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 у 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 3rd day, and 30,7% and 14,6%

increase on the 7th 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 3rd 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 3rd and 7th 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 3rd and 7th 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 3rd day of nephropathy and 53,1% and 50% on the 7th 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 3rd day, 8,4% decreased on the 7th day, catalase activity 20,2% decreased on the 3rd day and 23,0% - on the 7th day in comparison with the control group of animals. Glutathione peroxidase (GPx) activity 70,8% decreased on the 3rd day and 65,3% - on the 7th day of the experiment. Decrease of glutathione-S-transferase (GST) activity on the 7th 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 3rd day of the experiment SH-groups 26,6% decreased and 9,3% - on the 7th day of the experiment; H_2S content 28,2% and 24,3% decreased on the 3rd and 7th 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 3rd day 40,9% increased and on the 7th 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 3rd 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 7th 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 7th day 12,2% increased as compared to animals with nephropathy.

Melatonin increased the level of free SH-groups by 26,7% on the 3rd 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 (3rd day) and 13,9% (7th day), but it was still lower than that of the control indicators.

Melatonin introduction decreased the content of serum ceruloplasmin on the 3rd day by 14,8%, and on the 7th 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 3rd and 7th days by 19,9% and 38,8% respectively; OMP370 content by 42,6% and 16,1% respectively, and OMP430 by 17,5% on the 7th 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 3rd day of the experiment 9,1% decrease of NADH-ubiquinone oxidoreductase was found and 7,0% decrease on the 7th day of the experiment; succinate dehydrogenase decreased by 26,8% on the 3rd day and 16,7% - on the 7th; cytochrome c oxidase and H^+-ATP 42,0% and 37,5% decreased on the 3rd day, and 37,9% and 33,1% on the 7th 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.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Геруш І.О., Григор'єва Н.П., Коляник І.О., Ференчук Є.О., Дікал М.В. Вплив мелатоніну на систему гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії. Клінічна та експериментальна патологія. 2018; 3(65): 19-23.

2. Коляник І.О., Геруш І.В. Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів при експериментальній нефропатії. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2020; 4(6): 37-41.

3. Kolianyk I, Gerush I. Melatonin effect on the oxidant state and energy metabolism in the liver mitochondria of rats under conditions of experimental nephropathy. PharmacologyOnline. 2021; 1: 384-394.

4. Коляник І.О., Геруш І.В., Григор'єва Н.П. Вплив мелатоніну на стан оксидантної та антиоксидантної систем і рівень гідроген сульфіду у крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Медична та клінічна хімія. 2021; 23(1): 37-44.

5. Коляник І.О., Геруш І.В. Стан системи гідроген сульфіду печінки щурів при експериментальній нефропатії за умов введення мелатоніну. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2021; 1(7): 66-70.

6. Геруш І.В., Коляник І.О., Ференчук Є.О. Вплив мелатоніну на каталазну активність крові щурів. Матеріали науково-практичної конференції з Міжнародною участю; Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії; Харків, 12-13 квітня, 2018; с.26.

7. Геруш І.В., Коляник І.О., Лопушинська І.В. Стан окисної модифікації білків крові щурів за умов експериментальної нефропатії та корекції мелатоніном. Матеріали 99-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 12,14,19 лютого 2018; Чернівці: Медуніверситет; 2018: с.61.

8. Gerush I.V., Kolianyk I.O., Ferenchuk Ye.O., Lopushynska I.V., Riabaia O.V. Melatonin effects on the hepatic hydrogen sulfide system of rats under

conditions of experimental nephropathy. Abstracts of the XI-th Parnas Conference - Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3-5 September, 2018; Ukr. Biochem. J; 90; 2018. P. 107.

9. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11,13,18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с.97.

10. Коляник І.О. Вплив 3-ох денного введення мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 10,12,17 лютого 2020; Чернівці: Медуніверситет; 2020: с.86.

11. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність в гепатоцитах щурів при експериментальній нефропатії. Матеріали підсумкової 102-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету; Чернівці, 8,10,15 лютого 2021; Чернівці: Медуніверситет; 2021: с.87.

12. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на сукцинатдегідрогеназну та H^+-АТФ-азну активність в мітохондріях печінки щурів при експериментальній нефропатії. Збірник матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 3.0»; Київ, 26 березня 2021; с.51.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ…….……..….	21
ВСТУП……..……...	22
РОЗДІЛ 1. СИНТЕЗ І ВЛАСТИВОСТІ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА МЕЛАТОНІНУ ЗА УМОВ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ НОРМИ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЯХ (огляд літератури)	31
1.1. Обмін гідроген сульфіду та його взаємозв’язок з оксидантною та антиоксидантною системами.....	31
1.2. Особливості обміну гідроген сульфіду при захворюваннях нирок…….....	40
1.3. Біохімічні механізми впливу мелатоніну при захворюванні нирок……	46
Висновки до розділу 1……..……...	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	56
2.1. Об’єкт досліджень та їх характеристика…….…….	56
2.2.Гістологічне дослідження нирок за умов нефропатії, викликаної фолієвою кислотою……..	58
2.3. Визначення основних біохімічних показників, що характеризують стан нирок та печінки……..	59
2.4.Визначення стану оксидантно-антиоксидантної системи у крові та печінці……...……	60
2.5. Дослідження стану енергетичного метаболізму у мітохондріальній фракції гепатоцитів……..……...	65
2.6.Визначення показників системи обміну гідроген сульфіду……	68
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОКСИДАНТНО-	71

АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ…….	
3.1. Вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові щурів за умов експериментальної нефропатії…….....	71
3.2. Вплив мелатоніну на стан оксидантної та антиоксидантної систем і рівень гідроген сульфіду у крові щурів за умов експериментальної нефропатії…….	79
Висновки до розділу 3…….	88
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ…….	90
4.1.Вплив мелатоніну на оксидантний стан та енергетичний обмін печінки за умов експериментальної нефропатії……...	90
4.2.Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів за умов експериментальної нефропатії……..	102
4.3.Вплив мелатоніну на систему обміну гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії……...	106
Висновки до розділу 4……...…….……..	111
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ…….	114
ВИСНОВКИ…… ……	131
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	134
ДОДАТКИ……	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

H_2S – гідроген сульфід

CAT– цистеїнамінотрансфераза

CBS – цистатіонін-β-синтаза

CSE – цистатіонін-γ-ліаза

GSH – відновлений глутатіон

3-MP – 3-меркаптопіруват

3-MST – 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза

DAO - оксидаза d-амінокислоти

$O_2^{\cdot -}$ - супероксид-аніон радикал

$OH^{\bullet}$ - гідроксильний радикал

$ONOO^-$ - пероксинітрит

H_2O_2 – гідроген пероксид

GCL – глутаматцистеїнлігаза

GS – глутатіонсинтетаза

Nrf2 – ядерний фактор, пов'язаний з еритроїдом 2, фактор 2

NADPH – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений

GST – глутатіон-S-трансфераза

АФО – активні форми оксигену

GPx – глутатіонпероксидаза

ОМП – окисна модифікація протеїнів

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

ТБК-ап – активні продукти тіобарбітурової кислоти

SOD – супероксиддисмутаза

ФК – фолієва кислота

ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації

ГПН – гостре пошкодження нирок

ХПН – хронічне пошкодження нирок

I/R – ішемія / реперфузія

АЛАТ - аланінамінотрансфераза

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Захворювання нирок – одна з найпоширеніших проблем сучасної медицини. Досить часто ураження нирок є результатом різноманітних захворювань, ускладнює їх перебіг і підвищує ризик смерті пацієнта. Зокрема встановлено, що у хворих на COVID-19 зростає кількість позалегеневих ускладнень різних органів та систем, в тому числі і нирок. Частота гострого пошкодження нирок (ГПН) у пацієнтів, інфікованих COVID-19 складає від 3 до 6%, підвищуючись до 15-58% у хворих, що знаходяться в критичному стані [1]. Також, не менш важливою є зростання у світі захворюваності на цукровий діабет [2], що призводить до формування ускладнень, таких, як діабетична нефропатія та ниркова недостатність [3]. Серед причин хронічного пошкодження нирок у світі на долю цукрового діабету приходиться 30-47% [4].

Останніми роками з’явилося багато доказів того, що окислювальні процеси відіграють ключову роль в розвитку багатьох захворювань. Збільшення кількості активних форм оксигену (АФО) є ключовим фактором молекулярного пошкодження, визначених як окислювальний стрес (ОС). Низькі рівні АФО необхідні для передачі сигналів, проліферації, росту і енергетичного метаболізму клітин. Надмірна їх кількість здатна призводити до запалення, пошкодження та, в кінцевому результаті, загибелі клітин [5]. Оскільки АФО можуть реагувати з ліпідами, білками та ДНК, вони є токсичними молекулами, що призводять до окиснювального пошкодження клітин.

Запалення та ОС взаємопов’язані між собою: окислювальний стрес запускає процес запалення, а запалення, в свою чергу, викликає ОС, за рахунок продукції АФО. Обидва цих фактори викликають пошкодження тканин, індукуючи апоптоз, некроз та фіброз. Продукція АФО з порушенням функціонування антиоксидантного захисту є загальноприйнятими механізмами пошкодження нирок, опосередкованих окислювальним стресом,

що відіграє важливу роль в їх пошкодженні та є потенційною ціллю для терапевтичного втручання.

Механізм пошкодження високими дозами фолієвої кислоти полягає в індукції апоптозу та канальцевого некрозу, з подальшою проліферацією епітелію та розвитком інтерстиційного фіброзу [6-9]. Пошкодження нирок дозволяє припустити, що дані зміни можуть бути викликані як обструкцією канальців кристалами фолієвої кислоти, так і її прямою токсичною дією на епітеліальні клітини канальців [7]. Дані зміни в нирках щурів свідчать про розвиток гострого пошкодження нирок (ГПН) та відтворюють всі основні процеси пошкодження нирок людини [6]. Окрім того, в клініці використання високих доз фолієвої кислоти в поєднанні з протипухлинними препаратами широко використовується для лікування метастатичного раку шлунково-кишкового тракту, що значно збільшує частоту випадків пошкодження нирок, викликаного введенням фолієвої кислоти [6].

ГПН характеризується широким спектром розладів зі зниженням клубочкової фільтрації та позитивними біохімічними маркерами паренхіми нирок, пов’язане з високою захворюваністю та смертністю [10]. Дослідження вчених показали, що відновлення функції нирок у пацієнтів з ГПН часто відбувається не повністю та є критичним фактором розвитку хронічного пошкодження нирок (ХПН) [6, 11]. Окрім того, наявне ХПН значно збільшує ризик нових епізодів ГПН [11]. Механізми прогресування ГПН в ХПН в основу зосереджені на стійкій запальній відповіді, мітохондріальній дисфункції, пошкодженні ендотеліальних клітин мікросудин, а також ниркових канальців. Більше того, ГПН часто викликає гіперплазію фіброзної тканини, викид фіброгенних факторів та фіброз нирок [6, 11].

Як вищезазначено, основою патогенезу ниркової патології є розвиток оксидативного стресу, що супроводжується оксидантно-антиоксидантним дисбалансом, і як наслідок – ураженням печінки. Печінка є ключовим органом та відіграє важливу роль в метаболізмі, оскільки приймає участь в збереженні та регулюванні рівня ліпідів, вуглеводів, в синтезі найбільш

важливих білків та детоксикації токсичних сполук екзо- та ендогенного походження. Саме тому, вона є схильною до окислювальних пошкоджень [12]. Також відомо, що печінка та нирки, є органами, що забезпечують розщеплення сірковмісних амінокислот, тому навіть незначне порушення їхньої функції призводить до вагомих метаболічних змін у організмі.

В останні роки активно вивчається роль гідроген сульфіду в підтриманні окисно-відновного гомеостазу. H_2S належить до групи газотрансміттерів – газоподібних внутрішньоклітинних сигнальних молекул, які виконують специфічні регуляторні функції в клітині та захищає їх від окисного стресу, діючи, як прямий поглинач вільних радикалів, або ж активуючи систему антиоксидантного захисту [13]. H_2S відновлює цистин до цистеїну, цим самим підвищуючи рівень внутрішньоклітинного глутатіону – основного антиоксиданта в клітинному захисті від окисного стресу [14]. Проте, зміни в системі обміну гідроген сульфіду при нефропатії залишаються не достатньо вивченими та є перспективними з ціллю розуміння обміну H_2S, як представника не синаптичного способу міжклітинної комунікації.

Дисбаланс в оксидантно-антиоксидантній системі при захворюванні нирок зумовлюють необхідність пошуку засобів ефективної та безпечної корекції нефропатій різної етіології. Останнім часом мелатонін зацікавив вчених та лікарів як нейроендокринний гормон з антиоксидантними властивостями, найбільша концентрація якого виявлена в мітохондріях [15]. Застосування мелатоніну сприятиме відновленню балансу між продукцією та виведенням АФО, оскільки він відомий як активний перехоплювач вільних радикалів. Окрім того, мелатонін стимулює синтез антиоксидантних ферментів та активує синтез глутатіону [16, 17].

Неухильність прогресу захворювань нирок потребує пригнічення темпів виникнення та розвитку нефропатій, що в певній мірі реалізуватиметься вивченням оксидантного, антиоксидантного стану та обміну гідроген сульфіду при експериментальній нефропатії за умов введення мелатоніну.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планових науково-дослідних робіт кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці) «Стрес-індуковані морфофункціональні та біохімічні зміни структур хроноперіодичної і гепаторенальної систем у ссавців» (№ державної реєстрації 0114U002472) та “Морфофункціональне і біохімічне обґрунтування дисфункцій нейросекреторних структур головного мозку й ендокринних залоз та гепаторенальної системи щурів при експериментальній патології, у віковому аспекті та шляхи її корекції” (№ державної реєстрації 0119U101346).

Авторка є співвиконавицею теми та виконала декілька розділів даної роботи: вплив мелатоніну на оксидантно-антиоксидантну системи та систему енергозабезпечення печінки щурів за умов експериментальної нефропатії; вплив мелатоніну на систему обміну гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії; вплив мелатоніну на оксидантно-антиоксидантну системи та рівень гідроген сульфіду в крові щурів за умов експериментальної нефропатії.

Тему дисертації затверджено Вченою Радою Буковинського державного медичного університету, протокол № 2 від 19 жовтня 2017 року.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з’ясувати особливості функціонування системи гідроген сульфіду, стан системи енергозабезпечення в мітохондріях гепатоцитів, а також оксидантний та антиоксидантний стан печінки та крові за умов експериментальної нефропатії та корекції мелатоніном.

Для досягнення мети було поставлено наступні ***завдання***:

1. З’ясувати вплив мелатоніну на оксидантно-антиоксидантну системи та біохімічні показники в крові щурів при експериментальній нефропатії;
2. Вивчити вплив мелатоніну на оксидантно-антиоксидантний стан печінки (вміст ТБК-активних продуктів, окисномодифікованих білків,

глутатіону, активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази) щурів за умов розвитку нефропатії;

3. Визначити вплив мелатоніну на енергетичний обмін в мітохондріях печінки щурів при нефропатії за активністю ензимів дихального ланцюга (NADH-убіхінон-оксидоредуктази, сукцинатдегідрогенази, цитохром с оксидази, H^+-АТФ-ази);
4. Дослідити вплив мелатоніну на функціонування системи гідроген сульфіду при експериментальній нефропатії за активністю H_2S-генеруючих ензимів: (цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази, цистеїнамінотрансферази);
5. Встановити взаємозв'язок між порушенням обміну гідроген сульфіду та змінами оксидантно-антиоксидантної системи печінки та крові щурів за умов розвитку нефропатії.

Об'єкт дослідження. Стан оксидантно-антиоксидантної системи та системи обміну гідроген сульфіду в печінці та крові щурів за умов розвитку нефропатії та корекції мелатоніном.

