

ВПЛИВ 14 ДОБОВОГО ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ НА ПРОДУКЦІЮ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ З АЛОКСАНІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці)

nlevytska@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження проводилося в рамках науково-дослідної роботи кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії «Стресіндуковані морфофункціональні та біохімічні зміни структур хронопериодичної і гепаторенальної систем у свавців», № державної реєстрації 0114U002472.

Вступ. Гідроген сульфід (H_2S), поряд з монооксидом вуглецю (CO) та монооксидом азоту (NO), належить до газотрансмітерів та є ключовою ендогенною газоподібною сигнальною молекулою [1,2,3]. Відомо, що печінка є важливим органом, що забезпечує розщеплення сірковмісних амінокислот і утворення гідроген сульфиду. Більшість досліджень, присвячених ферментативній продукції H_2S , зосереджені на основних ферментах його синтезу: цистатіонін-γ-ліази (CSE, К.Ф. 4.4.1.1), цистатіонін-β-синтазі (CBS, КФ 4.2.1.22), 3-меркаптопіруват-сульфуртрансферазі (3MST, КФ 2.8.1.2) і цистеїнамінотрансферазі (CAT, КФ 2.6.1.3) [4].

Останнім часом зі сприйняття гідроген сульфиду як газотрансмітера, прийшли до розуміння того, що H_2S ендогенного походження є важливим компонентом багатьох біохімічних процесів в організмі. Отже, інтерес до можливих механізмів, за допомогою яких синтезується H_2S і відповідно до його фізіологічних функцій в нормі і при різних патологічних станах виріс [5].

Цукровий діабет (ЦД) є захворюванням, яке поширюється в глобальному масштабі і розглядається як епідемія. ЦД має численні ускладнення, включаючи патологічні зміни в печінці, пов'язані з дисбалансом окисно-відновного статусу [6]. Однак роль гідроген сульфиду при цукровому діабеті вивчена недостатньо.

Мелатонін (MLT), як гормон епіфізу, бере участь у регуляції різних фізіологічних функцій [7]. У тому числі у регуляції циркадального ритму, мітохондріальної функції, має нейропротекторний і імуномодулюючий ефекти та є потужним антиоксидантом. Вивчення можливих шляхів його впливу на біохімічні процеси під час діабету цікаво з огляду на те, що метаболізм глюкози регулюється також циркадальною системою [8].

Таким чином, дана **робота** має наступну **мету**: дослідити вплив 14 добового введення мелатоніну на концентрацію і продукцію гідроген сульфиду, а також активність ферментів його синтезу в печінці щурів з алоксаніндукованим цукровим діабетом.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди проведені на білих безпородних статевозрілих щурах-самцях з масою тіла – 0,15-0,18 кг. Цукровий діабет був викликаний внутрішньоочеревинним введенням 5% розчину моногідрату алоксану в дозі 150 мг/кг [9]. Дослідні щури були розділені на групи: 1) контроль-

ні щури; 2) алоксандіабетичні щури (базальна глікемія 15,7-26,4 ммоль/л); 3) алоксандіабетичні щури, яким інтрагастрально вводили мелатонін (Merck, Німеччина) в дозі 10 мг/кг о 8⁰⁰ щодня упродовж 14 днів.

Кров у щурів отримували шляхом декапітації під легким ефірним наркозом з дотриманням вимог загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі України з біоетики (Київ, 2001), Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Печінку швидко вирізували, промивали в охолоджену льодом фізіологічному розчині, промокали, заморожували в рідкому азоті і зберігали при температурі -20 °С до використання.

В крові рівень глюкози визначали глюкозооксидазним методом з використанням стандартного аналітичного набору „Філісіт-Діагностика” (Україна). Продукцію і концентрацію H_2S вимірювали, як описано раніше [10,11]. H_2S продукуючу активність ферментів CSE, CBS і CAT визначали спектрофотометрично в постмітохондріальній фракції гомогенатів печінки [10]. Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel* з використанням непараметричних методів варіаційної статистики: розрахунок середніх значень (M), похибки середніх значень (m), U-критерію Уїлкоксона. Вірогідною вважали різницю при $p < 0,05$. Для перевірки лінійно зв'язку між рівнем H_2S і ферментами його синтезу були розраховані кореляції Спірмена.

