БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

**КОЛЯНИК ІЛАНА ОЛЕГІВНА**

УДК 612.826.33.015.22:577.112.386:612.354.2:616.61-092.9

**ДИСЕРТАЦІЯ**

# ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОБМІН ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ ПЕЧІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ НЕФРОПАТІЇ

222 – Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____І.О. Коляник

Науковий керівник – Геруш Ігор Васильович, кандидат медичних наук, доцент, проректор з науково-педагогічної роботи

**Чернівці – 2021**

# АНОТАЦІЯ

*Коляник І.О.* Вплив мелатоніну на обмін гідроген сульфіду та антиоксидантну систему печінки при експериментальній нефропатії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина в галузі знань 22 – Охорона здоров'я. – Буковинський державний медичний університет, Чернівці, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу мелатоніну на показники стану оксидантно-антиоксидантної системи, енергетичний метаболізм та обмін гідроген сульфіду в печінці та крові щурів за умов фізіологічної норми та експериментальної нефропатії.

Ураження нирок призводить до ускладнення багатьох соматичних захворювань і підвищує ризик смерті у пацієнтів. Це зумовлює необхідність пошуку засобів ефективної та безпечної фармакологічної корекції нефропатій різної етіології. Печінка та нирки відіграють важливу роль також у знешкодженні ксенобіотиків, тому вони більш схильні до окислювальних пошкоджень. В останні роки актуальним є також вивчення ролі $H_2S$ в підтриманні окисно-відновного гомеостазу та впливу на активність антиоксидантного захисту.

Одним із найбільш поширених антиоксидантів є мелатонін. Він, як гормон епіфізу, володіє імуностимулюючими, детоксикаційними та антиоксидантними властивостями. Мелатонін здатний перехоплювати вільні радикали та стимулювати активність антиоксидантних ензимів. Однак, залишаються нез'ясованими всі механізми дії мелатоніну, зокрема, його вплив на оксидантно-антиоксидантну систему та систему гідроген сульфіду печінки та крові при нефропатії.

Дослідження проведено на 127 нелінійних білих статевозрілих щурах масою 160-180 г. Тварини були розподілені на 5 груп: I – контрольна група тварин; II – тварини з 3-денною експериментальною нефропатією; III –

тварини, яким на тлі моделювання експериментальної нефропатії щоденно вводили мелатонін із розрахунку 10 мг/кг маси тіла внутрішньошлунково упродовж 3 днів; IV – тварини з 7-денною експериментальною нефропатією; V – тварини із експериментальною нефропатією, яким щоденно вводили мелатонін в дозі 10мг/кг маси упродовж 7днів. Моделювання нефропатії здійснювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення фолієвої кислоти (Sigma-Aldrich, США ) у дозі 250мг/кг маси тіла.

Вивчали показники оксидантно-антиоксидантної системи крові та печінки, активність ензимів системи енергозабезпечення мітохондрій гепатоцитів, а також рівень гідроген сульфіду та $H_2S$-генеруючих ензимів за умов розвитку нефропатії та введення мелатоніну.

Встановлено, підвищення концентрації креатиніну та сечовини в плазмі крові на 140,5% та 26,6% відповідно на 3 день та на 30,7% і 14,6% відповідно на 7 день у тварин з експериментальною нефропатією в порівнянні з групою контролю. Значне підвищення рівня креатиніну та сечовини свідчить про погіршення фільтраційної функції нирок, посилення пасивної реабсорбції в ниркових канальцях та порушення здатності нирок виводити з кровотоку продукти азотистого метаболізму, що свідчить про токсичне ураження нирок.

На 3 день експериментальної нефропатії спостерігали підвищення в плазмі крові щурів активності γ-глутамілтранспептидази (ГГТ) і аланінамінотрансферази (АЛАТ) на 30,9% та 74% відповідно в порівнянні з групою контрольних тварин. Вміст загального протеїну знижувався як на 3 так і на 7 день експериментальної нефропатії на 14,5% та 14,2% відповідно в порівнянні з показниками контрольних тварин. Дані зміни показників свідчить про ураження печінки та порушення її протеїнсинтезувальної функції на фоні експериментальної нефропатії, викликаної високими дозами фолієвої кислоти.