Предмет дослідження: 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.

Методи дослідження. У роботі використано біохімічні (центрифугування, спектрофотометричні, фотоколориметричні для визначення активностей ензимів стану антиоксидантної системи, системи енергозабезпечення, концентрації та продукції гідроген сульфіду, ензимів синтезу H_2S, вмісту окисномодифікованих протеїнів, активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активних продуктів), відновленого глутатіону (GSH) - в печінці; вмісту окисномодифікованих протеїнів, концентрації активних продуктів тіобарбітурової кислоти ТБК-активних продуктів), креатиніну, сечовини, загального протеїну, SH-груп, гідроген сульфіду,

активностей γ-глутамілтранспептидази, аланінамінотрансферази та ензимів антиоксидантної системи - у крові щурів), морфологічні та статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі уперше проведено комплексне дослідження оксидантно-антиоксидантного стану, системи енергозабезпечення мітохондрій гепатоцитів, вмісту гідроген сульфіду й H_2S-генеруючих ензимів в нормі та при розвитку нефропатії, що викликана введенням високої дози фолієвої кислоти, а також встановлено вплив мелатоніну на виявлені зміни.

Уперше досліджено функціональний стан системи енергозабезпечення в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією за умов застосування мелатоніну.

Отримано нові наукові дані про вплив мелатоніну на показники обміну гідроген сульфіду. Показано, що мелатонін покращує активність H_2S-генеруючих ензимів в печінці щурів, таким чином підвищуючи вміст гідроген сульфіду в печінці щурів, як за рахунок безпосередньої участі в знешкодженні вільних радикалів, так і за рахунок активації синтезу антиоксидантних ензимів, в тому числі і глутатіону – цистеїнвмісного трипептиду.

Продемонстровано корегуючий вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові за умов розвитку експериментальної нефропатії.

Вперше експериментально обґрунтовано доцільність застосування мелатоніну як безпечного засобу гепатопротекції при нефропатії, індукованій фолієвою кислотою.

Отримані результати досліджень є експериментальним підґрунтям щодо доцільності подальшого вивчення впливу мелатоніну як безпечного та ефективного засобу для профілактики та корекції патології нирок.

Практичне значення одержаних результатів. Результати експериментальних досліджень розширюють уявлення щодо ефекту мелатоніну на розвиток окислювального стресу, антиоксидантну системи крові та печінки,

його корегуючий вплив на систему енергозабезпечення в мітохондріях гепатоцитів та обмін гідроген сульфіду за умов нефропатії, індукованою фолієвою кислотою.

Доведено доцільність застосування мелатоніну як засобу гепато- та нефро-протекції та створює передумови для подальшого вивчення властивостей мелатоніну для профілактики та корекції патології нирок.

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.

Особистий внесок здобувача. Авторка самостійно провела патентно-інформаційний пошук, аналіз літературних джерел за темою дисертаційної роботи, а також змоделювала модель експериментальної нефропатії та виконала всі біохімічні дослідження стану оксидантної та антиоксидантної систем, енергетичної системи гепатоцитів, а також системи обміну гідроген сульфіду в печінці та крові щурів за умов фізіологічної норми та нефропатії, що викликана введенням високих доз фолієвої кислоти. Гістологічні дослідження зрізів нирок виконано спільно із завідувачем кафедри патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету д.мед.наук, професором І.С. Давиденком. Дисертантка разом із науковим керівником сформулювала тему, мету та визначила завдання дослідження, обрала методи дослідження, самостійно виконала експериментальні дослідження, провела статистичну обробку та науковий аналіз отриманих даних. Формулювання висновків здійснено разом із науковим керівником.

Експериментальні дослідження проведено на кафедрах Буковинського державного медичного університету: біохімічні – на кафедрі біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії, математико-статистичні – на кафедрі біологічної фізики та медичної інформатики, морфологічні – на базі

лабораторії кафедри патологічної анатомії.

Авторка самостійно підготувала наукові роботи до друку та написала всі розділи дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на вітчизняних і міжнародних конференціях: 99-ій підсумковій науковій конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці, 2018); науково-практичній конференції з Міжнародною участю «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії» (м. Харків, 2018); XI Parnas Conference - Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Kyiv, 2018); 100-й підсумковій науковій конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченій 75-річчю БДМУ (м. Чернівці, 2019); 101-ій підсумковій науковій конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці, 2020); 102-ій науково-практичній конференції з міжнародною участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці, 2021); науково-практичній конференції з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 3.0» (м. Київ, 2021).

Публікації. Основні наукові положення за темою дисертації опубліковано в 12-ти наукових працях, з них: 5 статей (4 – у фахових журналах України, 1 - закордонна, що індексується у наукометричній базі Scopus), 7 тез доповідей у матеріалах з’їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 166 сторінках (основний її обсяг становить 112 сторінок), складається з таких частин: анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини й обговорення отриманих

результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Робота містить 29 рисунків і 8 таблиць. Список літератури охоплює 216 найменувань, з них кирилицею – 34, латиницею – 182.

РОЗДІЛ 1

СИНТЕЗ І ВЛАСТИВОСТІ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА МЕЛАТОНІНУ ЗА УМОВ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ НОРМИ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЯХ

(огляд літератури)

1.1. Обмін гідроген сульфіду та його взаємозв'язок з оксидантною та антиоксидантною системами

За останнє десятиліття зростає зацікавленість науковців до обміну сірковмісних амінокислот, зокрема метіоніну, цистеїну, гомоцистеїну, а також до обміну гідроген сульфіду (H_2S), який має цитопротекторні властивості, є ендогенним модулятором біологічних функцій організму (рис.1.1.), проявляє судинорозширювальну і нейромодуляторну дії [18]. 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.

H_2S приймає участь в секреції кортикотропін-рилізинг-гормону серотонінергічними нейронами [19], а також в розслабленні гладеньких м'язів [20]. Крім того газотрансмітер захищає нейрони та кардіоміоцити від окислювального пошкодження [19-22]. Гідроген сульфід модулює запалення, пригнічуючи адгезію лейкоцитів та інфільтрацію, а також утворення набряків. H_2S інгібує виділення інсуліну [23], шляхом стимуляції АТФ-чутливих K^+ каналів або ж пригнічуючи коливання внутрішньоклітинних концентрацій Ca^{2+} в β-клітинах підшлункової залози та захищає їх від апоптичної загибелі через високий вміст глюкози. H_2S індукує ангіогенез, що спостерігається при проліферації ендотеліальних клітин, адгезії та формуванні трубчатих структур. H_2S може відновлювати дисульфідний зв'язок цистеїну, змінюючи цим самим конформацію та активність ензимів, каналів та рецепторів, а також модифікувати залишки цистеїну в білках

шляхом сульфгідратації або утворенням трисульфідного містка, модулюючи таким чином їх функцію [19].

За умов температури та тиску навколишнього середовища гідроген сульфід представляє собою безбарвний та легкозаймистий газ з сильним запахом тухлих яєць. Велика кількість H_2S (> 500 ppm) може призвести до смерті людини. H_2S легко розчиняється у воді з розчинністю близько 80 ммоль при 37 ° C та легко дисоціює на H_+, HS_-, і S_{2-}. Проте H_2S є проникним для плазматичних мембран, не потребуючи посередника та є розчинним в ліпофільних розчинниках в п'ять разів краще ніж у воді [22]. У водних розчинах є слабкою кислотою.

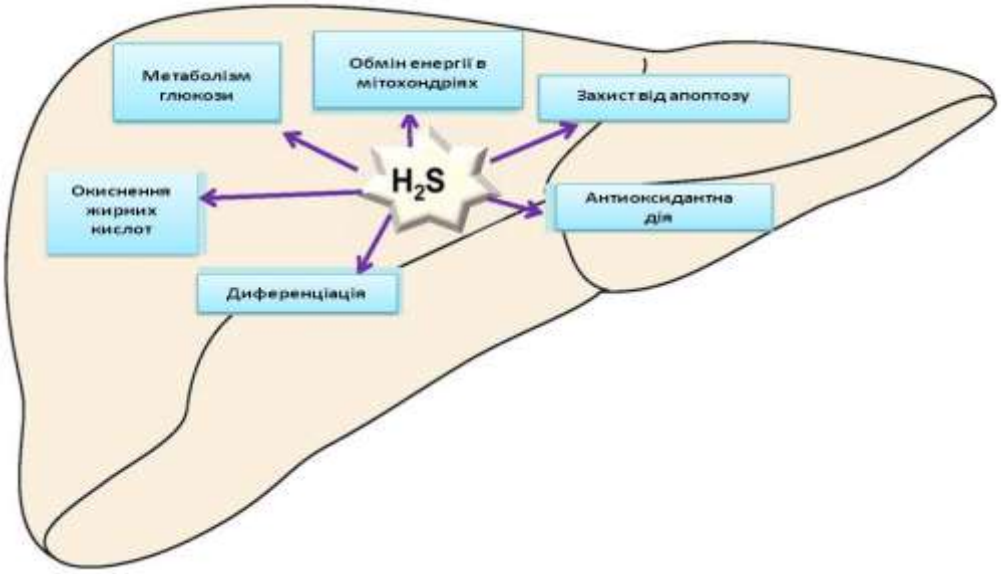

Рис. 1.1. Фізіологічна роль гідроген сульфіду [24]

Печінка відіграє ключову роль в метаболізмі глюкози та ліпідів, антиоксидантному захисті та метаболізмі ксенобіотиків, а також являється основним органом, що приймає участь в продукції та метаболізмі гідроген сульфіду [25]. Зокрема, відомо [18, 26], що основний метаболізм гомоцистеїну, який бере участь у обміні H_2S, відбувається в печінці, а менша частина метаболізується через нирки.

Гідроген сульфід - газотрансмітер та важлива сигнальна молекула, поряд із монооксидом вуглецю (CO) та монооксидом азоту (NO) [27, 28]. Слід

відмітити, що H_2S, як низькомолекулярна ліпофільна газова молекула вільно дифундує через клітинні мембрани, без необхідності використання спеціальних переносників [29]. Він утворюється в результаті різноманітних ензематичних та неензематичних реакцій (рис. 1.2.), а також продукується із внутрішньоклітинних запасів сірки. У випадку використання не ензиматичних систем, персульфіди, тіосульфати та полісульфіди можуть перетворюватися в ендогенний гідроген сульфід в присутності відновлених еквівалентів: нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату ($NADPH^+$) та нікотинамідаденіндинуклеотиду ($NADH^+$), які поставляються шляхом гліколітичного окислення глюкози або із фосфоглюконату через НАДФН-оксидазу. [19, 24, 29]. Реакції глюкози з метіоніном, цистеїном чи гомоцистеїном також призводять до синтезу гідроген сульфіду та метантіолу [19].

Ензиматичний шлях синтезу гідроген сульфіду включає в себе основні ферменти: цистатіонін-γ-ліазу (CSE), цистатіонін-β-синтазу (CBS) та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазу (3-MST) поряд із цистеїнамінотрансферазою (CAT). В процесі ензиматичного шляху CSE та CBS - цитозольні піридоксальзалежні ензими, призводять до утворення гідроген сульфіду з використанням L – цистеїну та гомоцистеїну в якості основних субстратів. 3-MST в якості субстрату використовує 3-меркаптопіруват (3-MP), який генерується CAT із L – цистеїну та α-кетоглутарату в присутності кофакторів тіоредоксину та дигідроліпоєвої кислоти [24, 30, 31]. Більша частина 3-MST локалізується в мітохондріях, оскільки саме там концентрація L-цистеїну в 3 рази вища, ніж в цитоплазмі [21, 24].

Недавніми дослідженнями [32] виявлено ще одне джерело в ензиматичному шляху синтезу гідроген сульфіду. Зокрема, D-цистеїн перетворюється в 3-MP за допомогою оксидази d-амінокислоти (DAO), що розміщується в пероксисомах. Обмін метаболітів між пероксисомами та мітохондріями можуть імпортувати 3-MP в мітохондрії, де в подальшому він

піддасться перетворенню в H_2S за допомогою 3-MST. На сьогоднішній день вважається, що d-цистеїновий шлях синтезу гідроген сульфіду можливий лише в нирках та головному мозку, через виключне розміщення DAO саме в цих органах.

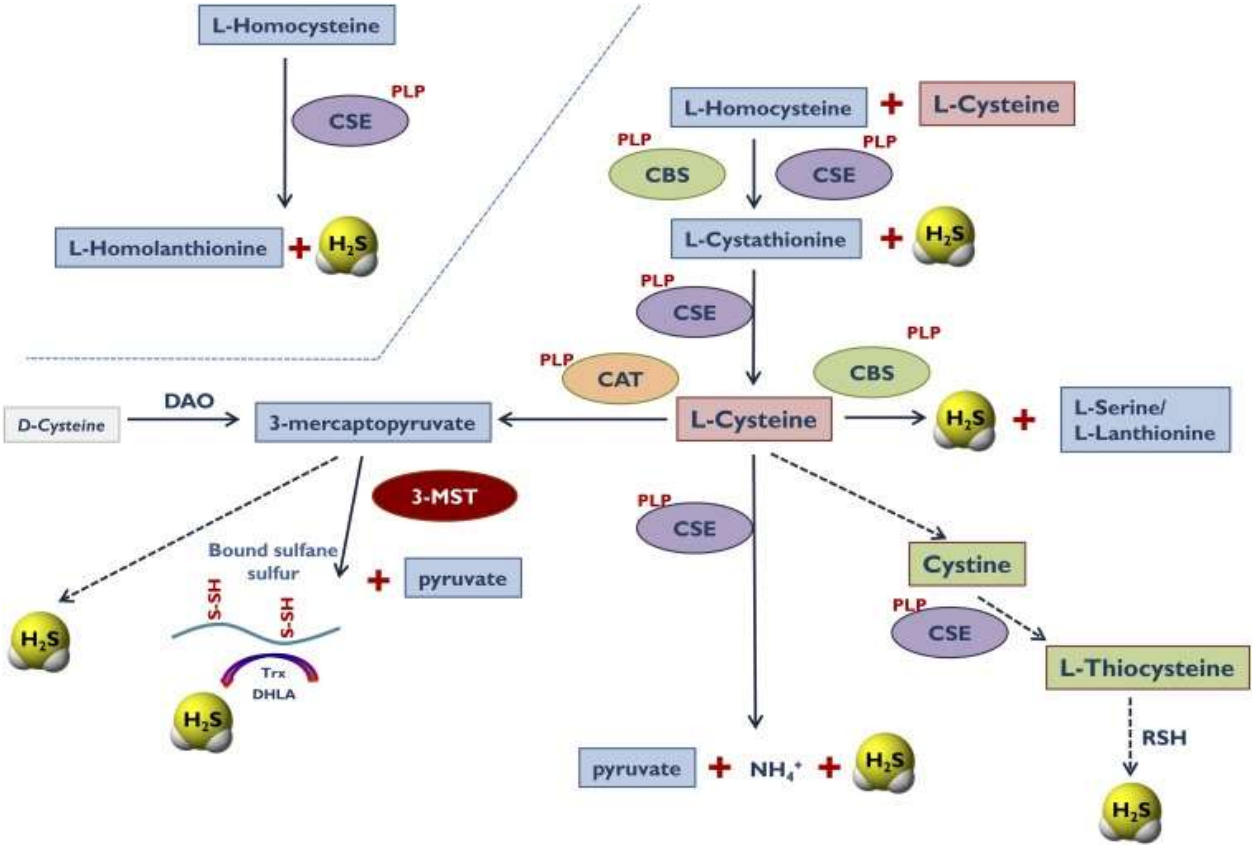

Рис. 1.2. Шляхи синтезу гідроген сульфіду [27]

CBS і CSE мають рівну здатність до виробництва H_2S в печінці [19], хоча CSE більш поширений в печінці, в той час як CBS вносить свій основний вклад у виробництво гідроген сульфіду в нирках та головному мозку. Відомо [21, 29], що на активність CSE впливає внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+}. Зокрема, низькі рівні Ca^{2+} індукують продукцію H_2S за допомогою CSE, тоді як активність цього ензиму пригнічується при підвищенні внутрішньоклітинного Ca^{2+}, навіть в присутності піридоксальфосфату. Рівень гідроген сульфіду по шляху 3MST / CAT також регулюється іонами кальцію.