Результати дослідження та їх обговорення. Проведеними дослідженнями встановлено зниження на 21% концентрації H_2S і збільшення на 76% продукції H_2S у печінці діабетичних щурів, порівняно з контрольною групою (**таблиця**). H_2S продукуюча активність CSE на 23%, CBS на 90% і CAT на 60% в алоксандіабетичних щурів була підвищеною порівняно з показниками контрольної групи щурів.

Як видно із даних, представлених в **таблиці** у алоксандіабетичних щурів, які отримували мелатонін, зростала на 19% концентрація H_2S і знижувалася на 24% продукція H_2S порівняно з діабетичною групою тварин. Також спостерігалось зниження активностей CSE на 21%, CBS на 24% і CAT на 19% в печінці в порівнянні з алоксандіабетичною групою.

Необхідно відзначити, що поряд з нормалізацією концентрації H_2S і активності CSE, продукція H_2S та активності CBS і CAT, після введення мелатоніну, не досягали рівня показників контрольної групи і достовірно від них відрізнялись.

Ми проаналізували кореляційні зв'язки між досліджуваними показниками в печінці щурів (концентрація H_2S , продукція H_2S , CSE, CBS, CAT) (**рис.**). Знайдені позитивні кореляції між CSE-CBS ($r = 0,56$),

CAT-CBS ($r = 0,823$), продукція H_2S -CBS ($r = 0,521$), продукція H_2S -CAT ($r = 0,563$) у печінці щурів з алоксаніндукованим ЦД, що є підтвердженням прямого зв'язку між продукцією H_2S та ферментами його синтезу (CBS, CAT). Виявлені кореляції між CSE-CBS, CAT-CBS вказують на зв'язок активностей цих ферментів та підвищення синтезу H_2S можливо за рахунок їх активації, оскільки це H_2S -генеруючі ферменти. Не виявлені кореляційні зв'язки між досліджуваними показниками не показані.

ЦД супроводжується суттєвими порушеннями обміну речовин. Серед метаболічних змін можна відзначити дисбаланс обміну H_2S , зокрема в нашому дослідженні виявлені зміни концентрації H_2S та активностей ферментів його синтезу, що можна пов'язати з гіперглікемічним стресом організму. Недавні дослідження виявили кілька потенційних ролей для H_2S в патофізіологічних функціях. H_2S інгібує оксидативний стрес [3,12], сприяє стимуляції K^{ATP} каналів, завдяки чому впливає на клітинний метаболізм [13].

Відомо, що при високому рівні глюкози в крові, відбувається насамперед, її депонування в печінці шляхом перетворення на глікоген. Оскільки мелатонін пов'язаний з транспортом глюкози у печінці, він

Таблиця.

Вплив 14 добового введення мелатоніну на показники рівня і ферментативної продукції H_2S в печінці щурів за умов алоксаніндукованого ЦД ($M \pm m$)

Показники	Група I (n=40)	Група II (n=19)	Група III (n=18)
Концентрація H_2S , мкмоль/л	35,74±1,15	28,2±0,81**	33,6±1,67##
Продукція H_2S , нмоль/хв/мг білка	29,2±1,26	51,41±1,59**	38,88±2,86***##
CSE, нмоль/хв/мг білка	16,35±0,65	20,13±1,76*	15,98±0,82#
CBS, нмоль/хв/мг білка	27,01±1,02	51,43±4,52**	38,91±3,03***
CAT, нмоль/хв/мг білка	23,65±1,31	37,75±2,51**	30,63±1,52***

Примітки: * – $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ різниця вірогідна в порівнянні з контрольною групою, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ різниця вірогідна в порівнянні з алоксаніндукованою групою.

