

Є. О. ФЕРЕНЧУК, І. В. ГЕРУШ

*Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет»*

ВПЛИВ ТРИДЕННОГО ВВЕДЕННЯ ГЛУТАТІОНУ НА МЕТАБОЛІЗМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ

Актуальність. В останні роки зросла зацікавленість науковців до обміну сірковмісних амінокислот, а також до метаболізму гідроген сульфід (H₂S) та глутатіону. Водночас вплив трипептиду глутатіону на стан системи обміну газотрансміттера H₂S за умов нефропатії залишається не вивченим.

Мета роботи – вивчити вплив триденного введення глутатіону на систему H₂S-генеруючих ензимів, концентрацію та продукцію H₂S у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

Матеріали та методи. Експериментальну нефропатію моделювали шляхом введення білим щурам-самцям фолієвої кислоти внутрішньоочеревинно в дозі 250 мг/кг. Глутатіон вводили інтрагастрально в дозі 100 мг/кг маси тіла впродовж 3-х днів.

Результати та їх обговорення. За умов експериментальної нефропатії спостерігалось зниження концентрації гідроген сульфід на 37,92 % та продукції гідроген сульфід – на 34,84 % відповідно порівняно з контрольною групою. Введення глутатіону привело до зростання цих показників на 36,32 % та 48,4 % відповідно у порівнянні з показниками тварин із нефропатією. Активність цистатіонін-γ-ліази (CSE), цистатіонін-β-синтази (CBS) та цистеїноамінотрансферази (CAT) у печінці щурів із нефропатією була знижена на 38,98 %, 33,73 % та 26,76 % відповідно у порівнянні з тваринами контрольної групи. Глутатіон підвищував активність CSE та CBS на 31 % та 33,55 % у порівнянні з групою тварин із нефропатією відповідно. Активність цистатіонінамінотрансферази за умов введення трипептиду зростала на 49,3 % і при цьому перевищувала показник контрольної групи.

Висновки. Активність H₂S-продукуючих ензимів за умов експериментальної нефропатії у печінці щурів знижується. Введення глутатіону підвищувало вміст H₂S та сприяло зростанню активності H₂S-генеруючих ензимів у печінці щурів із нефропатією, можливо, за рахунок безпосередньої участі трипептиду у біосинтезі гідроген сульфід, а також завдяки його детоксикаційним та антиоксидантним властивостям.

Ключові слова: нефропатія; гідроген сульфід; глутатіон

E. Ferenchuk, I. Gerush

Effect of three-day Glutathione introduction on hydrogen sulfide metabolism in liver of rats under experimental nephropathy conditions

Topicality. Scientists are becoming more interested in the exchange of sulfur-containing amino acids and hydrogen sulfide (H₂S) metabolism and glutathione. But the effect of tripeptide on the H₂S metabolism by nephropathy is not studied enough.

Aim. To study the effect of three-day glutathione introduction on the system of H₂S-producing enzymes, concentration and production in the liver of rats under conditions of experimental nephropathy.

Materials and methods. The experiment was conducted on albino mature male rats. The animals in experimental group were administered a single intraperitoneal dose of folic acid (250 mg/kg). Glutathione was introduced intragastral (100 mg/kg) during 3 days after intoxication.

Results and discussion. Under conditions of experimental nephropathy, there was a decrease in concentration of hydrogen sulfide by 37.92 % and the production of hydrogen sulfide by 34.84 % compared with the control group. The introduction of glutathione led to an increase in these indicators by 36.32 % and 48.4 % compared with the animals with nephropathy. The activity of cystathionine-γ-lyase (CSE), cystathionine-β-synthase (CBS) and cysteinaminotransferase (CAT) in the liver of rats with nephropathy was reduced by 38.98 %, 33.73 % and 26.76 % compared with animal control group. Glutathione increased the activity of CSE and CBS by 31 % and 33.55 % compared with a group of animals with nephropathy. The activity of cystathionine aminotransferase in the conditions of tripeptide increased by 49.3 % introduction and exceeded the date of the control group.

Conclusions. The activity of H₂S-producing enzymes in experimental nephropathy in the liver of rats is decreased. The introduction of glutathione increased the content of hydrogen sulfide and promoted the growth of the activity of H₂S-producing enzymes in the liver of rats with nephropathy. As reasons for this effect, the possibility of including tripeptide as a source of cysteine in the synthesis of hydrogen sulfide is considered.