Нами встановлено, підвищення в плазмі крові щурів вмісту ТБК-активних продуктів як на 3-ій так і на 7-ий день нефропатії на 32,8% та 20,8% відповідно, в порівнянні з контрольною групою тварин. Вміст карбонільних

похідних протеїнів нейтрального характеру (ОМП370) та основного характеру (ОМП430) в крові підвищувався на 57,8% та 19,4% на 3-ій день нефропатії та на 53,1% і 50% відповідно на 7 день в порівнянні з показниками контролю. Підвищення досліджуваних показників свідчить про посилення процесів вільнорадикального окиснення за умов виникнення нефропатії.

Встановлено порушення і в системі антиоксидантного захисту та глутатіонової системи крові. Так, активність супероксидисмутази (SOD) знижувалася на 3-ій день на 13,2%, на 7-ий день – на 8,4%, каталази на 20,2% на 3-ій день, на 23,0% - на 7-ий день, в порівнянні з контрольною групою тварин. Спостерігали зниження активності глутатіонпероксидази (GPx) на 70,8% на 3-ій день та 65,3% на 7-ий день експерименту. Зниження активності глутатіон-S-трансферази (GST) встановлено на 7-ий день на 10,8% в порівнянні зі значеннями контролю.

Вміст церулоплазміну в плазмі крові щурів зростав на 40,9% на 3-ій день та на 74% на 7-ий день експерименту, порівняно з групою контрольних тварин.

Також нами виявлені зміни вмісту вільних SH-груп та $H_2S$ в плазмі крові щурів з експериментальною нефропатією. Спостерігалося зниження вмісту SH-груп на 26,6% на 3-ій день та 9,3% на 7-ий день експерименту; вміст $H_2S$ знижувався на 28,2% та 24,3% на 3-ій та 7-ий день відповідно, порівняно з групою контролю. Зниження вмісту SH-груп та $H_2S$ в плазмі крові щурів може бути пов’язане як з посиленою інтенсифікацією вільнорадикальних процесів, так і з посиленим використанням цих сполук.

Триденне введення мелатоніну знижувало концентрацію креатиніну на 19%, але все ще достовірно перевищувало рівень показників контролю майже в 2 рази. Семиденне застосування мелатоніну знижувало рівень креатиніну на 19,2% та досягало значень контрольних тварин. На третій день експерименту за умов застосування мелатоніну концентрація сечовини знижувалася на 13,2%.

Такий вплив мелатоніну є результатом покращення фільтраційної здатності нирок щодо виведення ними продуктів азотистого обміну.

Рівень ОМП370 та ОМП430 після введення мелатоніну знижувався на 19,8% та 25,6% відповідно на 3–ій день виникнення нефропатії порівняно з показниками тварин з нефропатією. 7-ми денне введення мелатоніну призводило до зниження рівня ОМП370 на 27,6% та ТБК-активних продуктів на 23,6% порівняно з групою тварин з нефропатією.

При введенні мелатоніну протягом 3-ох днів в крові щурів зростала активність: каталази на 17,6% та GPx на 103,5% в порівнянні з групою тварин з нефропатією. На 7-ий день активність каталази підвищувалася на 13,9%, а GPx на 99,6% в порівнянні з нефропатією, але все ще достовірно відрізнялися від показників групи контрольних тварин. Активність GST підвищувалася на 7-ий день на 12,2% в порівнянні із значеннями тварин із нефропатією.

Мелатонін підвищував рівень вільних SH-груп на 26,7% на 3-ій день корекції в порівнянні з показниками експериментальних тварин та досягав значень контрольних тварин. Концентрація $H_2S$ при введенні мелатоніну підвищувалася на 26,7% (3-ій день) та 13,9% (на 7-ий день), але все ще залишалася нижчою в порівнянні з показниками контролю.

Ведення мелатоніну знижувало вміст і сироваткового церулоплазміну, як на 3-ій день – на 14,8%, так і на 7 день на 34,3% в порівнянні з групою тварин з нефропатією.

Нами встановлено посилення процесів окиснення ліпідів та білків в гепатоцитах, про що свідчить підвищення вмісту: ТБК-активних продуктів на 3-ій та на 7-ий день на 19,9% і 38,8%; вмісту ОМП370 на 42,6% та 16,1% відповідно, а також ОМП430 на 17,5% на 7-ий день виникнення нефропатії порівняно із значеннями контролю.