сприяє відновленню глікогену в цьому органі і тому знижує рівень глюкози в крові при цукровому діабеті [14]. Експериментальні дослідження показують, що мелатонін є протектором β -клітин підшлункової залози, посилює передачу сигналу інсуліновими рецепторами і покращує толерантність до глюкози [7]. MLT є потужним природним антиоксидантом і сиг-

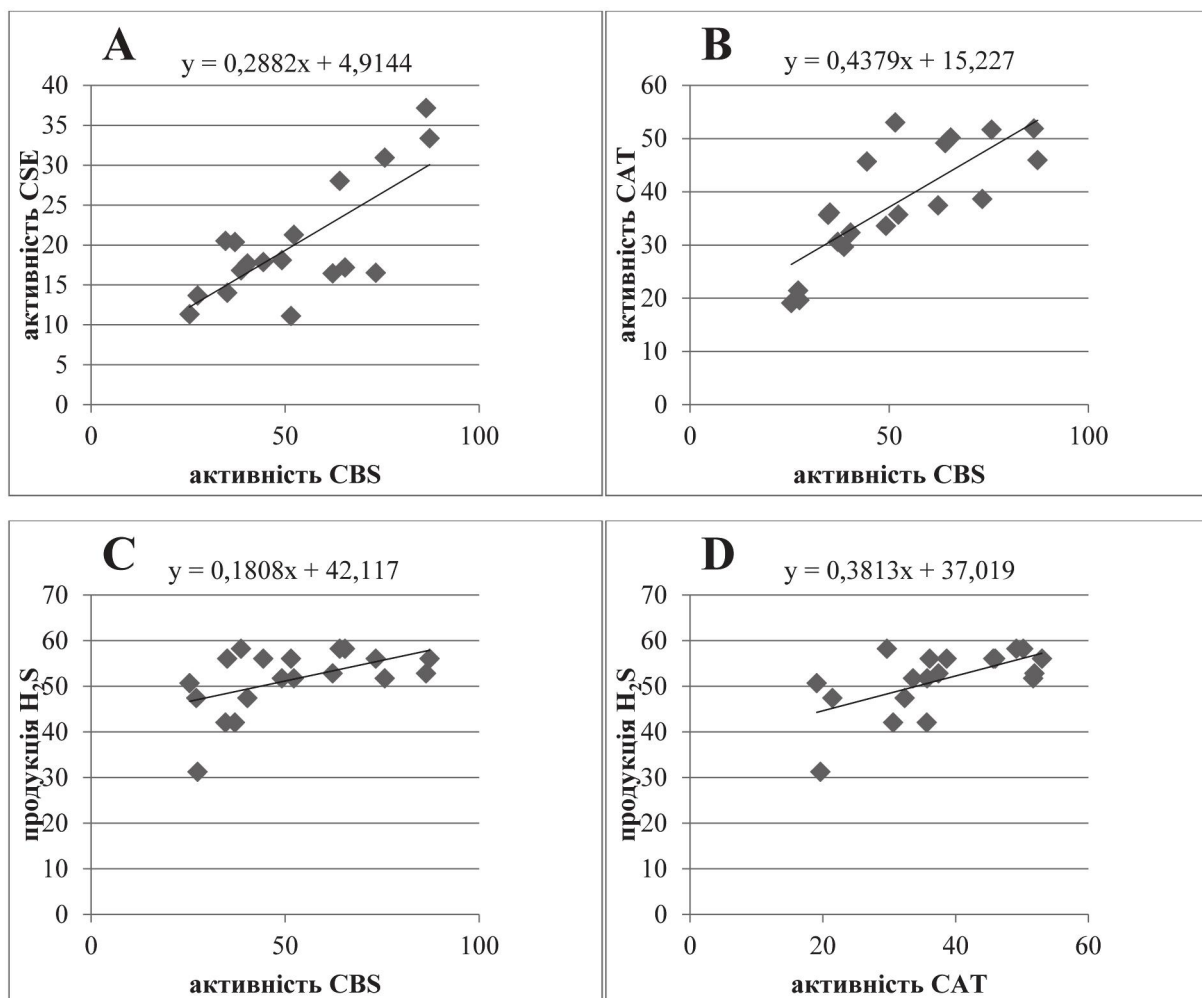


Рис. Кореляційні зв'язки між досліджуваними показниками в печінці щурів з алоксаніндукованим ЦД: (А) CSE-CBS ($r = 0,56$), (В) CAT-CBS ($r = 0,823$), (С) продукція H_2S -CBS ($r = 0,521$), (D) продукція H_2S -CAT ($r = 0,563$). Показана індивідуальна група зразків була статистично значущою ($p < 0,05$).