За їх відсутності продукція гідроген сульфіду максимальна та пригнічується Ca^{2+} в залежності від його концентрації.

Поряд з виробництвом ендогенного H_2S важлива і швидкість його утилізації, оскільки накопичення H_2S призводить до токсичності для організму.

В катаболізмі нейротрансмітера задіяні 3 різні механізми: окислення, метилування та поглинання металопротеїнами. Переважна більшість гідроген сульфіду виводиться нирками у формі сульфата.

Окиснення – найбільш поширена реакція катаболізму H_2S, що відбувається в мітохондріях. В процесі утворення сульфату окислений H_2S з'єднується з іншою молекулою H_2S без присутності ензимів, що призводить до утворення однієї молекули сульфату в мітохондріях [29]. H_2S також може піддаватися окисненню сульфідхінін оксидоредуктазою з утворенням персульфіду, який, в свою чергу, каталізується роданезою в тіосульфат [33, 34]. Подальші перетворення тіосульфату в сульфати або сульфіди відбувається в присутності ензимів, що приймають участь в детоксикації сульфідів, таких як роданеза. Отриманий сульфід швидко окислюється до сульфатів та виводиться з сечею. Однак, слід відмітити, що визначення концентрації сульфату в сечі не являється маркером рівня ендогенного H_2S, оскільки сульфати в сечі можуть з'являтися як результат окиснення L-цистеїну. Хоча окиснення гідроген сульфіду відбувається у всіх клітинах ссавців, передбачається, що первинний сайт цього окиснення знаходиться саме в печінці [35].

На відміну від окиснення, метилування гідроген сульфіду відбувається в цитоплазмі, а не в мітохондріях. В процесі метилування гідроген сульфід перетворюється в метантіол, що далі метилюється в нетоксичний диметилсульфід за допомогою тіол-S-метилтрансферази [14, 29]. Метилування сульфіду в слизовій оболонці кишечника проходить приблизно в 10000 разів повільніше, що свідчить про те, що саме цим шляхом катаболізму утилізуються мінімальні кількості H_2S [29].

Поглинання металопротеїнами включає зв'язування H_2S гемоглобіном з утворенням дисульфідних та металовмісних продуктів [36].

Гідроген сульфід може виділятися в повітря з видихом при надмірному його утворенні. Так, було визначено наявність гідроген сульфіду у видихуваному повітрі при таких патологічних станах, як септичний та геморагічний шок, а також хронічне обструктивне захворювання легень [37, 38]. Наразі залишається невідомим той факт скільки гідроген сульфіду втрачається з диханням в фізіологічних умовах, оскільки його кількості недостатньо для вимірювання.

H_2S захищає клітини від окисного стресу за допомогою 2 механізмів: він або діє як прямий поглинач АФО або ж активує систему антиоксидантного захисту.

Гідроген сульфід відомий, як перехоплювач вільних радикалів, який може безпосередньо реагувати та «гасити» супероксид-аніон ($O_2^{\cdot -}$), пероксінітрит ($ONOO^-$) та інші активні форми оксигену (АФО) [21, 39, 40]. Більше того, гідроген сульфід володіє властивістю захищати клітини від окисного стресу за рахунок своєї здатності підвищувати рівень внутрішньоклітинного глутатіону (GSH) [21, 41]. Вивільнення H_2S в позаклітинний простір викликає відновлення цистину до цистеїну, що призводить до збільшення кількості цистеїну, доступного в якості субстрату для синтезу GSH, а також посилює активність цистин/глутаматного антипортера, тим самим збільшуючи транспорт цистину в клітини [21, 40].

Глутатіон продукується двома ензимами: глутаматцистеїнлігазою (GCL), яка, обмежує швидкість виробництва γ-глутамілцістеїну з глутамату і цистеїну, а також глутатіонсинтетазою (GS), що синтезує глутатіон, шляхом додавання гліцину до γ-глутамілцістеїну. H_2S не впливає на GS, але посилює активність GCL, цим самим збільшуючи внутрішньоклітинну концентрацію γ-глутамілцістеїну. H_2S може активувати деякі рецептори клітинної поверхні, щоб викликати внутрішньоклітинну передачу сигналів, яка активує GCL. Саме завдяки цим ефектам гідроген сульфід збільшує виробництво

глутатіону. Крім того, H_2S посилює перерозподіл GSH в мітохондрії – основне джерело АФО [41]. Відповідно, гідроген сульфід, що утворюється в мітохондріях відіграє важливу роль в консервації клітин в умовах окислювального стресу.

Знижене співвідношення GSH/GSSG зазвичай є показником окислювального стресу. GSH – трипептид, що відіграє важливе значення в клітинному захисті від вільнорадикального ушкодження. Істотна антиоксидантна функція GSH полягає в його здатності регулювати гомеостаз тіолових білків, приймати участь в реакціях детоксикації ксенобіотиків, в якості кофактора в реакціях ізомеризації, а також в зберіганні і транспортуванні цистеїну [41]. У головному мозку GSH є важливим антиоксидантом, який вважається дуже чутливим до порушення рівноваги між антиоксидантною системою і АФО.

Гідроген сульфід володіє властивістю приймати участь в модифікації різноманітних протеїнів, [42, 43], цим самим, сприяючи захисту клітин від пошкоджень, викликаних окислювальним стресом. Одним із основних антиоксидантних шляхів (рис. 1.3.) є шлях Keap1 / Nrf2. Nrf2 – білок, що приймає участь в експресії цитопротекторних генів, зв’язуючись з послідовностями антиоксидантно-чутливих елементів промоторів, захищаючи, таким чином, клітини від окислювального стресу.

В цитоплазмі Nrf2 з’єднується з Kelch-подібним ECH-асоційованим білком 1 (Keap1), який блокує його перенесення в ядро. Зміни окисно-відновного гомеостазу при збільшення рівня АФО призводять до зміни конформації димеру Keap1 через розрив дисульфідних зв’язків між залишками цистеїну з вивільненням Nrf2 та його подальшою транслокацією в ядро [40, 42]. Активація шляху Keap1/Nrf2 призводить до регулювання синтезу основних перехоплювачів АФО, таких як глутатіон та тіоредоксин (Trx-1), а також до транскрипції антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіон-S-трансфераза та глутатіонпероксидаза [40, 44].

Trx-1 – оксидоредуктаза з молекулярною масою 12 кДа, містить в своїй будові дитіол-дисульфідний активний центр, який діє як антиоксидант, полегшуючи відновлення інших білків тіолдисульфідом цистеїну [40]. Приймає участь в проліферації клітин, апоптозі, експресії генів та підтримці окисно-відновного гомеостазу [39, 40].

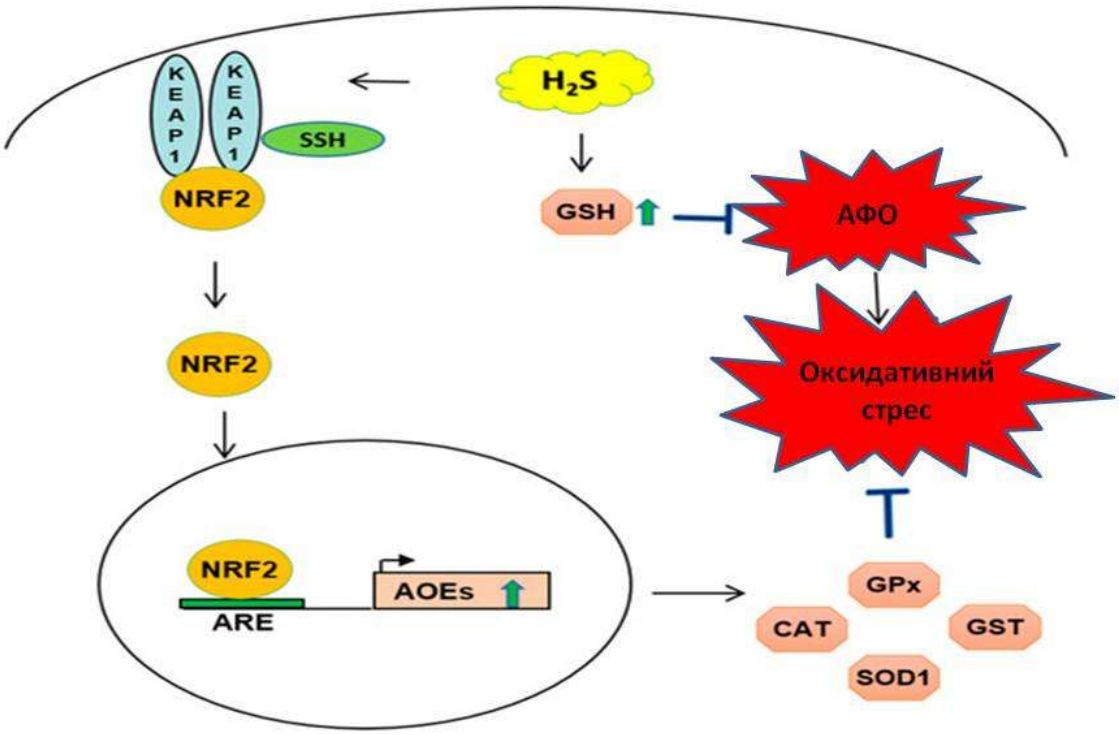

Рис. 1.3. Активація антиоксидантних шляхів гідроген сульфідом опосередкована Keap1 / Nrf2 [40]

Дослідження [45] продемонстрували, що через 30 хвилин після введення гідроген сульфіду Nrf2 накопичується в ядрі серцевої тканини та залишається підвищеним як мінімум протягом 2-ох годин. Крім того, виявлено, що експресія білка гемоксигенази-1 та тіоредоксину 1 також підвищується після введення H_2S. Деякі дослідження демонструють властивість гідроген сульфіду знижувати рівень аутофагії в ендотеліальних клітинах, індуковану високим рівнем глюкози. Введення донора гідроген

сульфіду NaHS захищає ендотеліальні клітини щурів від надмірної аутофагії, викликаної діабетом II типу та послаблює порушення експресії і активності SOD та каталази [46]. Роль Nrf2 в регулюванні оксидативного стресу також підтверджується дослідженням де вживання масла часнику - донора H_2S індукує активацію Nrf2 [47].

При pH 7,4, в нормальних умовах гідроген сульфід присутній в основному у вигляді дисоційованих аніонів (HS^-, S^{2-}) та 20% у вигляді недисоційованих частин. S-сульфгідратація або персульфідування – це посттранляційна модифікація, при якій сульфгідрильна група (R-SH) приєднується до залишків цистеїну протеїнів для регуляції функції білка. Безліч ключових протеїнів піддаються сульфгідратації H_2S, що призводить до модуляції передачі клітинних сигналів, які пов’язані з окислювальним стресом, виживанням/загибеллю клітин, метаболізмом, проліферацією клітин та запаленням [40, 48-50]. Як показують дослідження, S-сульфгідратація є одним із механізмів при якому нейротрансмітер безпосередньо взаємодіє з шляхом Nrf2. Було показано, що сульфгідратація Keap1 гідроген сульфідом по залишку цистеїну-151 призводить до дисоціації NRF2, посилення ядерної транслокації і експресії антиоксидантних генів за допомогою зв'язування з сайтами промоторів [40, 42-44, 51].

H_2S володіє безліччю ефектів в мітохондріях [27, 42, 44]. При низьких концентраціях гідроген сульфід може віддавати електрони на мітохондріальний ланцюг переносу електронів; підтримує мітохондріальні функції, шляхом інгібування мітохондріальних фосфодіестераз цАМФ, а також сприяє репарації мітохондріальної ДНК, шляхом прямої взаємодії з ензимами репарації ДНК. H_2S також може напряму стимулювати активність V комплексу дихального ланцюга (АТФ-синтази) шляхом сульфгідратації. З іншої сторони, при високих концентраціях H_2S пригнічує клітинне дихання, шляхом інгібування IV мітохондріального комплексу дихального ланцюга (цитохром с оксидази), за рахунок реакції з її мідним центром. Цитохром с оксидаза – важливий компонент механізму окисного фосфорилювання в

клітинах. Пригнічення функції цього ензиму призводить до порушення передачі електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій і, відповідно, генерації АТФ.

1.2. Особливості обміну гідроген сульфіду при захворюваннях нирок

Нирки володіють всіма ензиматичними шляхами синтезу гідроген сульфіду, що вказує на велику кількість газової молекули в органі [52]. В дослідженнях [32] показали, що лізат нирок може продукувати в 60 разів більше H_2S при використанні D-цистеїну в якості субстрату, в порівнянні з L-цистеїном.

Повідомляється [53], що в нирках людини CSE локалізується в клубочках та тубулоінтерстиції. Крім того, 75% ниркових клітин та 87% ендотеліальних клітин приймають участь в експресії ензимів. CBS переважно локалізується в проксимальних канальцях нирок [54, 55], тоді як CSE в основному експресується в ниркових клубочках, проксимальних канальцях, інтерстиції та міждолькових артеріях [53, 55, 56]. Зокрема, результати імуногістохімічних досліджень показали [57, 58], що CSE присутній в ендотеліальних та мезангіальних клітинах клубочків, подоцитів, проксимальних та дистальних канальцях, а також в перітубулярних капілярах та кровоносних судинах. Крім того, 3-MST виявляється в епітелії проксимальних канальців нирок. У нормальних умовах експресія білка CSE в нирках в 20 разів вище, ніж CBS, тому CSE вважається основним H_2S - утворюючим ензимом в нирках. Існують дані, що дефіцит гідроген сульфіду та H_2S-продукуючих ензимів може корелювати з важкістю перебігу нефропатії [54].

Особливо цікавий ефект спостерігається в тканинах, що приймають участь в експресії ензимів CSE та CBS. Це пов’язано з переміщенням цих ензимів в мітохондрії, як відповідь на гіпоксію та примусове вивільнення

Ca^{2+} у цитоплазму. Транслокація CSE під впливом іонів кальцію підвищує продукцію АТФ в умовах гіпоксії та нормоксії за рахунок цистеїну. Однак, додаткове додавання H_2S через донорів призводить до зниження синтезу АТФ в умовах нормоксії.

Недавніми дослідженнями показано [59], що перфузія донорів H_2S в умовах нормоксії, призвела до зниження споживання нирками кисню більше ніж на 60% з відповідним зниженням активності мітохондрій. Це передбачає, що продукція АФО знижується за рахунок H_2S-індукованого гіпометаболізму.

В мітохондріях гідроген сульфід взаємодіє з гемовою групою цитохрому с і металічними кофакторами цитохром с оксидази. H_2S здатний віддавати електрони в мітохондріальний ланцюг для синтезу АТФ, шляхом взаємодії з цитохромом с, а також напряму відновлювати комплекс IV, не взаємодіючи з комплексом III [59]. Окрім впливу на продукцію АФО, цитохром с відіграє важливу роль в індукції апоптозу, в який втручається H_2S [42].

В умовах нормоксії молекула газотрансмітера метаболізується в сульфати в присутності кисню. В гіпоксичному стані недостатність кисню призводить до накопичення H_2S, який, в свою чергу, допомагає відновити рівень кисню за рахунок посилення ниркового кровотоку та пригнічення канальцевого транспорту в нирках [52]. Гіпоксія також призводить до системної передачі сигналів від нирок до збільшення кількості червоних кров’яних тілець через еритропоетин [60].