Оскільки, дихальний ланцюг мітохондрій є джерелом активних форм оксигену (АФО), нами було досліджено активність мітохондріальних ензимів та вміст вільних SH-груп в гепатоцитах щурів. Було виявлено зниження активності NADH-убіхінон-оксидоредуктази на 9,1% на 3-ій день та на 7,0%

на 7-ий день експерименту; сукцинатдегідрогенази на 3-ій день на 26,8% та на 7-ий день на 16,7%; цитохром с оксидази та $H^+$-АТФ-ази на 42,0% та 37,5% на 3-ій та на 37,9% та 33,1% на 7-ий день експерименту відповідно, а також вмісту SH-груп в мітохондріях гепатоцитів на 30,9% - на 3-ій день та на 33,2% 7-ий день порівняно з групою контрольних тварин.

Таким чином, при експериментальній нефропатії відбувається зниження активності дихальних комплексів, що обумовлено окислювальним пошкодженням білків, що складають основу внутрішньої мембрани дихального ланцюга мітохондрій, а також і ліпідів, що приймають участь в стабілізації дихальних комплексів в мембрані.

При введенні мелатоніну показники ТБК-активних продуктів та ОМП370 знизилися на 3-ій день на 23,9% та 22,3%, та на 7-ий день – 31,3% та 21,5% відповідно порівняно із групою тварин із нефропатією. Також спостерігалося зниження ОМП430 на 25,2% на 7-ий день введення мелатоніну. Таким чином, введення мелатоніну здатне зменшувати ступінь пероксидації білків і ліпідів.

Введення мелатоніну мало вплив на окиснення субстратів I та II комплексів та сприяло підвищенню активності NADH-убіхінон оксидоредуктази в мітохондріях гепатоцитів щурів на 7,9% на 7 день в порівнянні з показниками тварин з нефропатією. Підвищення сукцинатдегідрогеназної активності спостерігалося на 24,6% на 3-ій день та на 16,8% на 7-ий день в порівнянні з тваринами з експериментальною нефропатією. Результати показали, що на 3-ій день мелатонін підвищує цитохром с оксидазну та $H^+$-АТФ-азну активності в мітохондріях гепатоцитів на 78,6% та 25,3%, а на 7-ий день на 44,8% та 24,5% відповідно порівнянні з тваринами з експериментальною нефропатією. Однак, підвищення активності $H^+$-АТФ-ази все ще достовірно відрізнялося від показників контролю. Зростання вмісту SH-груп при корекції мелатоніном виявлено на 7 день на 14,5% в порівнянні з групою тварин з нефропатією, але все ж таки не досягає показників контрольних тварин.

Нами встановлено зміни в системі антиоксидантного захисту печінки. Активність супероксиддисмутази зростала на 3-ій день експерименту на 30,4%; каталази на 3 та 7 день на 24,9% та 19,4% відповідно порівняно з показниками групи контрольних тварин. В той час було встановлено зниження вмісту відновленого глутатіону (GSH) на 33,6%, глутатіонпероксидазної активності на 11,6%, глутатіон-S-трансферазної активності на 22,7% на 3-ий день виникнення нефропатії, та зниження вмісту GSH та активності GPx на 7-ий день у тварин з нефропатією на 23,1% та 36,5% відповідно, в порівнянні з контролем.

Введення мелатоніну мало позитивний вплив на активність супероксиддисмутази та каталази, що проявлялося в зниженні цих показників на 19,4% та 18,4% відповідно на 3-ій день експерименту, порівняно з показниками тварин з нефропатією. Також мало місце зниження активності каталази на 16,8% на 7-ий день після введення мелатоніну, в порівнянні з показниками експериментальних тварин з нефропатією.

Ведення мелатоніну сприяло зростанню вмісту GSH як на 3-ій, так і на 7-ий день експерименту на 30,3% та 24,2% відповідно, а також підвищувало активність GPx на 39,2% на 7-й день в порівнянні з показниками тварин з нефропатією. Однак, активність GPx все ще достовірно відрізнялася від показників контролю.

Введення мелатоніну упродовж 7 днів сприяє нормалізації показників оксидантної та антиоксидантної системи у печінці щурів із нефропатією, а також покращує функціонування дихального ланцюга мітохондрій, що, ймовірно, пов’язано з його потужними антиоксидантними властивостями.