нальною молекулою, який прямо або опосередковано знешкоджує вільні радикали, і таким чином протидіє розвитку оксидативного стресу [15]. На нашу думку, захисні ефекти мелатоніну проти ЦД, можуть бути пов'язані саме з його впливом на оксидативний стресом та збереженням антиоксидантного захисту організму в цілому [8,14]. При введенні мелатоніну нами відмічено зниження активності CSE та продукції H_2S у печінці, при цьому ймовірно зменшується S-сульфгідрація піруват карбоксилази, що призводить до зниження її активності. В свою чергу пригнічення активності піруват карбоксилази послаблює процес глюконеогенезу і знижує утворення глюкози в печінці [3,16]. Такі механізми зумовлювали зниження рівня глюкози в крові щурів з алоксаніндукованим цукровим діабетом, яким вводили мелатонін, що було нами виявлено у попередніх дослідженнях [17].

Висновки. Гіперглікемія при ЦД є ключовою ланкою розвитку дисбалансу в обміні H_2S . Мелатонін нормалізує концентрацію H_2S і активність CSE в печінці алоксандіабетичних щурів, що сприяє зниженню рівня глюкози в крові, проте виявлене зниження продукції H_2S та активностей CBS і CAT не досягло рівня показників контрольної групи. Такий ефект мелатоніну може бути пов'язаний з підвищенням антиоксидантного захисту організму. Знайдені кореляції вказують як на зв'язок між концентрацією і продукцією H_2S та активністю ферментів його синтезу, так і на зв'язок між цими ферментами, що дає основу для подальшого вивчення системи регуляції та активації ферментів синтезу H_2S та дослідження їх взаємозв'язку.

Перспективи подальших досліджень. Необхідні подальші дослідження механізмів за допомогою яких мелатонін впливає на показники обміну гідроген сульфідом при алоксаніндукованому ЦД.

Література

- Kashfi K, Olson KR. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(5):689-703. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.10.019
- Pouokam E, Althaus M. Epithelial electrolyte transport physiology and the gasotransmitter hydrogen sulfide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016; Article ID 4723416:13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4723416>
- Cheung SH, Lau JYW. Hydrogen sulfide mediates athero-protection against oxidative stress via S-sulfhydration. *PLoS ONE.* 2018;13(3):e0194176. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194176>
- Kang J, Neill DL, Xian M. Phosphonothioate-based hydrogen sulfide releasing reagents: chemistry and biological applications. *Frontiers in Pharmacology.* 2017;8:Article 457. DOI: 10.3389/fphar.2017.00457
- Perridon BW, Leuvenink H, Hillebrands JL, Goor H, Bos EM. The role of hydrogen sulfide in aging and age-related pathologies *Aging.* 2016;8(10):2264-89.
- Mohamed J, Nazratun Nafizah, Zariyantey AH, Budin AH. Mechanisms of diabetes-induced liver damage the role of oxidative stress and inflammation. *Sult. Qaboos Univ. Med. J.* 2016;16(2):132-41.
- Kamath A, Rather ZA. Melatonin for atypical antipsychotic-induced metabolic adverse effects: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BioMed Research International.* 2018; Article ID 4907264:8. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4907264>
- Song J, Whitcomb DJ, Kim BC. The role of melatonin in the onset and progression of type 3 diabetes. *Molecular Brain.* 2017;10:35. DOI: 10.1186/s13041-017-0315-x
- Akinola O, Gabriel M, Suleiman AA, Olorunsogbon F. Treatment of alloxan-induced diabetic rats with metformin or glitazones is associated with amelioration of hyperglycaemia and neuroprotection. *The Open Diabetes Journal.* 2012;5:8-12.
- Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.* 1982;206:267-77.
- Yang G, Yang W, Wu L, Wang R. H₂S, Endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem.* 2007;282:16567-76.
- Gao C, Chang P, Yang L, Wang Yi, Zhu S, Shan H, et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on sodium azide-induced oxidative stress in PC12 cells international. *Journal of molecular medicine.* 2018;41:242-50.
- Sun A, Wang Y, Liu J, Yu X, Sun Y, Yang F, et al. Exogenous H₂S modulates mitochondrial fusion-fission to inhibit vascular smooth muscle cell proliferation in a hyperglycemic state. *Cell & Bioscience.* 2016;6(36):18. DOI: 10.1186/s13578-016-0102-x
- Li T, Ni L, Zhao Z, Liu X, Lai Z, Di X, et al. Melatonin attenuates smoking-induced hyperglycemia via preserving insulin secretion and hepatic glycogen synthesis in rats. *J Pineal Res.* 2018;64:e12475:13. DOI: [org/10.1111/jpi.12475](https://doi.org/10.1111/jpi.12475)
- Tan DX, Zheng X, Kong J, Manchester LC, Hardeland R, Kim SJ, et al. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. *Int J Mol Sci.* 2016;17:2124. DOI: 10.3390/ijms17122124
- Ju Y, Untereiner A, Wu L, Yang G. H₂S-induced S-sulfhydration of pyruvate carboxylase contributes to gluconeogenesis in liver cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Nov;1850(11):2293-303.
- Luhinich N, Herush I, Yaremii I, Davydova N. Vplyv 14 dobovoho vvedennia melatoninu na metabolizm hlutatonu v pechintsi shchuriv pry aloksanovomu tsukrovomu diabeti. *Naukovi zapysky Ternopilskoho natsionalnoho pedahohichnoho universytetu imeni Volodymyra Hnatiuka. Seria: Bioloiiia.* 2018;3-4(74):71-5. [in Ukrainian].