H_2S приймає участь в гомеостазі нирок, підвищуючи швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) та екскрецію іонів натрію і калію, ймовірно, за рахунок пригнічення котранспортера Na-K-2Cl у висхідній частині петлі Генле та Na^+/K^+-АТФ-ази. В недавніх дослідженнях [61] у хворих на хронічне захворювання нирок зменшені рівні газотрансмітера в плазмі крові достовірно корелюють зі зниженням ШКФ, що підтверджує важливість гідроген сульфіду в регуляції діяльності клубочків нирок. Введення амінооцтової кислоти та пропаргілгліцину, які є інгібіторами CBS та CSE

відповідно, перешкоджає нормальному перебігу клубочкової фільтрації за рахунок зменшення вазодилятації прегломерулярних артеріол. Лікування донорами H_2S покращує стан нирок, за рахунок покращення ШКФ [61].

Нирки разом із ренін-ангіотензин-альдостероновою системою приймають участь в регуляції артеріального тиску (АТ) та підтриманні електролітного обміну. Зниження рівня АТ призводить до секреції реніну юкстагломерулярними клітинами нирок та запускає каскад реакцій. Кінцевий продукт цих реакцій - ангіотензин II, полегшує секрецію гормона альдостерону, який сприяє підвищенню артеріального тиску, реабсорбції натрію та виведення калію через Na^+/K^+-АТФ-азу. Лікування синтетичним донором H_2S на основі фосфоротіоата JK-1 пригнічує активацію ренін-ангіотензинової системи, знижує артеріальний тиск та покращує функцію нирок [62]. Також було показано, що введення донора гідроген сульфіду Na_2S значно знижує АТ та брижовий опір, а введення інгібіторів CSE - β-ціаноаланіну та пропаргілгліцину підвищує АТ та резистентність, як в мезентеріальному, так і в нирковому кровообігу [63]. Інший компонент в регуляції АТ – це цГМФ. Шлях NO – цГМФ приймає участь в регуляції АТ шляхом послаблення експресії реніну в нирках та синтезу альдостерона, ангіотензинперетворюючого ензиму і рецептора ангіотензину II першого типу, що, все разом, призводить до зниження АТ [53]. Показано, що лікування NaHS сприяє вивільненню NO та попереджає розпад цГМФ за рахунок інактивації фосфодіестерази 5 типу, цим самим підтримуючи активацію шляху NO – цГМФ [64].

У щурів пригнічення ендогенної продукції NO інгібіторами NO-синтази, такими як метиловий ефір N-1-аргініну, викликає гіпертензію, яка корегується за допомогою NaHS, а також відновлює біодоступність NO [65]. Введення щурам з нормотензією гідроген сульфіду знижує АТ, ефект якого блокується інгібітором NO-синтази. А гіпотензивний ефект у відповідь на введення донора NO – нітропрусиду натрію блокується інгібітором CSE [66].

Ці дані свідчать про можливі перехресні механізми H_2S/ NO при регулюванні АТ.

В розвитку патології нирок розрізняють декілька механізмів, таких як окислювальний стрес, запалення, апоптоз, аутофагія та пошкодження клітин. H_2S приймає участь в регуляції цих механізмів, що дозволяє припустити важливість газотрансмітера при захворюванні нирок [53].

Серед різноманітних патофізіологічних механізмів окислювальний стрес відіграє ключову роль в індукції пошкодження клітин та тканин. Надмірна продукція АФО і пригнічення системи антиоксидантного захисту сприяють подальшому розвитку та прогресуванню захворювання. Вільнорадикальне ушкодження призводить до окислення ДНК, білків та ліпідів, що призводить до пошкодження їх структури та функції.

Одним із основних механізмів, що використовуються для руйнування окислених білків є аденозинтрифосфатнезалежна 20S протеасома протеолітичного шляху убіквітину. Було виявлено, що пригнічення протеасоми 20S сприяє порушенню ниркової функції, посилюючи прогресування гострого пошкодження нирок (ГПН) та їх ішемії/реперфузії [67]. Однак, інфузія NaHS покращує стан нирок за рахунок збільшення експресії протеасоми 20S, яка пригнічує окислення білків, тим самим, знижуючи рівень окислювального стресу [68]. Таким чином, гідроген сульфід може регулювати функцію нирок шляхом деградації убіквітину.

Нирки уразливі для травм в результаті змін системної гемодинаміки та прийому токсичних препаратів. Таким чином, гостре пошкодження нирок проявляється у формі ішемічного / реперфузійного пошкодження або при прийомі нефротоксичних ліків, таких як протипухлинні засоби і антибіотики.

Ішемічне / реперфузійне (I/R) пошкодження нирок характеризується посиленням запалення, окислювальним стресом, апоптозом епітеліальних клітин канальців та дисфункцією судин. Введення донорів газотрансмітера до або після I/R відновлює рівні H_2S-продукуючих ензимів та прискорює відновлення функції нирок [69]. Роль дефіциту H_2S в патогенезі I/R нирок

було продемонстровано шляхом впливу на CSE: введення пропаргілгліцину – інгібітора CSE – значно погіршувало пошкодження нирок [70]. Крім того, варто відмітити що введення мітохондріально направленого донора гідроген сульфіду – AP_{39} пригнічує внутрішньоклітинне утворення АФО, викликане глюкозооксидозою та захищає нирки від пошкоджень, викликаних I/R [71]. Дане дослідження свідчить про важливість газотрансмітера у функціонуванні мітохондрій.

Пошкодження нирок, яке виникає після обструкції сечостатевих шляхів часто являється причиною як гострого так і хронічного пошкодження нирок. Моделювання односторонньої обструкції у щурів шляхом перев'язки сечоводу призводило до запалення та фіброзу ниркової тканини в поєднанні зі зменшеною продукцією H_2S в цій нирці, яке пов'язане зі зниженою експресією CBS [72]. Інфузія NaHS значно зменшувала вищезазначені прояви пошкодження нирок. Експерименти показали, що газотрансмітер пригнічує трансформацію фібробластів в міофібробласти, індуковану трансформуючим фактором росту, забезпечуючи цим самим зменшення фіброзу [72]. Ці спостереження на моделі I/R припускають, що CSE або CBS можуть піддаватися динамічній регуляції в нирках.

Найчастіше, нефротоксичність, викликана лікарськими засобами проявляється некрозом канальців, інтерстиціальним нефритом, кристалічною нефропатією, ангіопатією, змінами клубочкової гемодинаміки, рабдоміолізом та фіброзом. Дані зміни, в кінцевому результаті, призводять до ниркової недостатності. Не дивлячись на численні дослідження в цій галузі нефротоксичність, викликана лікарськими засобами пов'язана з високим рівнем смертності і становить 40-70% у пацієнтів з гострим пошкодженням нирок [73].

Цисплатин – хіміотерапевтичний препарат, що використовується для лікування раку легень, яєчників та шийки матки, однак, є токсичним для нирок. Нефротоксичність цисплатину, ймовірно, пов'язана з виникненням окислювального стресу, оскільки у дослідженнях на моделях тварин вона

може бути знижена за допомогою засобів, що володіють здатністю перехоплювати вільні радикали [73]. У щурів цисплатин викликає запалення мозкового шару нирок та характеризується інфільтрацією макрофагів, нейтрофілів і Т-лімфоцитів. Введення інгібітора синтезу H_2S пропаргілгліцину значно знижує пошкодження нирок, викликане цисплатином [74].

Відомі також дані про пошкодження нирок при цукровому діабеті. Основні механізми розвитку діабетичної нефропатії залишаються невідомими. Однак, вчені припускають, що на його перебіг впливають безліч факторів, таких як окислювальний стрес, метаболічні порушення та гемодинамічні зміни. Пошкодження нирок при ЦД характеризується гіпертрофією, накопиченням білків позаклітинного матриксу, що призводить до фіброзу клубочкових та тубулоінтерстиційних компартментів.

Недавні дослідження показали, що ниркова експресія H_2S-генеруючих ензимів: CBS та CSE знижена у щурів з ЦД 1 та 2 типу [75 - 77]. Інгібування CSE за допомогою пропаргілгліцину імітує пошкодження подоцитів нефрона, яке викликається високим рівнем глюкози [78]. Введення NaHS пригнічувало індуковане ЦД підвищення експресії трансформуючого фактора росту-β, профіброгенного цитокіну, гломерулярне та тубулоінтерстиційне відкладання білків позаклітинного матриксу, оксидативний стрес та протеїнурію, що свідчить про розвиток пошкодження нирок при дефіциті газотрансмітера [75, 76].

Гіпергомоцистеїнемія (ННсу) також розглядається як фактор ризику при різноманітних захворюваннях, включаючи термінальну стадію ниркової недостатності та нейродегенеративні розлади. Гомоцистеїн (Нсу) перетворюється в цистатіонін за допомогою CBS. Таким чином, ННсу виникає або через зниження експресії CBS, або через пригнічення його активності. Підвищені рівні Нсу пригнічують експресію і активність H_2S-генеруючих ензимів, що призводить до значного зниження ендогенного гідроген сульфіду [79]. Було показано, що Нсу покращує реакцію

метилування промотора CSE ДНК-метилтрансферазою, що призводить до репресії транскрипції CSE [80]. Наразі залишається невідомим чи впливає механізм метилування ДНК на експресію CBS та 3-MST.

Окрім пригнічення синтезу H_2S ННсу впливає на судинну сітку, збільшуючи запалення, окислювальний стрес і мітофагію в ендотеліальних клітинах, що призводить до їх дисфункції [81, 82]. Зокрема, в нирках, ймовірно, існує «порочне коло» метаболізму Нсу - зниження функції нирок призводить до підвищення рівня Нсу, що в свою чергу призводить до пошкодження нирок та втрати їх функцій. Хронічна гіпергомоцистеїнемія у щурів пов’язана з гломерулосклерозом і протеїнурією, рівень яких зменшується за допомогою інфузії NaHS [83]. Посилений апоптоз клітин кіркового шару нирок у щурів з ННсу пов'язаний з підвищеною активністю матриксної металопротеїнази-2 і -9. Апоптозні зміни в нирковій тканині пригнічуються NaHS, на основі чого автори зробили висновки, що активація матриксної металопротеїнази бере участь в ремоделюванні судинного русла нирок через дефіцит вмісту H_2S. [83].

1.3. Біохімічні механізми впливу мелатоніну при захворюванні нирок

Мелатонін (N-ацетил-5-метокситриптамін) гормон епіфізу, що синтезується із триптофану, переважно в темний час доби. Вперше був виділений із шишкоподібної залози великої рогатої худоби у 1958 році.

Мелатонін регулює безліч фізіологічних функцій організму (рис.1.4), таких як: цикл «сон-неспання» настрій, апетит, формування пам’яті, безпосередньо діючи на нейрони гіпокампа та відіграє важливу роль в нейрогенезі, нейропротекції, підтриманні оксидантно-антиоксидантного балансу, модуляції серцево-судинної та імунної систем [84]. Нейрогормон володіє прямою антиапоптичною та антиоксидантною дією на органи та

тканини. Також мелатонін пригнічує вивільнення дофаміну в гіпоталамусі та сітківці, приймає участь в процесах старіння та пубертатному розвитку, контролює артеріальний тиск та видалення вільних радикалів. Дисфункція мелатоніну сприяє розвитку багатьох захворювань, таких як циркадіанні розлади, розлади настрою, безсоння, нейродегенеративні захворювання, діабет 2 типу [85]. Мелатонін синтезується, головним чином, шишкоподібною залозою, але він є присутній і в екстрапінеальних ділянках, таких як сітківка ока, залоза Хардера, лімфоцити, шлунково-кишковий тракт, клітини кісткового мозку, тромбоцити та шкіра [86-88]. Припускають, що синтез гормону в екстрапінеальних сайтах не впливає на циркадіанні ритми, а в основному, функціонує як локальний антиоксидант [89, 90].

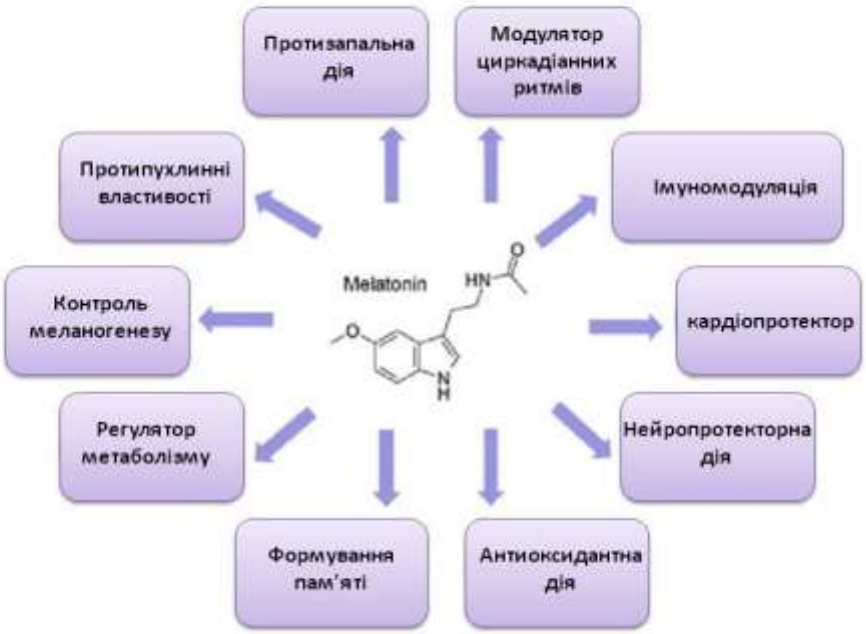

Рис. 1.4. Біологічні ефекти мелатоніну [91]

В своїй будові мелатонін має 2 важливі функціональні групи, які визначають його амфіфільність та специфічність: 5-метоксигрупа та N-ацетильний бічний ланцюг. Завдяки своїй амфіфільності індоламін може

дифундувати та легко долати усі морфофізіологічні бар'єри, такі як плацента та гематоенцефалічний бар'єр [92]. Гормон здатний проникати у всі клітини організму, впливаючи таким чином на їх функцію.

Синтез нейрогормону демонструє чіткий циркадіанний ритм з низьким рівнем в світлий час доби та секреторним піком вночі. Нічний синтез та вивільнення мелатоніну контролюється супрахіазматичними ядрами та пригнічується в умовах освітлення. Світловий стимул активує розпад меланопсину в фоторецептивних гангілозних клітинах сітківки, які через ретиногіпоталамічний шлях пригнічують синтез мелатоніну [93]. Мелатонін в сироватці крові досягає піку (80-150 пг/мл) між 24.00 та 3.00 годинами ночі, в той час як його концентрація протягом дня залишається низькою (10-20 пг/мл) [94]. Як правило, протягом життя рівень мелатоніну значно знижується. Після синтезу гормон не накопичується в шишкоподібній залозі, а потрапляє в системний кровотік та досягає центральних та периферійних тканин-мішеней. В крові мелатонін зазвичай зв'язується з альбуміном, метаболізується до 6- гідроксимелатоніну ізоформами цитохрому Р-450 та піддається подальшій кон'югації в печінці з утворенням кінцевого метаболіту – 6-сульфатоксимелатоніну, що виводится з сечею.

Ефекти нейрогормону залежать від локалізації та типів рецепторів мелатоніну. Він активує два високоафінні рецептори, пов'язані з G-білком – МТ1 та МТ2, які модулюють внутрішньоклітинні концентрації циклічних нуклеотидів (цАМФ, цГМФ) та шляхи їх трансдукції. Рецептори МТ1 експресуються в головному мозку, серцево-судинній та імунній системах, яєчках, яєчниках, шкірі, печінці, нирках, корі наднирникових залоз, плаценті, молочних залозах, сітківці, підшлунковій залозі та селезінці [87, 95-97]. МТ2 виявлений в імунній системі, головному мозку, сітківці, гіпофізі, кровоносних судинах, сім'яниках, нирках, шлунково-кишковому тракті, молочних залозах, жировій тканині та шкірі [96, 97].