Нами вперше було встановлено взаємозв’язок між порушенням обміну гідроген сульфіду та змінами оксидантно-антиоксидантної системи печінки та крові щурів, а також досліджено вплив мелатоніну на функціонування системи гідроген сульфіду в печінці щурів за умов за умов розвитку нефропатії. Встановлено, що нефропатія призводить до зниження концентрації та продукції $H_2S$ у печінці щурів, через пригнічення $H_2S$-

продукуючої активності ензимів, що генерують $H_2S$. Так, за умов експериментальної нефропатії на 3-ій день спостерігалося зниження концентрації $H_2S$ в печінці щурів на 37,92% та продукції $H_2S$ на 34,84%, що супроводжувалося і зниженням активності $H_2S$-синтезуючих ензимів: цистатіонін-γ-ліази (CSE) на 38,98%, цистатіонін-β-синтази (CBS) на 33,73% та цистеїнамінотрансферази (CAT) на 26,76% в порівнянні з тваринами контрольної групи. На 7-ий день концентрація $H_2S$ знижувалася на 45,2%, а продукція - на 27,9%. Встановлено і зниження активності $H_2S$-продукуючих ензимів: CSE – на 31,7%, CBS – на 32,1%, CAT – на 32,7%, порівняно з показниками групи контрольних тварин.

Введення мелатоніну призводило до зростання показників концентрації та продукції $H_2S$ у печінці щурів на 3-ій день – на 16,59% та 21,30%, а на 7-ий день - на 33,0% та 20,9% відповідно в порівнянні з показниками тварин з нефропатією, але на 7–ий день все ще достовірно відрізнялися від показників контролю. Мелатонін збільшував рівень гідроген сульфіду шляхом підвищення активності CSE, CBS та CAT на 3 день експерименту на 24,15%, 32,52% та 28,62% відповідно в порівнянні з групою тварин із нефропатією. Семиденне введення мелатоніну підвищувало рівень $H_2S$ за рахунок зростання гідроген сульфід продукуючої активності CBS на 23,7% та CAT на 25,4% в порівнянні з показниками тварин з нефропатією. Однак, на 7 день експерименту показники активності ензимів, що беруть участь в генерації $H_2S$ все ще достовірно відрізнялися від значень контрольних тварин.

Результати досліджень вказують, що мелатонін, завдяки своїм антиоксидантним властивостям здатний знижувати рівень окислювального стресу, покращувати функціонування ензимів дихального комплексу ланцюга мітохондрій, стимулює активність ряду антиоксидантних ензимів і зростання вмісту GSH, таким чином синергічно взаємодіючи з ним, а також збільшує вміст гідроген сульфіду, який також, в певній мірі, володіє антиоксидантними властивостями.

Отримані результати досліджень розширюють теоретичні дані щодо ефекту мелатоніну на розвиток окислювального стресу, антиоксидантну систему крові та печінки, систему енергозабезпечення в мітохондріях гепатоцитів і обмін гідроген сульфіду та є експериментальним підґрунтям щодо доцільності подальшого вивчення впливу мелатоніну як безпечного та ефективного засобу для профілактики та корекції патології нирок та печінки.

Результати дисертаційної роботи впроваджено у навчальний процес кафедри патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету, кафедри медичної біохімії Тернопільского національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедри біологічної та медичної хімії імені академіка Г.О. Бабенка Івано-Франківського національного медичного університету.

**Ключові слова:** нефропатія, мелатонін, оксидативний стрес, антиоксидантна система, гідроген сульфід, печінка, мітохондрії.

# ANNOTATION

*Kolianyk I.O.* Melatonin Effect on Hydrogen Sulfide Metabolism and Liver Antioxidant System in Experimental Nephropathy. – Qualification Scientific Work as a Manuscript.

Thesis to obtain the academic degree of Doctor of Philosophy (PhD) on specialty 222 – Medicine in the field of knowledge 22 – Health Care. – Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, 2021.

The thesis deals with investigation of melatonin effect on the indicators of the oxidant-antioxidant system state, energy metabolism and hydrogen sulfide metabolism in the liver and blood of rats under physiologically normal conditions and in experimental nephropathy.

Kidney lesions result in complications of many somatic diseases and increase the risk of death in patients. It stipulates the necessity to find the means of an effective and safe pharmacological correction of nephropathies of various etiologies. The liver and kidneys play an important role in xenobiotic neutralization as well therefore these organs are more susceptible to oxidation damages. In recent years investigation of $H_2S$ role in the maintenance of oxidation-reduction homeostasis and its effect on the activity of antioxidant protection has become a matter of topical interest.