ВПЛИВ 14 ДОБОВОГО ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ НА ПРОДУКЦІЮ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ З АЛОКСАНІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Геруш І. В., Лугініч Н. М.

Резюме. H_2S ендогенного походження є важливим компонентом багатьох біохімічних процесів в організмі. Однак роль гідроген сульфідом при цукровому діабеті вивчена недостатньо. Метою роботи було дослідити вплив 14 добового введення мелатоніну на концентрацію і продукцію гідроген сульфідом, а також активність ферментів його синтезу в печінці щурів з алоксаніндукованим цукровим діабетом. Досліди проведені на білих безпородних статевозрілих щурах-самцях з масою тіла – 0,15-0,18 кг. Цукровий діабет був викликаний внутрішньоочеревинним введенням 5% розчину моногідрату алоксану. Мелатонін вводили інтрагастрально щодня упродовж 14 днів. Встановлено зниження концентрації H_2S і збільшення продукції H_2S у печінці діабетичних щурів, порівняно з контрольною групою. H_2S продукуюча активність CSE, CBS і CAT в алоксандіабетичних щурів була підвищеною порівняно з показниками контрольної групи щурів. У алоксандіабетичних щурів, які отримували мелатонін, зростала концентрація H_2S і знижувалася продукція H_2S

порівняно з діабетичною групою тварин. Також спостерігалось зниження активностей CSE, CBS і CAT в печінці в порівнянні з аллоксандіабетичною групою. Знайдені позитивні кореляції між досліджуваними показниками, що вказують як на зв'язок між концентрацією і продукцією H_2S та активністю ферментів його синтезу, так і на зв'язок між цими ферментами. Введення мелатоніну нормалізує концентрацію H_2S і активність CSE в печінці аллоксандіабетичних щурів, що сприяє зниженню рівня глюкози в крові, проте виявлене зниження продукції H_2S та активностей CBS і CAT не досягло рівня показників контрольної групи. Позитивний ефект мелатоніну може бути пов'язаний з підвищенням антиоксидантного захисту організму.

Ключові слова: цукровий діабет, щури, мелатонін, печінка, гідроген сульфід.

ВЛИЯНИЕ 14 СУТОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА НА ПРОДУКЦИЮ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В ПЕЧЕНИ КРЫС С АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Геруш И. В., Лугинич Н. М.

