі 10 мг/кг маси тіла упродовж 3-х днів. Для оцінки стану системи обміну гідро­ген сульфідом порівнювали активності H_2S -продукуючих ферментів, вміст та кон­центрацію H_2S . Статистичну обробку даних проводили за критерієм Вілкоксона.*

***Результати.** За умов експериментальної нефропатії спостерігалось зниження кон­центрації гідро­ген сульфідом на 37,92% та його продукції на 34,84% порівняно з контрольною групою. Введення мелатоніну призводило до зростання цих показників на 16,59% та 21,30% у порівнянні з показниками тварин із нефропатією.*

Активності H_2S -продукуючих ферментів: цистатіонін-γ-ліази (CSE), цистатіонін-β-синтази (CBS) та цистеїноаміно­трансферази (CAT) у печінці щурів із нефропатією були зниженими на 38,98%, 33,73% та 26,76% відповідно в порівнянні з тваринами контрольно­ї групи. Введення мелатоніну збільшувало рівень гідро­ген сульфідом в тканині шляхом підвищення активності CSE та CBS на 24,15% та 32,52% у порівнянні з групою з нефропатією відповідно. За умов введення мелатоніну активність CAT зростала на 28,62% в порівнянні з групою тварин із нефропатією і перевищувала показники активності контрольно­ї групи тварин.

***Висновки.** За умов експериментальної нефропатії спостерігалось пригнічення син­тезу H_2S -продукуючих ферментів у печінці щурів. Введення мелатоніну активує H_2S -продукуючі ферменти в печінці щурів з нефропатією шляхом послаблення оксидативного стресу, як за рахунок безпосередньої участі мелатоніну в знешкодженні активних форм кисню, так і за рахунок збільшення H_2S , який також проявляє антиоксидантні властивості.*

Ключові слова:
нефропатія,
гідро­ген сульфід,
мелатонін.

Клінічна та експериментальна патологія Т.17, №3 (65), С.19-23.

DOI:10.24061/1727-4338.XVII.3.65.2018.126

E-mail: ilanija8@gmail.com

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА СИСТЕМУ СУЛЬФИД ВОДОРОДА ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕФРОПАТИИ

И.В. Геруш, Н.П. Григорьева, И.А. Коляник, Е.А. Ференчук, М.В. Дикал

Сероводород - газотрансмитер, который в пределах физиологических кон­центраций обладает антиоксидантными, противовоспалительными и другими регулирующими воздействиями. Его дефицит может способствовать прогрессированию нефропатии и связанных с этим осложнений.

***Цель работы** - изучение влияния мелатонина на систему H_2S -продуцирующих ферментов, концентрацию и продукцию H_2S в печени крыс при экспериментальной нефропатии.*

***Материалы и методы.** Эксперимент проводили на 86 белых половозрелых крысах-самцах массой 160 - 180 г. Нефропатию вызывали путем однократного внутрив брюшинного введения фолевой кислоты в дозе 250 мг/кг. Мелатонин вводили интрагастрально в дозе 10 мг/кг в течение трех дней.*

Для оценки состояния системы обмена сероводорода оценивали активности H_2S -продуцирующих ферментов, содержание и концентрации H_2S . Статистическую обработку данных проводили по критерию Уилкоксона.

***Результаты.** В условиях экспериментальной нефропатии наблюдалось снижение концентрации сероводорода на 37,92% и его продукции на 34,84% по сравнению с контрольной группой. Введение мелатонина привело к увеличению этих показателей на 16,59% и 21,30% по сравнению с показателями у животных с нефро-*

Ключевые слова:
нефропатія,
сероводород,
мелатонін.

Клиническая и экспериментальная патология Т.17, №3 (65), С.19-23.

патією.