Melatonin is one of the most wide spread antioxidants. As an epiphyseal hormone it possesses immune stimulating, detoxicant and antioxidant properties. Melatonin is able to bind free radicals and stimulate activity of antioxidant enzymes. Meanwhile, all the mechanisms of melatonin action remain uncertain including its effect on the oxidant-antioxidant system and hydrogen sulfide system of the liver and blood in nephropathy.

The research was conducted on 127 nonlinear albino mature rats with the body mass of 160-180 grams. The animals were distributed into 5 groups: I – the control group of animals; II – the animals with 3-day experimental nephropathy; III – the animals with simulated experimental nephropathy and everyday introduction of melatonin in the dose of 10 mg/kg of the body weight into the

stomach during 3 days; IV – the animals with 7-day experimental nephropathy; V – the animals with experimental nephropathy everyday introduction of melatonin in the dose of 10 mg/kg of the body weight during 7 days. Nephropathy was simulated by means of a single injection of folic acid into the peritoneum (Sigma-Aldrich, USA) in the dose of 250 mg/kg of the body weight.

The indicators of the oxidant-antioxidant system of the blood and liver, enzymatic activity of the mitochondrial energy-supply system in the liver cells, the level of hydrogen sulfide and $H_2S$-generating enzymes were studied under conditions of nephropathy development and melatonin introduction.

140,5% and 26,6% increase of creatinine and urea concentrations in the blood plasma respectively were found on the 3$^{rd}$ day, and 30,7% and 14,6% increase on the 7$^{th}$ day respectively in animals with experimental nephropathy in comparison with the control group. A considerable increase of creatinine and urea levels is indicative of deterioration of the kidney filtration function, intensification of passive reabsorption in the renal tubules and disorders in the ability of kidneys to eliminate nitrogenous metabolism products from the blood flow which is indicative of toxic kidney lesion.

On the 3$^{rd}$ day of experimental nephropathy the activity of γ-glutamyltranspeptidase (GGT) and alanine aminotransferase (ALAT) in the blood plasma of rats 30,9% and 74% increase respectively in comparison with the control group of animals. Total protein content on the 3$^{rd}$ and 7$^{th}$ days of experimental nephropathy 14,5% and 14,2% decreased respectively in comparison with the indicators of the control animals. The changes of indicators are indicative of liver lesion and disorders in its protein-synthetizing function with experimental nephropathy caused by high doses of folic acid.

32,8% and 20,8% increase of TBA-active products in the blood plasma of rats were found on the 3$^{rd}$ and 7$^{th}$ days of nephropathy respectively in comparison with the control group of animals. The content of carbonyl protein derivatives of a neutral character (OMP370) and alkaline character (OMP430) in the blood 57,8% and 19,4% increased on the 3$^{rd}$ day of nephropathy and 53,1% and 50% on the 7$^{th}$

day respectively in comparison with the control indicators. Increase of the indicators examined is indicative of the intensification of the free radical oxidation processes under conditions of nephropathy.

Disorders in the antioxidant defense system and glutathione system of the blood were found. Thus, superoxide dismutase (SOD) activity 13,2% decreased on the 3$^{rd}$ day, 8,4% decreased on the 7$^{th}$ day, catalase activity 20,2% decreased on the 3$^{rd}$ day and 23,0% - on the 7$^{th}$ day in comparison with the control group of animals. Glutathione peroxidase (GPx) activity 70,8% decreased on the 3$^{rd}$ day and 65,3% - on the 7$^{th}$ day of the experiment. Decrease of glutathione-S-transferase (GST) activity on the 7$^{th}$ day was found to be 10,8% in comparison with the control values.

The changes in the content of free SH-groups and $H_2S$ in the blood plasma of rats with experimental nephropathy were found. On the 3$^{rd}$ day of the experiment SH-groups 26,6% decreased and 9,3% - on the 7$^{th}$ day of the experiment; $H_2S$ content 28,2% and 24,3% decreased on the 3$^{rd}$ and 7$^{th}$ days respectively in comparison with the control group. A decreased content of SH-groups and $H_2S$ in the blood plasma of rats can be associated with both an increased intensification of free radical processes and an increased utilization of these compounds.

Ceruloplasmin content in the blood plasma of rats on the 3$^{rd}$ day 40,9% increased and on the 7$^{th}$ day of the experiment it 74% increased in comparison with the control group.