Резюме. H_2S эндогенного происхождения является важным компонентом многих биохимических процессов в организме. Однако роль гидроген сульфида при сахарном диабете изучена недостаточно. Целью работы было исследовать влияние 14 суточного введения мелатонина на концентрацию и продукцию гидроген сульфида, а также активность ферментов его синтеза в печени крыс с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом. опыты проведены на белых беспородных половозрелых крысах-самцах с массой тела — 0,15-0,18 кг. Сахарный диабет был вызван внутрибрюшинным введением 5% раствора моногидрата аллоксана. Мелатонин вводили интрагастрально ежедневно в течение 14 дней. Определено снижение концентрации H_2S и увеличение продукции H_2S в печени диабетических крыс по сравнению с контрольной группой. H_2S продуцирующая активность CSE, CBS и CAT в аллоксандиабетических крыс была повышенной по сравнению с показателями контрольной группы крыс. В аллоксандиабетических крыс, получавших мелатонин, росла концентрация H_2S и снижалась продукция H_2S по сравнению с диабетической группой животных. Также наблюдалось снижение активностей CSE, CBS и CAT в печени по сравнению с аллоксандиабетической группой. Найденные положительные корреляции между исследуемыми показателями, указывают как на связь между концентрацией и продукцией H_2S и активностью ферментов его синтеза, так и на связь между этими ферментами. Введение мелатонина нормализует концентрацию H_2S и активность CSE в печени аллоксандиабетических крыс, способствует снижению уровня глюкозы в крови, однако выявленное снижение продукции H_2S и активностей CBS и CAT не достигало уровня показателей контрольной группы. Положительный эффект мелатонина может быть связан с повышением антиоксидантной защиты организма.

Ключевые слова: сахарный диабет, крысы, мелатонин, печень, гидроген сульфид.

EFFECTS OF 14 DAYS MELATONIN INTRODUCTION ON THE HYDROGEN SULFIDE PRODUCTION IN THE LIVER OF ALLOXAN-INDUCED DIABETES MELLITUS

Gerush I. V., Luginich N. M.

Abstract. Recently, with the perception of hydrogen sulfide as a gasotransmitter, it came to the understanding that endogenous H_2S is an important component of many biochemical processes in organism. Diabetes mellitus (DM) is a disease that is expanding globally and is considered an epidemic. DM has many complications, including pathological changes in the liver, associated with oxidative stress. However, the role of hydrogen sulfide in diabetes mellitus is insufficiently studied. Melatonin is a potent, naturally occurring antioxidant and a signaling molecule based on its primary and secondarily-evolved functions in organisms.

Thus, this study has the following purpose: to examine the role of melatonin introduction on the hydrogen sulfide production in the liver of alloxan induced diabetic rats.

Experiments were conducted on white outbred sexually mature male rats with the body weight – 0,15-0,18 kg. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of freshly prepared alloxan monohydrate (150 mg/kg body weight). The rats were divided into the following groups: controls rats; diabetes; diabetes + melatonin (animals with diabetes were introduced the melatonin (Merck, Germany) intragastrically in the dose of 10 mg/kg at 8 a.m. daily during 14 days). In the liver was determined content of H_2S concentration, H_2S production and activities of CSE, CBS and CAT.

It was found that alloxan diabetes was observed an decrease H_2S concentration and an increase H_2S production in the liver compared to control group. The activities of CSE, CBS and CAT in alloxan diabetic rats was higher compared to controls rats. Introduction of the melatonin increased H_2S concentration and decreased content of H_2S production compared to diabetic group. There was also a decrease the activities of CSE, CBS and CAT in the liver compared to the alloxan diabetic rats.

We have also found the positive correlations between investigated parameters, which indicate connection between concentration and production of H_2S and the enzyme activities of its synthesis, and the relationship between these enzymes.

The administration of melatonin normalizes concentration of H_2S and CSE activity in the liver of alloxan diabetic rats, which contributes to lowering glucose levels in the blood, but the reduction of H_2S production, CBS and CAT activities did not have level of control group. The positive effect of melatonin may be due to increased antioxidant protection of organism.

Further research will be study the mechanisms of melatonin effects on the exchange indicators of hydrogen sulfide at alloxane-induced diabetes.

Key words: diabetes mellitus, rats, melatonin, liver, hydrogen sulfide.

Рецензент – проф. Бобирьова Л. Є.
Стаття надійшла 26.02.2019 року