Key words: nephropathy; hydrogen sulfide; glutathione

Е. А. Ференчук, И. В. Геруш

Влияние трехдневного введения глутатиона на метаболизм сульфида водорода в печени крыс в условиях экспериментальной нефропатии

Актуальность. В последнее время выросла заинтересованность ученых к обмену серосодержащих аминокислот, а также к метаболизму сероводорода (H_2S) и глутатиона. В то же время влияние трипептида глутатиона на состояние обмена газотрансмиттера H_2S в условиях нефропатии не изучено.

Цель работы – изучить влияние трехдневного введения глутатиона на систему H_2S -продуцирующих энзимов, концентрацию и продукцию в печени крыс в условиях экспериментальной нефропатии.

Материалы и методы. Экспериментальную нефропатию моделировали путем введения белым половозрелым крысам-самцам фолиевой кислоты внутривнутрибрюшинно в дозе 250 мг/кг. Глутатион вводили интрагастрально в дозе 100 мг/кг массы тела в течение 3-х дней.

Результаты и их обсуждение. В условиях экспериментальной нефропатии наблюдалось снижение концентрации водород сульфида на 37,92 % и продукции сероводорода на 34,84 % соответственно по сравнению с контрольной группой. Введение глутатиона привело к возрастанию этих показателей на 36,32 % и 48,4 % по сравнению с показателями животных с нефропатией. Активность цистатионин- γ -лиазы (CSE), цистатионин- β -синтазы (CBS) и цистеиноаминотрансферазы (CAT) в печени крыс с нефропатией была снижена соответственно на 38,98 %, 33,73 % и 26,76 % по сравнению с показателями животных контрольной группы. Глутатион повышал активность CSE и CBS на 31 % и 33,55 % по сравнению с группой животных с нефропатией. Активность цистатионинаминотрансферазы в условиях введения трипептида выросла на 49,3 %, и при этом превысилась показатель контрольной группы.

Выводы. Активность H_2S -продуцирующих энзимов в условиях экспериментальной нефропатии в печени крыс была сниженной. Введение глутатиона повышало содержание сероводорода и способствовало росту активности H_2S -продуцирующих энзимов в печени крыс с нефропатией. В качестве причин указанного эффекта рассматривается не только общее положительное влияние глутатиона на антиоксидантный статус организма, но и возможность включения трипептида как источника цистеина в процессы синтеза сероводорода.

Ключевые слова: нефропатия; сероводород; глутатион

ВСТУП

Одна з актуальних проблем сучасного суспільства – розвиток гострих та хронічних захворювань нирок, які супроводжуються метаболічними порушеннями і токсичним ураженням організму, що призводить до окиснювального стресу у клітинах та до уражень печінки як головного детоксикаційного органу.

Саме тому останні десятиліття науковцями проводиться пошук ефективних антиоксидантів для попередження та захисту організму від наслідків окиснювального стресу у клітинах за умов патологій.

Глутатіон – трипептид, який володіє вираженими детоксикаційними та антиоксидантними властивостями. Система глутатіону в організмі відновлює понад 300 окиснених субстанцій, зокрема зв'язує вільні радикали, відновлює продукти перексидного окиснення ліпідів, фосfolіпідів мембран, білків, відновлює вітаміни С та Е [1].

Також зросла зацікавленість науковців до обміну сірковмісних амінокислот, метаболізму гідроген сульфід (H_2S), який володіє цитопротекторними властивостями і є ендогенним модулятором біологічних функцій організму [2]. Відомо, що гідроген сульфід у межах фізіологічних концентрацій здатний проявляти антиоксидантні та протизапальні властивості.

Зокрема, відомо [3], що метаболічні шляхи глутатіонової системи та системи обміну H_2S є взаємопов'язаними, а висока концентрація гідроген сульфід сприяє підвищенню рівня глутатіону. Але вплив трипептиду на стан системи обміну газотрансміттера за умов нефропатії залишається не вивченим.