Three-day introduction of melatonin reduced creatinine concentration by 19%, but it was practically twice as much than the values of the control group. Seven-day administration of melatonin decreased creatinine level by 19,2% and reached the levels of the control animals. On the third day of the experiment after melatonin administration urea concentration 13,2% decreased.

Such melatonin effect results from an improved filtration ability of the kidneys concerning their function to eliminate nitrous metabolism products.

OMP370 and OMP430 levels after melatonin introduction 19,8% and 25,6% decreased respectively on the 3$^{rd}$ day of nephropathy in comparison with the

indicators of animals with nephropathy. Seven-day melatonin introduction resulted in 27,6% decrease of OMP 370 level and 23,6% decrease of TBA-active products as compared to animals with nephropathy.

After melatonin introduction during 3 days catalase activity in the blood of rats 17,6% increased and GPx – 103,5% in comparison with the group of animals with nephropathy. On the 7$^{th}$ day catalase activity 13,9% increased and GPx – 99,6% in comparison with nephropathy, though it still reliably differed from the values of the control group of animals. GST activity on the 7$^{th}$ day 12,2% increased as compared to animals with nephropathy.

Melatonin increased the level of free SH-groups by 26,7% on the 3$^{rd}$ day of correction in comparison with the indicators of experimental animals and reached the values of the control animals. $H_2S$ concentration with melatonin introduction 26,7% increased (3$^{rd}$ day) and 13,9% (7$^{th}$ day), but it was still lower than that of the control indicators.

Melatonin introduction decreased the content of serum ceruloplasmin on the 3$^{rd}$ day by 14,8%, and on the 7$^{th}$ day by 34,3% in comparison with the group of animals with nephropathy.

Intensification of lipid and protein oxidation processes in the liver cells was found which is indicative of an increased content of TBA-active products on the 3$^{rd}$ and 7$^{th}$ days by 19,9% and 38,8% respectively; OMP370 content by 42,6% and 16,1% respectively, and OMP430 by 17,5% on the 7$^{th}$ day of nephropathy in comparison with the control group.

Since the respiratory chain of mitochondria is a source of oxygen active forms the activity of mitochondrial enzymes and the content of free SH-groups in the liver cells were studied. On the 3$^{rd}$ day of the experiment 9,1% decrease of NADH-ubiquinone oxidoreductase was found and 7,0% decrease on the 7$^{th}$ day of the experiment; succinate dehydrogenase decreased by 26,8% on the 3$^{rd}$ day and 16,7% - on the 7$^{th}$; cytochrome c oxidase and $H^+$-ATP 42,0% and 37,5% decreased on the 3$^{rd}$ day, and 37,9% and 33,1% on the 7$^{th}$ day of the experiment respectively. The content of SH-groups in the mitochondria of the liver cells 30,9%

decreased on the 3rd day and 33,2% decreased on the 7th day in comparison with the group of control animals.

Therefore, experimental nephropathy results in reduced activity of the respiratory complexes, which is stipulated by oxidative damage of proteins constituting the basis of the internal membrane of the mitochondrial respiratory chain and lipids participating in stabilizing respiratory complexes in the membranes.

After melatonin introduction the indicators of TBA-active products and OMP370 on the 3rd day 23,9% and 22,3% decreased, on the 7th day – 31,3% and 21,5% respectively as compared to the group of animals with nephropathy. OMP430 decreased by 25,2% on the 7th day of melatonin introduction. Therefore, melatonin introduction can reduce the degree of peroxidation of proteins and lipids.

Melatonin introduction influenced on oxidation of the substrates of I and II complexes and promoted 7,9% increased activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase in the mitochondria of the liver cells of rats on the 7th day as compared to the indicators of animals with nephropathy. 24,6% increase of succinate dehydrogenase activity was observed on the 3rd day and16,8% increase on the 7th day as compared to the animals with experimental nephropathy. The results were indicative of 78,6% and 25,3% increase of cytochrome c oxidase and $H^+$-ATP in the mitochondria of the liver cells on the 3rd day due to melatonin introduction, and their 44,8% and 24,5% increase respectively on the 7th day as compared to the animals with experimental nephropathy. It should be noted that increase of $H^+$-ATP activity differed reliably from that of the control indicators. The content of SH-groups after melatonin correction 14,5% increased on the 7th day as compared to the group of animals with nephropathy, but still it was not equal to that of the control group indices.