Активності H_2S -продуцируючих ферментів: цистатионин- β -лиази, цистатионин- γ -синтази і цистеиноамінотрансферази в печені крыс з нефропатією були нижче на 38,98%, 33,73% і 26,76% відповідно показателів контрольної групи. Мелатонін збільшував рівень сероводорода шляхом підвищення активності CSE і CBS на 24,15% і 32,52% по порівнянню з групою з нефропатією відповідно. При введенні мелатоніну активність цистеиноамінотрансферази збільшувалась на 28,62% по порівнянню з групою тварин з нефропатією і перевищала показателі активності контрольної групи тварин.

Висновки. В умовах експериментальної нефропатії спостерігалося угнетення синтезу H_2S -продуцируючих ферментів в печені крыс. Введення мелатоніну активувало H_2S -продуцируючі ферменти в печені крыс з нефропатією шляхом ослаблення окислювального стресу, як за рахунок безпосереднього участя мелатоніну в обезз'явленні активних форм кисню, так і за рахунок збільшення концентрації H_2S , який також має антиоксидантні властивості.

Key words:
nephropathy,
hydrogen sulfide,
melatonin.

Clinical and
experimental
pathology. Vol. 17,
№3 (65), P.19-23.

MELATONIN INFLUENCE ON THE HEPATIC HYDROGEN SULFIDE SYSTEM OF RATS UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL NEPHROPATHY

I.V.Gerush, N.P. Grigorieva, I.O.Kolianyk, Ye. O.Ferenschuk, M.V. Dikal

Hydrogen sulfide is a gas transmitter which has antioxidant, anti-inflammatory and other regulating effects within the limits of physiological concentrations. Its deficiency can promote nephropathy development and complications associated with it.

Objective. To investigate melatonin effect on H_2S -producing enzyme system, concentration and production of H_2S in the liver of rats under conditions of experimental nephropathy.

Material and methods. The experiment was conducted on 86 albino mature male rats with the body weight of 160 - 180g. Nephropathy was caused by means of administration of a single intraperitoneal dose of folic acid (250 mg/kg). Melatonin was introduced intragastral (10 mg/kg) during 3 days after intoxication. To evaluate the condition of the hydrogen sulfide metabolism system the activity of H_2S -producing enzymes, content and concentration of H_2S were estimated. The data were processed statistically by means of Wilcoxon criterion.

Results. Under conditions of experimental nephropathy hydrogen sulfide concentration decreased 37,92% and its production - 34,84% as compared with the control group. Activity of H_2S -producing enzymes: cystathionine- γ -lyase, cystathionine- β -synthase and cysteine aminotransferase in the liver of rats with nephropathy reduced 38,98%, 33,73% and 26,76% in comparison with the animals of the control group. At the same time, melatonin introduction resulted in the increase of these indices - 16,59% and 21,30% as compared with the indices of animals with nephropathy. Melatonin increased hydrogen sulfide level by means of the H_2S -producing enzymes activity increase in comparison with the group of animals with nephropathy.

Conclusions. Under conditions of experimental nephropathy the suppression of H_2S -producing enzymes synthesis was observed in the rat liver. Melatonin introduction activated H_2S -producing enzymes in the rat liver with nephropathy by means of the oxidative stress abatement both at the expense of melatonin participation in oxygen active forms neutralization and H_2S concentration increase, which also has antioxidant and anti-inflammatory properties.

Вступ

Одна з найактуальніших проблем сучасної медицини - захворювання нирок та їх ускладнення. Розвиток багатьох гострих та хронічних захворювань нирок супроводжується метаболічними порушеннями і токсичним ураженням організму, що призводить до окислювального стресу у клітинах та уражень печінки як головного детоксикаційного органу [1].

Регуляція функцій організму здійснюється низкою гормонів, серед яких і мелатонін - регулятор циркадних ритмів організму з антиоксидантною та імунотропною дією. Мелатонін здатний стабілізувати клітинні мембрани, покращувати капілярну мікроциркуляцію,

збільшувати стійкість клітин до ушкоджуючих чинників [2]. Дослідження [3-5] показали, що мелатонін здатен проявляти захисні ефекти при ураженнях печінки, викликаних хімічними забруднювачами, ліками і алкоголем, а також при таких захворюваннях печінки, як печінковий стеатоз, гепатит, фіброз, цироз і гепатокарциноми.