МТ1 та МТ2 представляють собою сім трансмембранних білків, володіють високою спорідненістю до зв'язування та активуються навіть при низьких

концентраціях мелатоніну [98]. Існує ще третій сайт зв’язування мелатоніну – МТ3, що за своїм амінокислотним складом ідентичний цитозольному ензиму хінонредуктазі 2, яка каталізує процеси детоксикації високореактивних екзогенних хінонів [99], захищаючи таким чином клітини від окислювального стресу. Крім того, мелатонін являється лігандом для ядерних рецепторів, що відносяться до RZR/ ROR ретиноїдних рецепторів [100] .

Крім того, гормон взаємодіє з внутрішньоклітинними білками, такими як кальмодулін, кальретикулін та тубулін, цим самим протидіючи зв’язуванню Ca^{2+} з кальмодуліном. Ця взаємодія, можливо, залучена в антиоксидантну дію мелатоніну та інші сигнальні процеси [97].

Як правило, основою патогенезу ниркової патології є розвиток оксидативного стресу, що супроводжується оксидантно-антиоксидантним дисбалансом. Окислювальний стрес проявляється неспроможністю антиоксидантного захисту знешкодити вільні радикали, з подальшим розвитком запальної реакції, пошкодженням гломеруло-тубулярних клітин та їх некрозом. Вільні радикали також можуть викликати запальний каскад за рахунок підвищеної експресії мРНК хемоатрактантів і молекул адгезії, таких як ICAM-1, MCP-1 і CSF-1, які проникають в місце пошкодження тканини [73]. Більше того, вільні радикали також діють як посередник, викликаючи активацію фактора транскрипції NF-κB, що здатні переміщатися і зв'язуватися з ДНК, а також активувати транскрипцію протизапальних медіаторів, таких як iNOS, TNF-α, IFN-γ і IL-1 [73] . Було висловлено припущення, що мелатонін обмежує транслокацію і зв'язування NF-κB з його активним сайтом зв'язування P65 на ДНК, тим самим перешкоджаючи подальшому запальному процесу [73]

Окрім своєї дії на запальний процес мелатонін добре відомий як потужний поглинач вільних радикалів та індуктор антиоксидантного ферментативного механізму при окиснювальному стресі. Мелатонін проявляє свою антиоксидантну дію (рис.1.5) через рецептор-опосередковані та

рецептор-неопосередковані взаємодії [73, 85-87, 95]. Рецептор-опосередкована активність мелатоніну пояснюється його здатністю збільшувати стимуляцію і експресію різних антиоксидантних ензимів: супероксидисмутази (SOD), каталази, глутатіон-S-трансферази (GST) та глутатіонпероксидази (GP_x). GP_x використовує відновлений глутатіон в якості субстрату для переносу електронів на H_2O_2, перетворюючи його в дві молекули води, тим самим перешкоджаючи утворенню вільного гідроксильного радикалу через реакцію Фентона. Також мелатонін стимулює активність глутатіонредуктази (GRd) та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6PD) [73]. GRd використовує НАДФН в якості кофактора, рівні якого відновлюються G6PD. Стимуляція активності цих ферментів призводить до відновлення концентрації глутатіону - головного внутрішньоклітинного антиоксиданта.

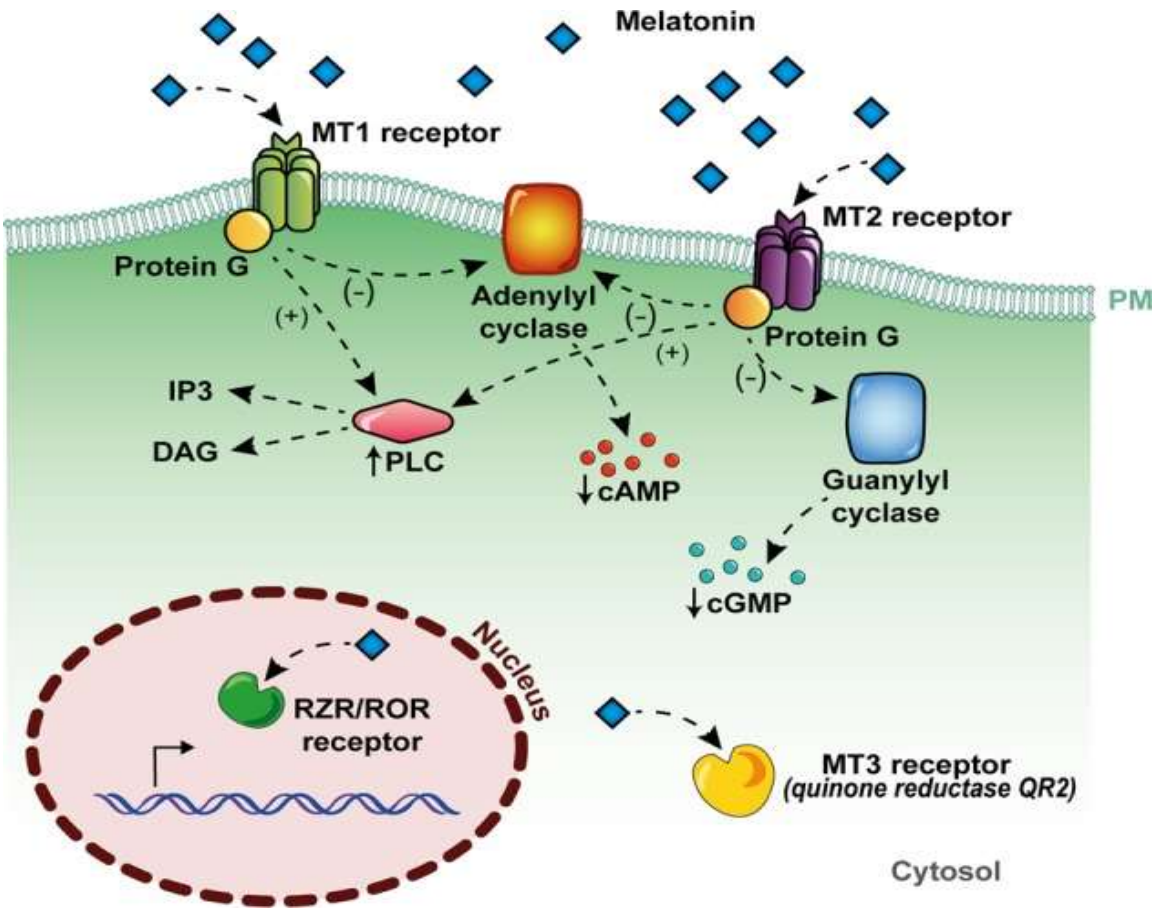

Рис. 1.5. Внутрішньоклітинні вторинні месенджерні системи при дії мелатоніну [93]

Крім того, мелатонін також послаблює ферментативну активність синтетази оксиду азоту (NOS) і вироблення NO, що забезпечує додатковий захист від опосередкованого NO-виробництва більш потужного оксидантного пероксінітриту ($ONOO^-$). [101, 102] Таким чином, мелатонін опосередковує багатогранну стимуляцію антиоксидантних ферментів і підсилює клітинний захист від окиснювального стресу.

Рецептор – незалежні антиоксидантні механізми забезпечують властивість мелатоніну безпосередньо нейтралізувати вільні радикали. В своїй структурі він містить ароматичне індольне кільце, багате на електрони, що робить його потужним донором електронів та призводить до значного зниження окислювального стресу [93].

Досліджено, що мелатонін безпосередньо поглинає вільні радикали, такі як: супероксид-аніон (O_2^-), гідроксильний радикал ($OH^\bullet$), пероксид гідрогену (H_2O_2) та $ONOO^-$. Окрім того, одна молекула мелатоніну здатна одноразово перехоплювати до 10 АФО, в порівнянні з іншими класичними антиоксидантами [103].

O_2^- знешкоджується SOD до H_2O_2, який далі метаболізується до води та кисню, а при взаємодії O_2^- з NO утворюється більш токсичний $ONOO^-$. Крім стимуляції SOD, властивість мелатоніну поглинати O_2^- сприяє перешкоджанню генерації додаткових токсичних вільних радикалів. $OH^\bullet$ – вважається найбільш токсичним і шкідливим електрофілом через його більш високу реакційну здатність.

Окрім того, метаболіти мелатоніну, такі як 3-гідроксимелатонін (3-OHM) та N-ацетил-N-форміл-5-метоксикінурамін (AFMK), що утворюються при безпосередньому знешкодженні вільних радикалів також володіють «радикалоперехоплюючими» властивостями [104]. Отже, здатність мелатоніну приймати участь в знешкодженні вільних радикалів сприяє компенсації клітинного ушкодження в нирках.

Мітохондрії мають вирішальне значення в контролі за метаболізмом та відповідають за виробництво клітинної енергії. Отже, вони відіграють центральну роль в підтримці життєдіяльності клітин і контролюють клітинну смерть. Виробництво енергії у формі АТФ має вирішальне значення для оптимального функціонування клітин. До 95% АТФ, що виробляються в аеробних клітинах, є результатом окисного функціонування мітохондрій.

Досить часто дихальний ланцюг мітохондрій є основним джерелом АФО, які утворюються як побічний продукт переносу електронів [105, 106]. Дисфункціональні мітохондрії призводять до витоку електронів, утворення вільних радикалів та інших токсичних агентів, що в кінцевому результаті призведе до їх молекулярного пошкодження [87]. Підвищена генерація вільних радикалів, підвищена активність мітохондріальної iNOS, підвищена продукція NO, знижена активність респіраторних комплексів, порушення системи транспорту електронів та відкриття пор мітохондріальної проникності (mPTP) – все це фактори, що відповідають за порушення функції мітохондрій [88].

Як показують дослідження [107], в основі розвитку апоптозу лежить активація мітохондріальної пори перехідної проникності (mitochondria permeability transition pore (mPTP)) та утворення в зовнішній мембрані мітохондрій апоптоз-індукованого каналу (mitochondrial apoptosis-induced channel), механізмом виникнення якого є олігомеризація на мітохондріальній мембрані протеїнів Bax і Bak, а стимулом – гіперпродукція активних форм оксигену та роз’єднання процесів дихання та фосфорилювання [93, 108, 109]. Відкриття mPTP – патофізіологічний стан, що викликає збільшення проникності внутрішньої мембрани мітохондрій і призводить до деполяризації, набухання, активації мітохондріальної мембрани і вивільнення протеїнів проапоптотичної дії до цитозолю. З цих причин mPTP розглядається як остання стадія загибелі клітин. Незважаючи на те, що точна структура mPTP, а також його кінетика збірки досі невідомі, цікаві

результати дозволили припустити, що дисоціація димерів F1 та FO АТФ-синтази і пороутворюючих частин відіграють в цьому важливу роль [110].

Здатність мелатоніну накопичуватися в мітохондріях, ймовірно, через переносників GLUT/SLC2A і PEPT1 [111, 112], як показують дослідження, забезпечує захист від набухання мітохондрій і деполяризації мембрани і запобігає вивільненню медіаторів апоптозу, таких як цитохром С та каспази [113, 114], що покращує морфологічні ушкодження в проксимальних канальцях нирок [115].

Більш недавнє дослідження показало, що опосередковане мелатонином інгібування mPTP сильно залежить від рецептора MT1, оскільки мітохондріальні захисні ефекти не проявляються в присутності сполуки лузіндол - агента, що блокує MT [116].

Порушення в системі транспорту електронів призводять до дисбалансу в окисно-відновному гомеостазі та дисфункції мітохондрій, що відіграють важливу роль в патогенезі захворювань нирок [117]. Амфіфільна природа індолу дозволяє йому долати всі морфологічні та фізіологічні бар'єри і дифундувати в різні субклітинні компартменти. Нещодавніми дослідженнями з’ясовано, що мітохондріальні мембрани володіють спеціальними білками-переносниками, які сприяють швидкому поглинанню мелатоніна через органели проти градієнта концентрації [118]. Хоча, деякі автори в своїх роботах припускають, що саме мітохондрії можуть бути первинним сайтом синтезу мелатоніну [119].

Припускаємо, що мелатонін може взаємодіяти з комплексами дихального ланцюга мітохондрій, віддаючи та приймаючи електрони, цим самим покращуючи електронний потік. Його антиоксидантна дія та можлива взаємодія з мітохондріальними комплексами, діючи синергічно, здатна покращувати роботу дихального ланцюга та забезпечувати достатнє виробництво АТФ [118].

Здатність мелатоніну накопичуватися в мітохондріях відіграє важливу роль для лікування патологій, пов’язану з виникненням оксидативного стресу

порівняно з іншими антиоксидантами з поганим проникненням через мембрани мітохондрій.

Мелатонін демонструє функціональну універсальність для захисту морфологічних і функціональних аспектів клітинних мембран, сприяючи перехопленню вільних радикалів, підвищуючи активність антиоксидантних ензимів та оптимізуючи процес переносу електронів через дихальний ланцюг [120].

Перешкоджаючи втечі електронів та утворенні вільних радикалів індол, таким чином, збільшує ефективність дихального ланцюга, стимулюючи комплекс I та IV, які приймають участь в процесах окисного фосфорилювання [120-123]. Безпосередньо приймаючи участь в процесах детоксифікації активних форм оксигену та нітрогену мелатонін збільшує синтез АТФ за рахунок підтримання високих рівнів мітохондріального GSH, захищаючи, таким чином, мітохондріальні білки та ДНК від окислювального пошкодження [101, 120]. Більше того, один із метаболітів мелатоніну – АМК (N1-ацетил-5-метоксиукінурамін) також сприяє підвищенню активності міохондріального комплексу I, підвищуючи продукцію АТФ, за рахунок зниження «втечі» електронів та інгібування відкриття пори переходу мітохондріальної проникності [124].

Мелатонін володіє широким спектром фізіологічних функцій, завдяки своїй здатності легко проникати через біологічні мембрани та проявляти ефекти в кожній клітині організму. Проте, залишаються нез’ясованими всі механізми дії мелатоніну, зокрема, його вплив на систему гідроген сульфіду при нефропатії.

Висновки до розділу 1

В останнє десятиліття багаточисленні дослідження демонструють складну роль гідроген сульфіду в контексті розвитку різноманітних захворювань. Нейротрансмітер приймає участь в регуляції фізіологічних функцій організму, діючи як перехоплювач вільних радикалів, а також,

завдяки своїй будові, стимулює синтез глутатіону – основного внутрішньоклітинного антиоксиданта. Введення H_2S, як потенційного терапевтичного агента може бути застосований при захворюваннях, що викликані змінами клітинного окисно-відновного балансу.

Отже, проведений аналіз літератури свідчить, що процеси синтезу та регуляторний вплив гідроген сульфіду при гострій нефропатії потребує подальшого вивчення. Це стосується не лише ензимів АОС, а й функціонального стану ензимів, що продукують гідроген сульфід.

Через різноманітність захисних механізмів мелатонін широко використовується для лікування різноманітних патологій. Його здатність пом’якшувати рівень окислювального стресу та подальший запальний процес, ймовірно, служить основним механізмом захисту при нефропатіях.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт досліджень та їх характеристика

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконані в 2017–2021 роках відповідно до планових науково-дослідних робіт кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці) «Стрес-індуковані морфофункціональні та біохімічні зміни структур хроноперіодичної і гепаторенальної систем у ссавців» (№ державної реєстрації 0114U002472) та "Морфофункціональне і біохімічне обґрунтування дисфункцій нейросекреторних структур головного мозку й ендокринних залоз та гепаторенальної системи щурів при експериментальній патології, у віковому аспекті та шляхи її корекції" (№ державної реєстрації 0119U101346).