Certain changes were found in the antioxidant defense system of the liver. Activity of superoxide dismutase 30,4% increased on the 3rd day of the experiment; catalase – 24,9% and 19,4% respectively in comparison with the indices of the

control group. At the same time, the content of reduced glutathione (GSH) 33,6% decreased, glutathione peroxidase activity – 11,6%, glutathione-S-transferase activity – 22,7% on the 3rd day of nephropathy. On the 7th day GSH content and GPx activity in the animals with nephropathy 23,1% and 36,5% decreased respectively in comparison with the control.

Melatonin introduction produced a positive effect on the activity of superoxide dismutase and catalase, which was evidenced in 19,4% and 18,4% decrease of these indices on the 3rd day of the experiment in comparison with the indices of animals with nephropathy. On the 7th day of the experiment catalase activity 16,8% decreased after melatonin introduction as compared to the indicators of experimental animals with nephropathy.

Melatonin promoted increase of GSH content both on the 3rd and 7th days of the experiment –30,3% and 24,2% respectively, and increase of GPx activity 39,2% as much on the 7th day as compared to the animals with nephropathy. Though, GPx activity differed reliably from that of the control indices.

Melatonin introduction during 7 days promotes normalization of oxidant and antioxidant system parameters in the liver of rats with nephropathy and improves functioning of the mitochondrial respiratory chain, which might be associated with its powerful antioxidant properties.

We are the first to find interrelations between disorders of hydrogen sulfide metabolism and changes of the oxidant-antioxidant system in the liver and blood of rats, and to examine melatonin effect on the functioning of hydrogen sulfide system in the liver of rats under conditions of nephropathy development. Nephropathy was found to result in decreased concentration and production of $H_2S$ in the liver of rats due to inhibition of $H_2S$-producing activity of enzymes generating $H_2S$. Thus, under conditions of experimental nephropathy on the 3rd day $H_2S$ concentration in the liver of rats 37,92% decreased and $H_2S$ production – 34,84% respectively, which was associated with a reduced activity of $H_2S$-synthesizing enzymes: cystathionine -γ-lyase (CSE) by 38,98%, cystathionine -β-synthase (CBS) by 33,73% and cysteine aminotransferase (CAT) by 26,76% in

comparison with animals from the control group. On the 7th day $H_2S$ concentration 45,2% decreased, and its production – by 27,9%. Decrease of the activity of $H_2S$-producing enzymes was found as well: CSE – by 31,7%, CBS – by 32,1%, CAT – by 32,7% in comparison with the indices from the control group of animals.

Melatonin introduction resulted in the increase of concentration and production of $H_2S$ in the liver of rats on the 3rd day – by 16,59% and 21,30%, and on the day - by 33,0% and 20,9% respectively as compared to the indices of animals with nephropathy, but these parameters still differed reliably on the 7th day from that of the control. Melatonin increased hydrogen sulfide level by means of increasing CSE, CBS and CAT activity on the 3rd day of the experiment by 24,15%, 32,52% and 28,62% respectively in comparison with the group of animals with nephropathy. Seven-day melatonin introduction increased $H_2S$ level at the expense of hydrogen sulfide producing activity of CBS by 23,7%, CAT and 25,4% in comparison with animals afflicted with nephropathy. Meanwhile, on the 7th day of the experiment the parameters of enzymatic activity participating in $H_2S$ generation still differed reliably from the indices of the control animals.

The results of our research are indicative of the fact that melatonin due to its antioxidant properties is able to decrease the level of oxidative stress, improve functioning of enzymes in the respiratory chain of mitochondria, stimulate activity of a number of antioxidant enzymes and increase GSH content, and therefore being in synergism relation with it, and increase hydrogen sulfide content that to some extent possesses antioxidant properties.

The results of our research obtained expand theoretical knowledge concerning melatonin effect produced on the development of oxidative stress, antioxidant system of the blood and liver, system of energy supply in the mitochondria of the liver cells and hydrogen sulfide metabolism, and make an experimental foundation concerning reasonability of further investigation of melatonin effect as a safe and effective means for prevention and correction of kidney and liver pathology.

The results of the thesis obtained are introduced into the educational process at the Department of Pathological Physiology at Bukovinian State Medical

University, Department of Medical Chemistry at I.Ya.Horbachevskyi Ternopil National Medical University, Academician H.O.Babenko Biological and Medial Chemistry Department at Ivano-Frankivsk National Medical University.

**Key words:** nephropathy, melatonin, oxidative stress, antioxidant system, hydrogen sulfide, liver, mitochondria.