Останнє десятиліття зростає зацікавленість науковців до обміну сірковмісних амінокислот, зокрема метіоніну, цистеїну, гомоцистеїну, а також до обміну гідроген сульфідом (H_2S), який має цитопротекторні властивості, є ендогенним модулятором біологічних функцій організму, проявляє судинорозширювальну і

нейромодуляторну дію [6]. У межах фізіологічних концентрацій гідроген сульфід проявляє антиоксидантні, протизапальні та інші регулюючі впливи, а його дефіцит може сприяти прогресуванню нефропатії та пов'язаних з цим ускладнень. Зокрема, відомо [6, 7], що основний метаболізм гомоцистеїну, який бере участь в обміні H_2S , відбувається в печінці, а менша частина метаболізується через нирки.

Мета роботи

Вивчити вплив мелатоніну на систему H_2S -продукуючих ферментів, концентрацію та продукцію H_2S у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

Матеріали і методи дослідження

Експеримент проводили на 86 білих статевозрілих щурах-самцях масою 160-180 г. Нефропатію моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення фолієвої кислоти в дозі 250 мг/кг [8]. Тварини перебували в умовах віварію зі сталим температурним та світловими режимами і були поділені на три групи: 1 - інтактна група тварин, 2 - тварини з експериментальною нефропатією, 3 - тварини з нефропатією, яким інтрагастрально в дозі 10 мг/кг вводили мелатонін упродовж 3 днів (Sigma, США). Тварин виводили з експерименту на наступний день після останнього введення мелатоніну відповідно до вимог Європейської конвенції

із захисту експериментальних тварин (86/609 ЄЕС). Вимірювання проводили на спектрофотометрі Agilent Cary 60.

Активність цистатіонін- γ -ліази та цистатіонін- β -синтази, САТ оцінювали за кількістю утвореного гідроген сульфідом [9] із використанням інкубаційного середовища. Визначення продукції та концентрації гідроген сульфідом проводили методом [10, 11], що ґрунтується на реакції між сульфідом та N, N-диметилпарафенілендіаміном у кислому середовищі в присутності іонів Fe^{3+} . Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [12].

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою непараметричного критерія Вілкоксона. Результати вважалися достовірними при $p < 0,01$.

Результати та їх обговорення

За умов експериментальної нефропатії спостерігалось зниження концентрації гідроген сульфідом на 37,92% та продукції гідроген сульфідом на 34,84% порівняно з контрольною групою (табл.). У той же час, введення мелатоніну призвело до зростання цих показників на 16,59% та 21,30% в порівнянні з показниками тварин із нефропатією.

Активність H_2S -продукуючих ферментів: цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін- β -синтази та цистеїноамінотрансферази в печінці щурів із нефропатією були знижені

Таблиця

Показники обміну гідроген сульфідом в печінці щурів при експериментальній нефропатії ($M \pm m$)

| | Контроль, n=36 | Нефропатія, n=25 | Нефропатія + мелатонін, n=25 |
|--|------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| H_2S -концентрація, нмоль/л | 21,33 \pm 0,24 | 13,24 \pm 0,76 ^a | 16,78 \pm 0,75 ^{a, b} |
| H_2S -продукція, нмоль/хв/мг білка | 38,2 \pm 0,27 | 24,89 \pm 0,67 ^a | 33,03 \pm 1,01 ^{a, b} |
| Цистатіонін- γ -ліаза, нмоль H_2S /хв/мг білка | 3,31 \pm 0,06 | 2,02 \pm 0,13 ^a | 2,82 \pm 0,17 ^{a, b} |
| Цистатіонін- β -синтаза, нмоль H_2S /хв/мг білка | 2,49 \pm 0,06 | 1,65 \pm 0,13 ^a | 2,46 \pm 0,16 ^a |
| Цистеїноамінотрансфераза, нмоль H_2S /хв/мг білка | 2,69 \pm 0,05 | 1,97 \pm 0,12 ^a | 2,74 \pm 0,17 ^a |

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$); ^a – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин; ^b – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією; $p < 0,01$.