Мета роботи – вивчити вплив глутатіону на систему H_2S -генеруючих ензимів, концентрацію та про-

дукцію H_2S у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент проводили на 84 білих статевозрілих щурах-самцях масою 160-180 г. Нефропатию моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення фолиєвої кислоти (Sigma-Aldrich) у дозі 250 мг/кг [4]. Тварини перебували в умовах виварію зі сталим температурним та світловим режимами і були поділені на три групи: 1 – інтактна група тварин, 2 – тварини з експериментальною нефропатією, 3 – тварини з нефропатією, яким інтрагастрально в дозі 100 мг/кг вводили глутатіон упродовж трьох днів (Sigma-Aldrich). Тварин виводили з експерименту на наступний день після останнього введення глутатіону відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту експериментальних тварин (86/609/ЄС). Вимірювання проводили на спектрофотометрі Agilent Cary 60.

Активність десульфуруючих ензимів (цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін- β -синтази та цистатіонінаміно-трансферази) оцінювали за кількістю утвореного гідроген сульфід [5]. Визначення продукції та концентрації гідроген сульфід проводили методом [6, 7], що ґрунтується на реакції між сульфідом та N, N-диметилпарафенілендіаміном у кислому середовищі в присутності іонів Fe^{3+} . Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [8].

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

**ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ (M ± m)**

Досліджувані показники	Контроль, n = 36	Нефропатія, n = 25	Нефропатія + глутатіон, n = 23
H ₂ S-концентрація, нмоль/л	21,33 ± 0,24	13,24 ± 0,76**	18,05 ± 0,69**/**
H ₂ S-продукція, нмоль/хв/мг білка	38,2 ± 0,27	24,89 ± 0,67**	36,96 ± 0,45*/**
Цистатіонін-γ-ліаза, нмоль H ₂ S/хв/мг білка	3,31 ± 0,06	2,02 ± 0,13**	2,65 ± 0,13**/**
Цистатіонін-β-синтаза, нмоль H ₂ S/хв/мг білка	2,49 ± 0,06	1,65 ± 0,13**	2,28 ± 0,15*/**
Цистеїноаміотрансфераза, нмоль H ₂ S/хв/мг білка	2,69 ± 0,05	1,97 ± 0,12**	2,96 ± 0,11**/**

Примітка: дані представлені у вигляді середня ± стандартна помилка середньої (M ± m); * – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, p < 0,05; ** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, p < 0,01; *** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p < 0,01.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов експериментальної нефропатії спостерігалось зниження концентрації на 37,92 % та продукції гідроген сульфід у на 34,84 % відповідно порівняно з контрольною групою (таблиця). В той же час введення глутатіону привело до зростання цих показників на 36,32 % та 48,4 % відповідно в порівнянні з показниками тварин із нефропатією.

H₂S-генеруюча активність CSE, CBS та CAT у печінці щурів із нефропатією була знижена на 38,98 %, 33,73 % та 26,76 % відповідно у порівнянні з тваринами контрольної групи. Такі зміни можуть зумовлюватися порушенням регуляції внутрішньоклітинного обміну, синтезу глутатіону та інших важливих біологічно активних сполук.

Глутатіон підвищував рівень гідроген сульфід у за рахунок збільшення активності CSE та CBS на 31 % та 33,55 % в порівнянні з групою тварин із нефропатією відповідно (табл.). Введення трипептиду підвищувало активність CAT на 49,3 % та перевищувало показники активності контрольної групи тварин.

Можна припустити, що цистеїн, присутній в складі глутатіону, використовується у реакціях синтезу гідроген сульфід, а антиоксидантні [9] та детоксикаційні властивості глутатіону додатково сприяють покращенню досліджуваних показників у печінці тва-

рин із експериментальною нефропатією. Також відомо [10], що трипептид може брати участь у трансмембранному перенесенні електронів, тому можливим є утворення H₂S із глутатіону шляхом нуклеофільного заміщення α-вуглецю.

Вивчення впливу глутатіону на метаболізм H₂S за умов нефропатії є перспективним напрямком подальших досліджень, які дозволять виявити нові способи підвищення ефективності лікування нефропатії та їх ускладнень.

ВИСНОВКИ

Експериментальна нефропатія призводить до зниження активності H₂S-генеруючих ферментів, що зумовлює зменшення продукції та концентрації гідрогену сульфід у печінці щурів.