Експериментальні дослідження проведено на 127 нелінійних білих статевозрілих щурах масою 160-180 г. Тварин отримували з віварію Буковинського державного медичного університету. Впродовж місяця до експерименту та під час експериментальних досліджень тварин сформованими групами утримували за умов сталої температури (18-22°C), відносної вологості повітря (50-55%) в окремих обмінних клітках на постійному збалансованому режимі харчування з вільним доступом до води та їжі при стандартному світловому режимі день-ніч. Контроль за ростом і розвитком тварин проводили шляхом зважування їх на початку, впродовж та наприкінці досліду.

Всі дослідження виконано відповідно до положень Директиви Європейського союзу 2010/63 EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях [125]. Дотримання зазначених вимог засвідчено висновком

комісії з питань біоетики Буковинського державного медичного університету (протокол № 2 від 19.10.2017 р.).

2.1.1. Експериментальна модель

Експериментальна частина дисертаційної роботи складалася з трьох етапів дослідження.

Моделювання нефропатії (рис.2.1) здійснювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення фолієвої кислоти (Sigma-Aldrich, США) у дозі 250мг/кг маси тіла [8]. Мелатонін (Sigma-Aldrich, США) вводили інтрагастрально в дозі 10 мг/кг о 8.00 годині щодня, протягом 3-ьох та 7-ми днів.

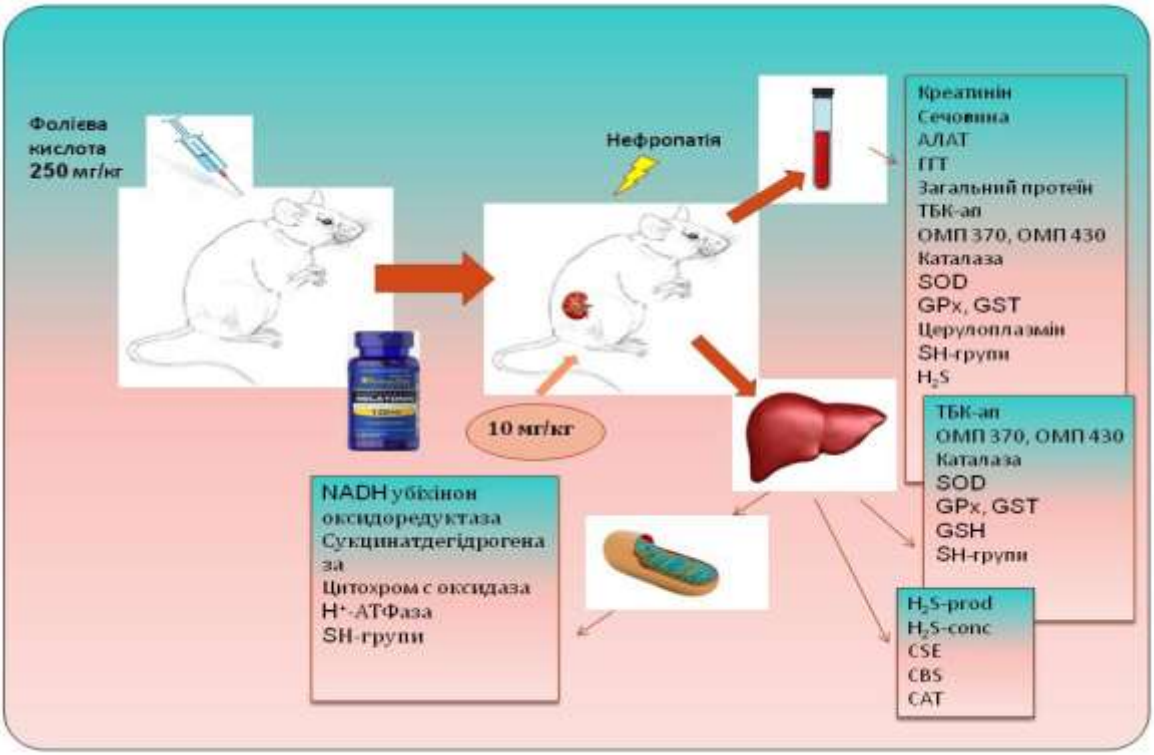

Рис. 2.1. Дизайн дослідження

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.

Тварин виводили з експерименту на наступний день після останнього введення мелатоніну відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту експериментальних тварин (86/609 ЄЄС).

Кров збирали у центрифужні пробірки з гепарином і центрифугували протягом 20 хв при 3000 об/хв, після чого відділяли плазму крові. Печінку обсушували фільтрувальним папером, заморожували і зберігали при -20°С до використання.

Для проведення гістологічного дослідження ділянки нирок, які відбирали для мікроскопії, фіксували впродовж 48 годин у розчині нейтрального забуференого 10% формаліну, після чого проводили процедуру зневоднювання у висхідній батареї етанолу та парафінову заливку при температурі 64˚С.

2.2. Гістологічне дослідження нирок за умов нефропатії, викликаної фолієвою кислотою

Наявність нефропатії підтверджували на базі лабораторії кафедри патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету під керівництвом д.мед.н., проф. І.С.Давиденка методом мікроспектрофотометрії із використанням гістохімічної реакції з бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» протеїни за Mikel Calvo [126, 127].

Введення високих доз фолієвої кислоти сприяло вираженим морфологічним змінам у кірковій речовині нирок щурів. Мікроскопічно спостерігається відкладання кристалів фолієвої кислоти всередині

проксимальних канальців. Найбільш виражені зміни спостерігаються на третю добу нефропатії. Епітелій звивистих канальців з ознаками оборотного набухання клітини. Зокрема, епітелій проксимальних канальців переважно з ознаками вакуольної дистрофії. Показник поширеності альтерації (загибель та атрофія) становить 84,8%. Зростає окислювальна модифікація протеїнів, що підтверджується за допомогою комп'ютерної мікроспектрофотометрії за методом Мікель Кальво (згідно коефіцієнту R/B), а також знижується вміст глікогену.

Механізм пошкодження високими дозами фолієвої кислоти полягає в індукції апоптозу та канальцевим некрозом, з подальшою проліферацією епітелію та розвитком інтерстиційного фіброзу. Пошкодження нирок дозволяє припустити, що дані зміни можуть бути викликані як обструкцією канальців кристалами фолієвої кислоти, так і її прямою токсичною дією на епітеліальні клітини канальців.

2.3. Визначення основних біохімічних показників, що характеризують стан нирок та печінки

Креатинін та сечовина – кінцеві продукти азотистого обміну, що відображають одну із найважливіших функцій нирок – азотовидільну, порушення якої спостерігається при токсичному ураженні нирок. Значне підвищення рівня креатиніну та сечовини в плазмі крові свідчить про погіршення фільтраційної функції нирок, посилення пасивної реабсорбції в ниркових канальцях та порушення здатності нирок виводити з кровотоку продукти азотистого метаболізму.

Визначення концентрації креатиніну проводили кінетичним спектрофотометричним методом аналізу [128] за модифікованим методом Яффе. Суть методу – у здатності креатиніну утворювати із пікриновою кислотою у лужному середовищі забарвлену в оранжевий колір таутомерну форму пікрату креатиніну, що визначається колориметричним способом.

Визначення концентрації сечовини здійснювали ензиматичним уреазним методом, використовуючи реактиви виробництва ПрАТ «Реагент» (Україна).

Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) проводили кінетичним методом [129, 130] без піридоксаль-5-фосфату, що базується на різниці поглинання окисненої та відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотиду.

Активність γ-глутамілтранспептидази (ГГТ) визначали за реакцією швидкості утворення 5-аміно-3-нітробензоата реагентами фірми «Cormay» (Польща).

2.4. Визначення стану оксидантно-антиоксидантної системи у крові та печінці

У крові визначали вміст ТБК-активних продуктів, активність каталази, супероксиддисмутази, аланінамінотрансферази, глутатіонпероксидази, вміст окисномодифікованих протеїнів, креатиніну, церулоплазміну, SH-груп і гідроген сульфіду.

Для визначення стану прооксидантно-антиоксидантної системи тканини печінки подрібнювали ножицями і, використовуючи скляний гомогенізатор, готували 5% гомогенати на 50 мМ трис-HCl-буфері (pH - 7,4), які центрифугували протягом 20 хв при 12000 g (центрифуга Z326 K). Всі операції проводили при температурі не вище +4°С. У постмітохондріальному супернатанті гомогенатів печінки визначали біохімічні показники: вміст ТБК-активних продуктів, окиснювальномодифікованих протеїнів та активність антиоксидантних ензимів печінки: каталази, SOD, GP_X. Для визначення відновленого глутатіону тканину печінки гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері (pH 6,8) у співвідношенні 1:4 (маса/об’єм).

Визначення продуктів окисно-модифікованих протеїнів (нейтрального ($ОМП_{370}$) та основного ($ОМП_{430}$) складу. Принцип методу

ґрунтується на здатності радикальних залишків аліфатичних амінокислот утворювати альдегідні і кетонні групи, які взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Оптичну густину проб вимірювали на спектрофотометрі. Альдегідо- та кетопохідні нейтрального характеру реєструють при довжині хвилі 370 нм, основного – при 430 нм [131].

Реакційне середовище містило: 0,8 мл 0,9%-го розчину NaCl, 0,2 мл сироватки крові або гомогенату печінки, 1 мл 1 М розчину 2,4-ДНФГ і 1 мл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти (ТХО). В контрольні проби замість 2,4-ДНФГ додавали 1мл 2М розчинухлоридної кислоти. Після інкубації (1 год при 37^0 С), суміш центрифугували при 1800g впродовж 10-ти хв, а отриманий осад тричі промивали 5%-вим розчином ТХО. До одержаного осаду додавали 5 мл 8М розчину сечовини, проби витримували на водяній бані до повного розчинення осаду.

На основі молярного коефіцієнта екстинкції ($2,1 \times 10^4 \cdot M^{-1} \cdot см^{-1}$), знаходили вміст фенілгідразонів нейтрального та основного характеру при 370 і 430 нм, який виражали в одиницях оптичної густини (одиницях абсорбції) на г протеїну (мкмоль/г протеїну).

Визначення вмісту ТБК-активних продуктів. Принцип методу ґрунтується на реакції між малоновим альдегідом та тіобарбітуровою кислотою, яка при високій температурі та кислому pH проходить із утворенням забарвленого в червоний колір триметинового комплексу з максимумом поглинання при довжині хвилі 532нм [132].

Вміст ТБК-активних продуктів у постмітохондріальному супернатанті гомогенатів тканин печінки визначали таким чином: до 1 мл 10% гомогенату тканини додавали 1,5 мл H_2O, 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти, 0,2 мл 5 мкМ $FeSO_4$ х 7 H_2O, 0,3 мл 60% трихлороцтової кислоти і витримували на киплячій водяній бані 10 хв. Проби охолоджували, центрифугували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 532 нм.

Кількість продуктів розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції 1,56 х 10^5 $М^{-1}см^{-1}$. Результати виражали в мкмоль/г тканини печінки.

Хід визначення ТБК-активних продуктів в еритроцитах: у центрифужну пробірку вносили 1,3 мл дистильованої води, 0,2 мл розчину $FeSO_4$ х 7 H_2O (139 мг в 100 мл H_2O) і 0,2 мл еритроцитів тричі відмитих в ізотонічному розчині NaCl. Перемішували скляною паличкою і через 10 хв вносили 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти. Проби перемішували скляною паличкою, через 5 хв вносили 0,3 мл 60% трихлороцтової кислоти та кип'ятили на водяній бані 10 хв. Проби охолоджували, центрифугували при 3000 об/хв 10 хв та визначали оптичну густину при 532 нм.

Розрахунки вмісту ТБК-активних продуктів проводили з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції 1,56 х 10^5 $М^{-1}см^{-1}$ і виражали в нмоль/мл еритроцитів.

Визначення вмісту відновленого глутатіону. Для визначення вмісту відновленого глутатіону використовували метод, принцип якого заснований на взаємодії GSH із 5,5'-дитіобіс 2-нітробензойною кислотою (реактив Елмана) з утворенням аніону 2-нітро-5-тіобензоату жовтого кольору, кількість якого прямопропорційна вмісту SH-груп. Збільшення концентрації жовтого аніону в ході даної реакції реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм [133].

Концентрацію GSH в печінці визначали з використанням 5,5'-дитіобіс 2-нітробензойної кислоти по модифікованому методу [134]. Для цього у пробірку вносили 0,6 мл гомогенатів тканин печінки, до якого додавали 0,2 мл 20% розчину сульфосаліцилової кислоти. Проби центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв, після чого 0,2 мл супернатанту переносили в пробірки, що містили 2,25 мл 0,1М трис-HCl-буфера (pH 8,5) з 0,01 ЕДТА. До отриманої суміші додавали 25 мкл розчину реактиву Елмана. Після забарвлений розчин спектрофотометрували при довжині хвилі 412 нм. Вміст GSH виражали в нмоль/мг тканини печінки.

Визначення вмісту SH-груп проводили за методикою, розробленою І.Ф. Мещишеним та Н.П. Григор'євою [135]. Принцип методу полягає у взаємодії 5,5'-дитіобіс 2-нітробензойної кислоти з вільними SH-групами.

В хімічну пробірку вносили 0,2 мл плазми, 0,1 мл 1н NaOH (старанно перемішували скляною паличкою), 3,7 мл 0,2 М фосфатного буфера pH=8,0 та 0,1 мл реактиву Елмана. Через 10 хв проби спектрофотометрували при 412 нм проти контролю, в який, на відміну від дослідної проби, замість досліджуваного матеріалу вносили 0,2 мл води.

Отримані результати виражали в мкмоль/мл у плазмі крові, а у мітохондріях гепатоцитів – нмоль/мг протеїну.

Церулоплазмін [КФ 1. 16.3.1]. Принцип методу базується на здатності *п*-фенілендіаміну за участі церулоплазміну окиснюватись з утворенням забарвленої сполуки рожевого кольору. Кількість церулоплазміну пропорційна інтенсивності забарвлення.

Дослідженню піддавали сироватку крові. У дві пробірки внесли по 0,1 мл сироватки. В контроль вносили 1 мл 0,5% розчину гідроксиламіну солянокислого для інактивації ензиму. В обидві пробірки додавали по 8 мл 0,4М розчину ацетатного буфера (pH 5,5) і 1 мл *п*-фенілендіаміну. Проби інкубували при t 37°С впродовж 1 год. Потім у дослідну пробу додавали 1 мл солянокислого гідразину. За величиною оптичної густини утворених продуктів, яку вимірювали при довжині хвилі 530 нм судили про концентрацію церулоплазміну, яку визначали модифікованим методом Ревіна [136] та виражали в мг/л плазми крові.

Визначення активності супероксиддисмутази (SOD) [КФ 1.15.1.1].

Метод визначення супероксиддисмутазної активності базується на здатності SOD конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми NADH та феназинметасульфату [137, 138]. У результаті цієї реакції нітротетразолій піддається відновленню з утворенням гідразинтетразолію. У присутності SOD відсоток відновлення нітротетразолію зменшується.

В інкубаційне середовище (4 мл) додавали 3,35 мл 16,5 мМ пірофосфатного буферу (рН 8,4), 0,2 мл нітротетразолію синього (1мг/мл), 0,2 мл феназінметасульфату (40 мкг/мл) і 0,05 мл досліджуваного матеріалу. Реакцію запускали 0,2 мл НАДН (1,4 мг/мл). Оптичну густину розчину вимірювали через 10 хв на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм. Паралельно проводили реакцію з холостою пробою (не містить супернатанту) і з пробою на реактиви (не містить НАДН).