на 38,98%, 33,73% та 26,76% у порівнянні з тваринами контрольної групи, такі зміни можуть бути зумовлені порушенням регуляції внутрішньоклітинного обміну, формування нативної структури білків, синтезу глутатіону та інших важливих біологічно активних сполук.

Мелатонін збільшував рівень гідроген сульфідом шляхом підвищення активності CSE та CBS на 24,15% та 32,52% в порівнянні з групою тварин із нефропатією відповідно (табл.). Введення мелатоніну підвищувало активність САТ на 28,62% та перевищувало показники активності контрольної групи тварин.

Можливо, такі зміни зумовлено участю мелатоніну в активації синтезу ферментів глутатіонпероксидази та

глутатіонредуктази, що, як наслідок, сприяє зростанню продукції глутатіону, який бере участь в обміні гідроген сульфідом як цистеїн-вмісний трипептид [13]. Можна також припустити, що антиоксидантні властивості мелатоніну та його здатність зменшувати ступінь пероксидації білків і ліпідів сприяють покращенню досліджуваних показників завдяки відновленню активності мітохондріальних і мікосомальних цитохромів P-450 та процесів мітохондріального дихання [5].

Висновки

Експериментальна нефропатія пригнічує синтез H_2S -продукуючих ферментів у печінці щурів.

Введення мелатоніну підвищувало вміст H_2S та його

продукуючих ферментів у печінці щурів із нефропатією, що сприяло послабленню оксидативного стресу, як за рахунок безпосередньої участі мелатоніну у знешкодженні активних форм кисню, так і за рахунок збільшення кількості H₂S, який також проявляє антиоксидантні та протизапальні властивості.

Перспективи подальших досліджень

Доцільно дослідити механізми обміну гідроген сульфід у нирках за умов нефропатії, викликаной фолієвою кислотою.

Список літератури

1. Chevalier RL. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2:157-168.
2. Cardinali DP, Vigo DE. Melatonin, mitochondria, and the metabolic syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(21): 3941-3954.
3. Andersen LPH, Werner MU, Rosenkilde MM. et al. Pharmacokinetics of high-dose intravenous melatonin in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2016; 56(3): 324-329.
4. Bali I, Bilir B, Emir S, Turan, F, Yilmaz A, Gokkus T. The effects of melatonin on liver functions in arsenic-induced liver damage. *Turk. J. Surg.* 2016; 32: 233-237.
5. Іванків Я.І., Олешук О.М. Застосування мелатоніну при експериментальному цукровому діабеті I типу. *Фарм. та лік. токсик.* 2016; 3: 41-47.
6. Wagner C. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. *J. Nephrol.* 2009; 22 (2): 173-176.
7. Заїчко Н.В. Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфід у плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази. *Експер. та кл. фіз. і біохімія.* 2010; 4: 35-41.
8. Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri S. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2012; 64(3): 225-232.
9. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.* 1982; 206(2): 267-277.
10. Zhao W., Zhang J., Lu, Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous KATP channel opener. *European Molecular Biology Organization.* 2001; 20: 6008-6016.
11. Siegel L.M. A direct microdetermination for sulfide. *Analytical Biochemistry.* 1965; 11: 126-132.
12. Lowry O.H., Rosenbroun N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
13. Swiderska-Kolacz G., Klusek J., Kolatai A. The effect of melatonin on glutathione and glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse liver and kidney in vivo. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006; 27(3): 365-368.