Встановлено тісний зв'язок метаболічних шляхів глутатіонової системи та гідрогену сульфід: введення глутатіону сприяло зростанню продукції і вмісту гідрогену сульфід та підвищенню активності H₂S-генеруючих ферментів у печінці щурів із нефропатією, можливо, завдяки включенню трипептиду як джерела цистеїну в процеси синтезу гідроген сульфід, а також завдяки його детоксикаційним та антиоксидантним властивостям.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- Dominko, K. Glutathionylation: A regulatory role of glutathione in physiological processes / K. Dominko, D. Dikic // Arch. Ind. Hyg. Toxicol. – 2018. – Vol. 69. – P. 1–24. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-2966>
- Giuffre, A. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology / A. Giuffre, J. B. Vicente // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–31. <https://doi.org/10.1155/2018/6290931>
- Kimura, Y. Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria / Y. Kimura, Y.-I. Goto // Antioxidants & Redox Signaling. – 2010. – № 12 (1). – P. 1–13.
- Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state / A. Gupta, V. Puri, R. Sharma, S. Puri // Experimental and Toxicol. Pathol. – 2012. – Vol. 64 (3). – P. 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.08.010>
- 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. – Vol. 206 (2). – P. 267–277. <https://doi.org/10.1042/bj2060267>
- The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous K_{ATP} channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // Eur. Molecular Biol. Organization. – 2001. – Vol. 20. – P. 6008–6016. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>
- Siegel, L. M. A direct microdetermination for sulfide / L. M. Siegel // Analytical Biochem. – 1965. – Vol. 11. – P. 126–132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90051-5)
- Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbroun, A. L. Farr, R. I. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
- Allen, J. Effects of oral glutathione supplementation on systemic oxidative stress biomarkers in human volunteers / J. Allen, R. D. Bradley // J. Altern. Complement Med. – 2011. – Vol. 17 (9). – P. 827–833. <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0716>
- Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic / G. A. Benavides, G. L. Squadrito, R. W. Mills et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 17977–17982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705710104>

REFERENCES

1. Dominko, K., & Đikić, D. (2018). Glutathionylation: a regulatory role of glutathione in physiological processes. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69 (1), 1–24. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-2966>
2. Giuffrè, A., & Vicente, J. B. (2018). *Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2018/6290931>
3. Kimura, Y., Goto, Y.-I., & Kimura, H. (2010). Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2282>
4. Gupta, A., Puri, V., Sharma, R., & Puri, S. (2012). Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64 (3), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.08.010>
5. Stipanuk, M. H., & Beck, P. W. (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal*, 206 (2), 267–277. <https://doi.org/10.1042/bj2060267>
6. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO Journal*, 20 (21), 6008–6016. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>
7. Siegel, L. M. (1965). A direct microdetermination for sulfide. *Analytical Biochemistry*, 11, 126–132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90051-5)
8. Lowry, O. H., Rosenbroun, N. I., Farr, A. L., Randall, R. I. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
9. Allen, J., & Bradley, R. D. (2011). Effects of Oral Glutathione Supplementation on Systemic Oxidative Stress Biomarkers in Human Volunteers. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17 (9), 827–833. <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0716>
10. Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. P., ... Kraus, D. W. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (46), 17977–17982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705710104>

Відомості про авторів:

Ференчук Є. О., аспірант кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії, Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет». E-mail: yelena_f@ukr.net. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9526-0686>

Геруш І. В., канд. мед. наук, доцент кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії, проректор з науково-педагогічної роботи, Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет». E-mail: gerush.igor@bsmu.edu.ua

Information about authors:

Ferenchuk Y., PhD-student of the Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University". E-mail: yelena_f@ukr.net. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9526-0686>

Gerush I., M.D, PhD in medicine by speciality biochemistry, associate professor of the Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry, Vice rector of scientific and pedagogical work of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University". E-mail: gerush.igor@bsmu.edu.ua

Сведения об авторах:

Ференчук Е. А., аспирант кафедры биорганической и биологической химии и клинической биохимии, Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет». E-mail: yelena_f@ukr.net.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9526-0686>

Геруш И. В., канд. мед. наук, доцент кафедры биорганической и биологической химии и клинической биохимии, проректор по научно-педагогической работе, Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет». E-mail: gerush.igor@bsmu.edu.ua

Надійшла до редакції 10.12.2018 р.