Активність ензиму у постмітохондріальному супернатанті гомогенатів печінки виражали в одиницях активності, розрахованих на 1 мг протеїну; в гемолізаті крові – в одиницях активності, розрахованих на г Hb крові**.** Одна одиниця активності ензиму відповідає 50% гальмуванню реакції відновлення нітротетразолію за 10 хв.

Визначення активності каталази [КФ 1.11.1.6]. Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H_2O_2. Кількість незруйнованого гідроген пероксиду вимірювали за допомогою молібдату амонію, який з гідроген пероксидом утворює стійкий забарвлений комплекс жовтого кольору [139].

До складу інкубаційного середовища входило: 2мл 0,05М тріс-HCl-буфера (рН 7,5), 0,03% розчин H_2O_2, 0,1 мл крові (1:10). Через 10 хв у проби вносили 1 мл 4% амоній молібдату для зупинки реакції та вимірювали оптичну густину проти контролю (вміст інкубаційного середовища такий же, але замість досліджуваного матеріалу додавали 2 мл дистильованої води).

Активність ензиму в гемолізаті крові виражали в мкмоль H_2O_2/хв × л.

Визначення активності глутатіонпероксидази [КФ 1.11.1.9]. Про глутатіонпероксидазну активність в центрифугатах гомогенатів тканин печінки та в гемолізатах крові (1:20) судили за кількістю окисненого глутатіону, що утворився з відновленого глутатіону при знешкодженні пероксиду водню в глутатіонпероксидазній реакції.

До складу реакційної суміші входили: 2,7мл трис-HCI буферу (50 мМ, рН 7,4; азид натрію 12мМ; ЕДТА 6мМ), 0,1 мл 2,5мМ відновленого

глутатіону, 0,1 мл досліджуваного матеріалу. Проводили преінкубацію 10 хв. Реакцію запускали додаванням у проби 0,1 мл 0,5мМ пероксиду гідрогену і зупиняли через 5 хв додаванням 1 мл 10% ТХО. У контрольну пробу ТХО вносили одразу після преінкубації. Після центрифугування при 1800 g протягом 15-ти хв визначали оптичну густину окисненого глутатіону при довжині хвилі 262 нм на спектрофотометрі [140,141].

Активність ензиму в гомогенатах виражали в нмолях утвореного окисненого глутатіону на мг протеїну за хв. В крові активність ензиму виражали в нмолях утвореного окисненого глутатіону на мг Hb крові за хв.

Визначення глутатіон-S-трансферазної активності [КФ 2.5.1.18]. Активність ензиму визначали у постмітохондріальному супернатанті гомогенатів тканин печінки. Методика полягає в спектрофотометричному вимірюванні кількості кон'югату відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який утворився під дією ензиму [142].

До складу реакційної суміші входили: 4,7 мл 0,1 М фосфатного буферу (pH 7,4); 0,1 мл 0,1 М 1-хлор-2,4-динітробензолу; 0,02 мл гомогенату печінки. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл 10 мМ відновленого глутатіону. Оптичну густину утвореного комплексу визначали впродовж наступних 3 хв на спектрофотометрі при довжині хвилі 346 нм і виражали в нмолях кон'югату за 1 хв на 1 мг протеїну.

2.5. Дослідження стану енергетичного метаболізму у мітохондріальній фракції гепатоцитів

Виділення мітохондріальної фракції гепатоцитів проводили за методом [143]. Печінку промивали охолодженим 0,9% розчином KCl (2-4°C), подрібнювали і гомогенізували у буфері (pH 7,4), який містив 250 ммоль/л сахарози, 25 ммоль/л трис-HCl та 1мМ ЕДТА. Гомогенат центрифугували при 700 g протягом 10 хв (4°C), а супернатант – при 11 000 g протягом 20 хв (4°C), використовуючи центрифугу HERMLE Labortechnik. Осад

ресуспендували в 5 мл того ж буфера (без EDTA) і знову центрифугували при тих же умовах.

Отриманий осад (мітохондріальну фракцію) одразу використовували для дослідження ензиматичної активності дихального ланцюга.

Визначення NADH-дегідрогеназної активності мітохондрій проводили спектрофотометричним методом [144]. В пробірки, які містили 2 мл 0,02 М трисфосфатного буфера (pH 7,4) додавали 0,02 мл мітохондріальної фракції та 100 мкМ NADH. NADH-дегідрогеназну активність визначали за швидкістю окиснення NADH, що реєстрували при довжині хвилі 340 нм за зменшенням оптичної густини протягом 2 хв з інтервалом 20 с.

Активність NADH-дегідрогенази розраховували з урахуванням молярної екстинкції 6,22•103 М-1•см-1.

Визначення сукцинатдегідрогеназної активності. Принцип методу полягає у відновленні ферицианіду калію (К3[Fe(CN)6]), розчин якого має жовте забарвлення, до безбарвного фероцианіду калію (К4[Fe(CN)6]) сукцинатом під дією сукцинатдегідрогенази [КФ 1.3.99.1]. Активність ензиму пропорційна кількості ферицианіду.

В центрифужні пробірки вносили по 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,8) та по 0,1 мл розчинів 0,1 бурштинової кислоти, 25 мМ ЕДТА, 150 мМ азиду натрію і дистильованої води. До проб додавали по 0,5 мл суспензії мітохондрій, попередньо обробленої 0,1% розчином тритону Х-100, і протягом 5 хвилин інкубували при кімнатній температурі. Реакцію розпочинали додаванням до проб 0,1 мл розчину 25 мМ ферицианіду калію. Проби інкубували протягом 15 хвилин при 30°С. Після інкубації реакцію зупиняли додаванням в проби по 2 мл 20% ТХО.

Контрольні проби готували аналогічно до дослідних, лише ТХО в пробірки вносили перед суспензією мітохондрій. Після охолодження проби центрифугували при 2000 g протягом 15 хвилин для осадження денатурованого мітохондріального білка. Супернатант фотометрували при

420 нм. Оптичним контролем слугувала суміш 20% ТХО і 0,1 М фосфатного буфера (1:1). Для визначення вмісту ферицианіду в пробах використовували калібрувальний графік, побудований за результатами фотометрування проб, які містять від 100 до 1000 мкг ферицианіду в 4 мл розчину. За різницею екстинкцій розраховували кількість ферицианіду, відновленого за час інкубації [145].

Сукцинатдегідрогеназну активність розраховували в нмоль сукцинату/хв на 1 мг протеїну.

Визначення цитохромоксидазної активності мітохондрій. Принцип методу базується на здатності цитохромоксидази [КФ 1.9.3.1] окислювати диметилпарафенілдіамін та α-нафтол (реактив НАДН). При окисленні утворюється кольоровий продукт – індофеноловий блакитний, концентрація якого пропорційна цитохромоксидазній активності [146].

В пробірки вносили по 1 мл субстрату реакції (α-нафтолу, парафенілдіаміну та карбонату натрію у співвідношенні 1:1:1). До реакційної суміші додавали по 0,1 мл суспензії мітохондріальної фракції (в контроль – 0,1 мл H2O). Інкубували при 37°С 30 хвилин. Після інкубаціїдодавали в кожну пробірку по 3 мл спирту. Проби центрифугували 10 хвилинпри 6000 g. Надосадову рідину спектрофотометрували при λ 550 нм.

Результати виражали в нмоль/хв на 1 мг протеїну.

H^+-АТФ-азну активність мітохондрій [КФ 3.6.1.3] визначали у інкубаційному середовищі об’ємом 2 мл, яке містило 400 мкмоль трис-HCI (pH 7,4), 5 мкмоль динатрієвої солі АТФ, 7,5 мкмоль $MgSO_4$, 5·10-2 мкмоль 2,4 динітрофенолу, 7,5мкмоль $CaCl_2$, 120 мкмоль NaCl, 20 мкмоль KCl [147]. Реакцію розпочинали додаванням 50 мкл суспензії мітохондрій, яка містила 1 мг білка, інкубували 15 хвилин при 37°С. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10% ТХО.

Вміст Pi визначали колориметрично [146]. Про H^+-АТФ-азну активність судили за накопиченням неорганічного фосфату і виражали в нмоль Pi за 1 хв на 1 мг протеїну.

2.6. Визначення показників системи обміну гідроген сульфіду

Визначення вмісту H_2S у плазмі крові. Вміст H_2S визначали спектрофотометричним методом, що ґрунтується на реакції між сульфід-аніоном та кислим розчином N,N-диметил-*n*-фенілендіаміну у присутності хлориду заліза (III) [148]. В пробірку, до 0,1 мл плазми додавали 0,5 мл 1% ацетату цинку і 2,5 мл дистильованої води. Потім вносили 0,5 мл 20 мМ N,N-диметил-*n*-фенілендиамину в 7,2 М HCl і 0,4 мл 30 мМ $FeCl_3$ в 1,2 М HCl. Суміш інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Після інкубації протеїни в плазмі осаджували 1 мл 10% трихлороцтової кислоти з подальшим центрифугуванням. Оптичну густину надосадової рідини вимірювали при довжині хвилі 670 нм на спектрофотометрі проти контрольної проби, в якій замість плазми крові брали 0,1 мл води. Вміст сульфід-аніону в пробі розраховували за калібрувальним графіком. Стандартом слугували водні розчини Na_2S х $9H_2O$ (Sigma, США) з концентрацією 31,2-3120 мкМ.

Вміст H_2S в плазмі крові виражали в нмоль/мл.

Для визначення показників системи гідроген сульфіду у печінці (концентрації та продукції H_2S, активності ензимів CSE, CBS та CAT) тканину гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері (pH 6,8) у співвідношенні 1:4 (маса/об'єм). Отримані гомогенати печінки центрифугували при 12000 g протягом 20 хв при температурі 4 °C.

Визначення концентрації та продукції H_2S у печінці. Для вимірювання концентрації H_2S відбирали 200 мкл гомогенатів тканин і додавали в центрифужні пробірки, що містили 1% ацетат цинку для уловлювання H_2S. Через 5 хв реакцію зупиняли додаванням 400 мкл N, N-диметил-*n*-фенілендіаміну (20 мкМ у 7,2 М HCl) і 400 мкл $FeCl_3$ (30 мМ 1,2

М HCl). Після того, як суміш інкубували у темряві протягом 20 хв, додавали 300 мкл 10% трихлороцтової кислоти для осадження протеїнів, які можуть бути присутні в гомогенатах тканин. Потім суміш центрифугували при 10,000 g протягом 10 хв. H_2S у гомогенатах тканин, взаємодіє з N,N-диметил-*n*-фенілендіаміном з утворенням метиленового синього, оптичну густину отриманого розчину визначали спектрофотометрично при 670 нм.

Концентрацію H_2S у гомогенатах тканин обчислювали на основі калібрувальної кривої стандартних розчинів H_2S. Концентрацію H_2S виражали в нмоль/мг тканини печінки.

Для визначення продукції H_2S у пробірки, що містили реакційну суміш (100 мМ калій-фосфатний буфер (pH 6,8), 10 мМ L-цистеїн, 2 мМ піридоксаль 5'-фосфат і 10% гомогенат тканин печінки), вносили 0,5 мл 1% ацетату цинку, накривали фільтрувальним папером (2 × 2 см), попередньо зануреним в рідкий азот та інкубували при 37°C протягом 90 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 50% трихлороцтової кислоти і інкубували при 37°C протягом ще 60 хв. До вмісту пробірок додавали 3,5 мл води. Потім вносили 0,5 мл 20 мМ N, N-диметил-*n*-фенілендіаміну в 7,2 М HCl і 0,5 мл 30 мМ $FeCl_3$ в 1,2 М HCl. Через 20 хв вимірювали поглинання при 670 нм з допомогою спектрофотометра [149, 150].

Рівень продукції H_2S виражали в нмолях H_2S на мг протеїну за хв.

Визначення активності H_2S синтезуючих ензимів цистатіонін-γ-ліази [КФ 4.4.1.1], цистатіонін-β-синтази [КФ 4.2.1.22] і цистеїнамінотрансферази [КФ 2.6.1.3]. До 50 мкл надосадової рідини гомогенатів тканин печінки додавали 2 мл 0,25 М Трис HCl (pH 8,5), 1 мл піридоксаль-5-фосфату і 1 мл H_2O. Для визначення активності ензимів використовували інкубаційні середовища. Для ензиму CSE, реакційна суміш містила 1 мл 20 мМ гомоцистеїну, для CBS 1 мл 20 мМ L-цистеїну, для CAT 1 мл α-кетоглутарату. Суміш інкубували при 37°C протягом 30 хв в пластикових пробірках, закритих парафільмом. Реакцію зупиняли додаванням 1% ацетату цинку для зв’язування H_2S, після чого додавали 10%

ТХО для осадження протеїнів. Далі в реакційну суміш вносили N, N-диметил-*n*-фенілендіаміну в 7,2 М HCl відразу ж з подальшим додаванням $FeCl_3$ в 1,2 М HCl. Оптичну щільність отриманого розчину вимірюють при 670 нм [149]. Активність H_2S синтезуючих ензимів виражали в нмолях H_2S на мг протеїну за хв.

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [151]. Принцип методу ґрунтується на утворенні біуретового комплексу, який у присутності реактиву Фоліна дає синє забарвлення, інтенсивність якого прямопропорційна вмісту протеїну. Визначення проводили за набором для визначення вмісту протеїну за методом Лоурі фірми SIMKO Ltd, Україна.

Усі вимірювання проводили на спектрофотометрі Agilent Cary 60.

У роботі використані нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (окиснена форма), глутатіон (окиснений і відновлений), тріс-гідроксиметиламінометан, L-цистеїн, L-цистин, D,L-гомоцистеїн, L-цистатіонін, α-кетоглутарат, дитіотрейтол, піридоксальфосфат і L-серин, сульфід натрію, N,N-диметил-n-фенілендіамін (Sigma-Aldrich, США), набір для визначення протеїну (SIMKO Ltd, Україна), набір виробництва ПрАТ «Реагент» (Україна) для визначення сечовини, набір для визначення ГГТ фірми «Cormay» (Польща).

Інші використані реактиви – вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч. чи ч.д.а.

Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп’ютерів *Microsoft Excel* за допомогою непараметричного критерія Вілкоксона [152]. Усі дані представлено у вигляді середня ± стандартна помилка середньої (M±m).

Результати вважалися достовірними при $p<0,05$.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ

Окиснювальний стрес залучений в патогенез різноманітних захворювань нирок та характеризується підвищенням внутрішньоклітинного рівня АФО, що відіграє важливу роль в пошкодженні нирок та є потенційною ціллю для терапевтичного втручання. Надмірна їх кількість здатна призводити до запалення, пошкодження та, в кінцевому результаті, загибелі клітин [5]. Оскільки АФО можуть реагувати з ліпідами, білками та ДНК, вони є токсичними молекулами, що призводять до окиснювального пошкодження клітин.

Еритроцити володіють потужнішою антиоксидантною системою, ніж інші клітини організму, оскільки їх функціональна роль пов’язана з транспортуванням оксигену з легень до тканин. В процесі транспортування еритроцити піддаються впливу АФО, що значно пошкоджують їх структуру та функціональну здатність [153].

Завданнями цього розділу було вивчення впливу мелатоніну на стан біохімічних показників, оксидантну та антиоксидантну системи і рівень гідроген сульфіду в крові щурів при експериментальній нефропатії.

3.1 Вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові щурів за умов експериментальної нефропатії

Гістологічний аналіз нирок щурів показав, що контрольні тварини мають типову морфологічну організацію ниркової тканини (рис. 3.1). У кірковій речовині ниркові клубочки звичайної будови, епітелій звивистих канальців без змін.