References

1. Chevalier RL. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2:157-168.
2. Cardinali DP, Vigo DE. Melatonin, mitochondria, and the metabolic syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(21): 3941-3954.
3. Andersen LPH, Werner MU, Rosenkilde MM. et al. Pharmacokinetics of high-dose intravenous melatonin in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2016; 56(3): 324-329.
4. Bali I, Bilir B, Emir S, Turan, F, Yilmaz A, Gokkus T. The effects of melatonin on liver functions in arsenic-induced liver damage. *Turk. J. Surg.* 2016; 32: 233-237.
5. Іванків Я.І., Олешук О.М. Застосування мелатоніну при експериментальному цукровому діабеті I типу [Application of melatonin in experimental type I diabetes mellitus]. *Pharm. та лік. toxicologia.* 2016; 3: 41-47 (in Ukrainian).
6. Wagner C. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. *J. Nephrol.* 2009; 22 (2): 173-176.
7. Zaichko N.V. Rivni homotsysteїnu, tsysteїnu ta hidrohensulfidu v plazmi krovi patsientiv z trombozamy hlybokykh ven nyzhnykh kintsivok: zv'yazok z polimorfizmom S677T v heni metylenetetrahidrolatreduktazy [Levels of homocysteine, cysteine and hydrogen sulfide in plasma of patients with thrombosis of deep veins of the lower extremities: connection with the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene]. *Eksp. ta clin. fiz. i biochimia.* 2010; 4: 35-41(in Ukrainian).
8. Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri S. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2012; 64(3): 225-232.
9. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.* 1982; 206(2):267-277.
10. Zhao W., Zhang J., Lu, Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous KATP channel opener. *European Molecular Biology Organization.* 2001; 20: 6008-6016.

11. Siegel L.M. A direct microdetermination for sulfide. *Analytical Biochemistry.* 1965; 11: 126-132.
12. Lowry O.H., Rosenbroun N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
13. Swiderska-Kolacz G., Klusek J., Kolatai A. The effect of melatonin on glutathione and glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse liver and kidney in vivo. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006; 27(3): 365-368.

Відомості про авторів:

Геруш І.В. - к.мед.н., доцент кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії, проректор з науково-педагогічної роботи Вищого державного навчального закладу України "Буковинського державного медичного університету"

Григор'єва Н.П. - к.біол.н., доцент, завідувач кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Вищого державного навчального закладу України "Буковинського державного медичного університету"

Коляник І.О. - аспірант кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Вищого державного навчального закладу України "Буковинського державного медичного університету"

Ференчук Є.О. - аспірант кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Вищого державного навчального закладу України "Буковинського державного медичного університету"

Дікал М.В. - к.мед.н., доцент кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Вищого державного навчального закладу України

Сведения об авторах:

Геруш И.В. - к.мед.н., доцент кафедры биорганической и биологической химии и клинической биохимии, проректор с научно-педагогической работы Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинского государственного медицинского университета"

Григорьева Н.Ф. - к.биол.н., доцент, заведующая кафедры биорганической и биологической химии и клинической биохимии Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинского государственного медицинского университета"

Коляник И.О. - аспирант кафедры биорганической и биологической химии и клинической биохимии Высшего

государственного учебного заведения Украины "Буковинского государственного медицинского университета"
Ференчук Е.А. - аспирант кафедры биорганической и биологической химии и клинической биохимии Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинского государственного медицинского университета"
Дикал М.В. - к.мед.н., доцент кафедры биорганической и биологической химии и клинической биохимии Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинского государственного медицинского университета"

Information about authors:

Gerush I.V. - candidate of medical sciences, associate professor of the Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry, pro-rector on scientific-pedagogical work of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Grigorieva N.P. - candidate of biological sciences, associate professor of the Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Kolianyuk I.O. - PhD-student of the Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Ferenchuk Ye.O. - PhD-student of the Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Dikal M.V. - candidate of medical sciences, associate professor of the Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Стаття надійшла до редакції 5.08.2018

Рецензент – проф. Ю.С.Роговий

© I.V. Геруш, Н.П. Григор'єва I.O., Коляник, С.О. Ференчук, М.В.Дикал, 2018