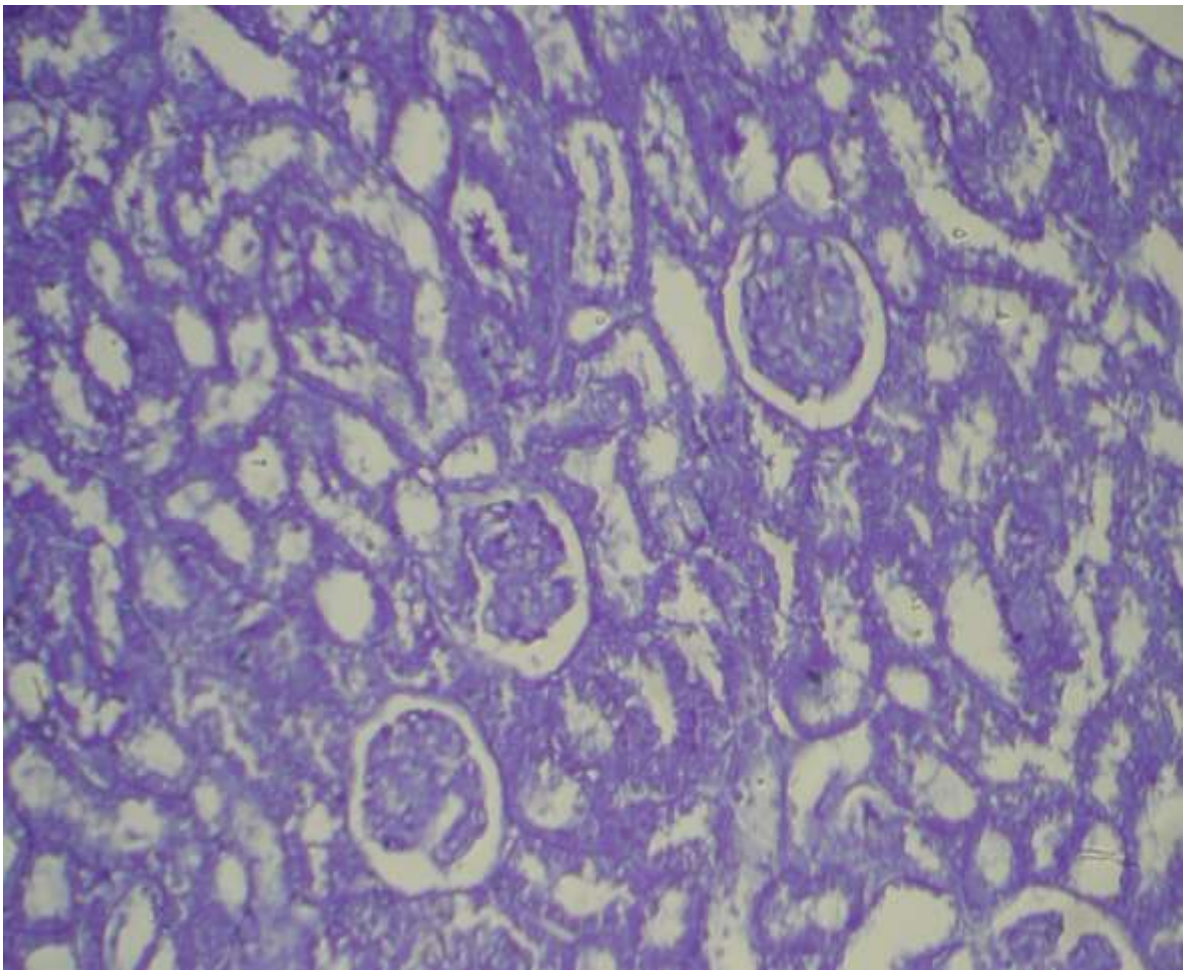

Рис.3.1. Кіркова речовина нирки щура (контроль). Забарвлення бромфеноловим синім за Mikel Calvo. Об.20х. Ок.10х. (збільшено у 200 разів)

Введення високих доз фолієвої кислоти сприяло вираженим морфологічним змінам (рис.3.2) у кірковій речовині нирок щурів порівняно із контролем. Найбільш виражені зміни спостерігаються на третю добу нефропатії. Епітелій звивистих канальців з ознаками оборотного набухання клітини. Зокрема, епітелій проксимальних канальців переважно з ознаками вакуольної дистрофії. Показник поширеності альтерації (загибель та атрофія) становить 84,8%. Зростає окислювальна модифікація протеїнів, що підтверджується за допомогою комп'ютерної мікроспектрофотометрії за методом Мікель Кальво (згідно коефіцієнту R/B) [126, 127], а також знижується вміст глікогену. Коефіцієнту R/B – відношення інтенсивності

забарвлення червоного спектру (Red), характерного для кислих протеїнів, до інтенсивності забарвлення синього спектру (Blue), що характерний для основних протеїнів. В нашому випадку, коефіцієнт R/B становить більше 1 та свідчить про переважання карбоксильних груп над аміногрупами, тобто кислих протеїнів.

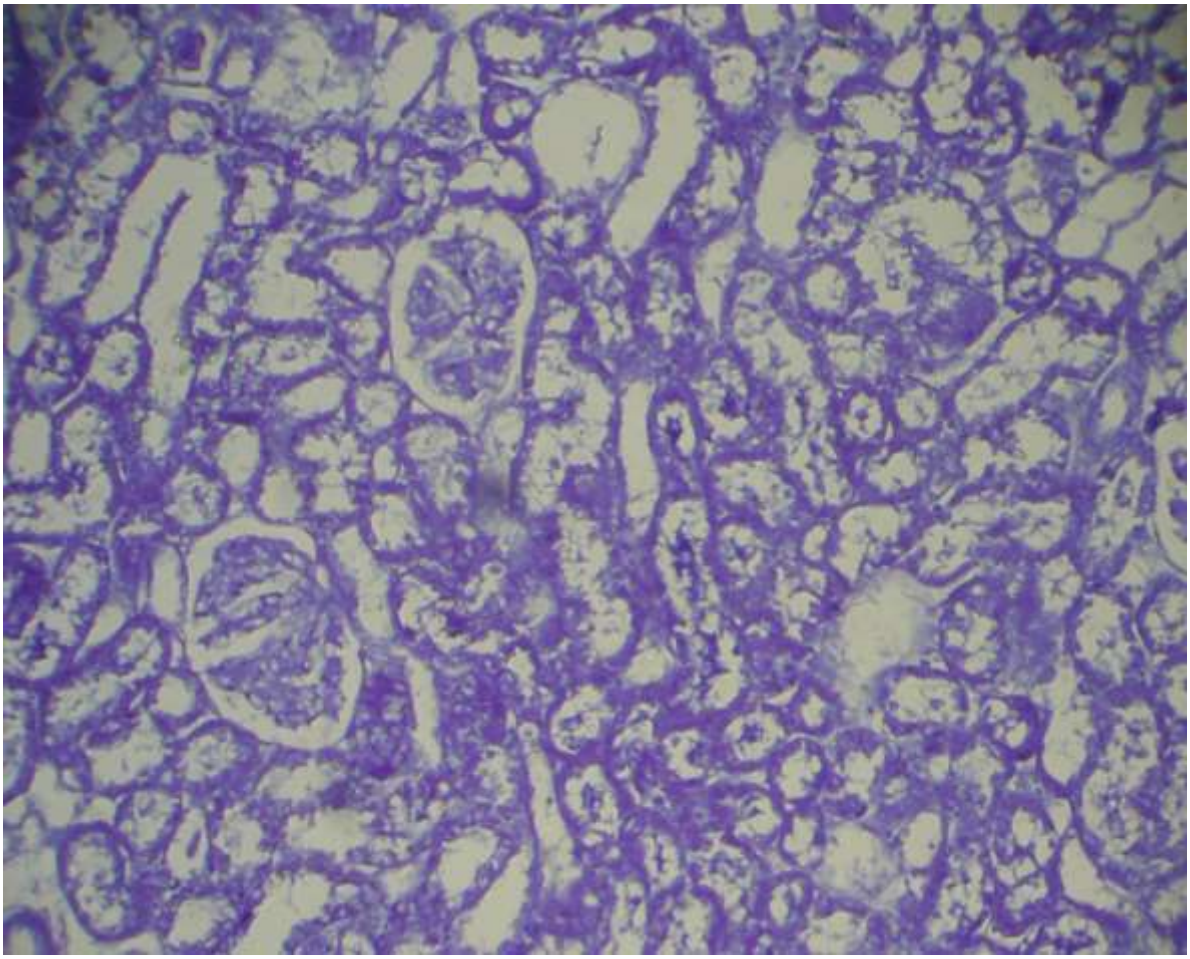

Рис.3.2. Кіркова речовина нирки щура за умов введення фолієвої кислоти. Забарвлення бромфеноловим синім за Mikel Calvo. Об.20х. Ок.10х. (збільшено у 200 разів)

Для оцінки функціонального стану нирок визначали концентрацію креатиніну та сечовини в плазмі крові щурів за умов експериментальної нефропатії.

Встановлено, підвищення концентрації креатиніну (рис.3.3) та сечовини (рис.3.4) на 140,5% та 26,6% відповідно на 3 день та на 30,7% і 14,6%

відповідно на 7 день експерименту в порівнянні з групою контролю. Триденне введення екзогенного 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%.

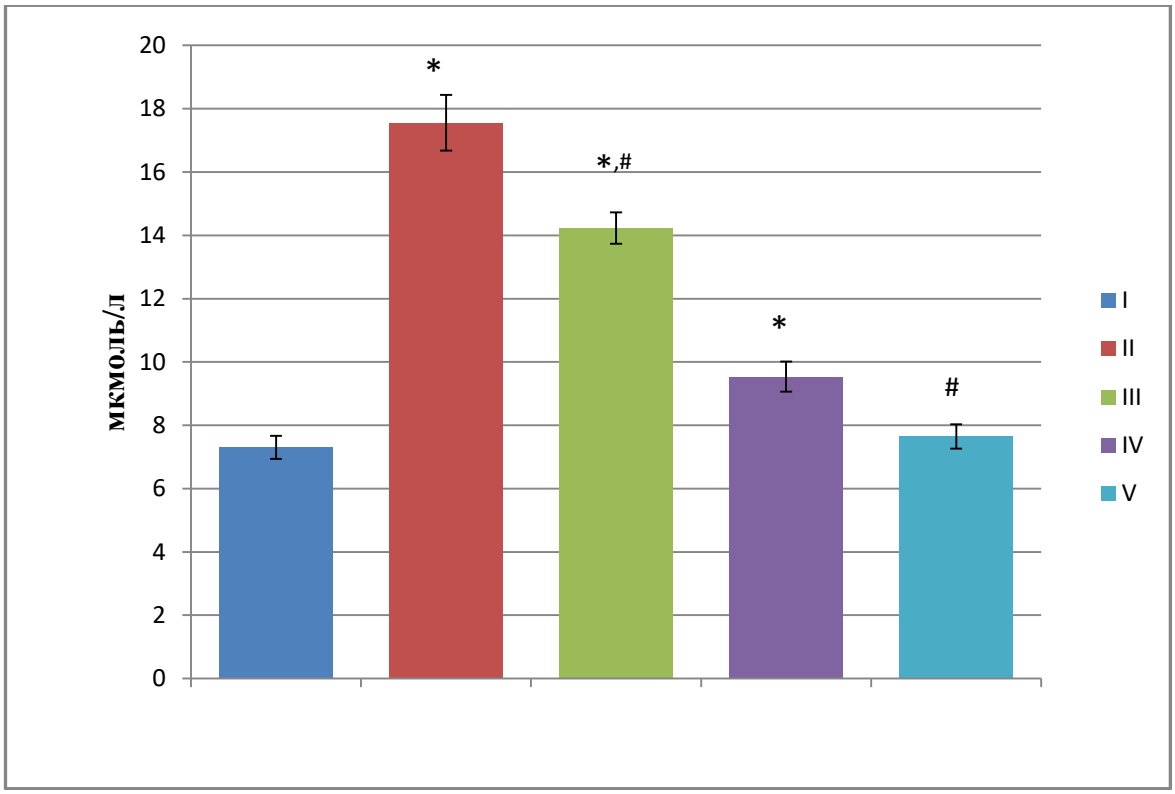

Рис.3.3. Вміст креатиніну в плазмі крові щурів за умов нефропатії та введення мелатоніну (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+ мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено 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 тварин з нефропатією, $p < 0,05$.

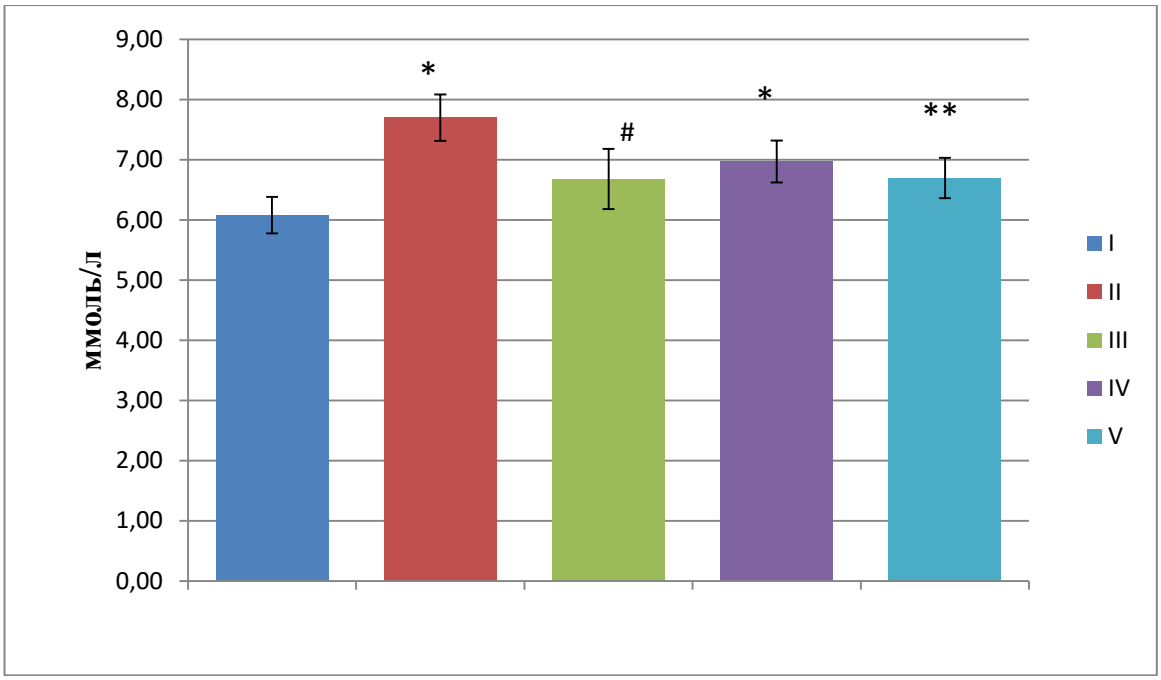

Рис.3.4. Вміст сечовини в плазмі крові щурів за умов нефропатії та введення мелатоніну (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+ мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено 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 тварин з нефропатією, $p < 0,05$.
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$.

Креатинін та сечовина – кінцеві продукти азотистого обміну, що відображають одну із найважливіших функцій нирок – азотовидільну, порушення якої спостерігається при токсичному ураженні нирок. Значне підвищення рівня креатиніну та сечовини в плазмі крові свідчить про погіршення фільтраційної функції нирок, посилення пасивної реабсорбції в ниркових канальцях та порушення здатності нирок виводити з кровотоку продукти азотистого метаболізму [154]. Введення мелатоніну знижувало дані показники, що є результатом покращення фільтраційної здатності нирок щодо виведення ними продуктів азотистого обміну.

На 3 день експериментальної нефропатії спостерігали підвищення в плазмі крові щурів активності γ-глутамілтранспептидази (ГГТ) (рис.3.5) і аланінамінотрансферази (АЛАТ) (рис.3.6) на 30,9% та 74% відповідно в порівнянні з групою контрольних тварин. На 7-ий день експерименту активність АЛАТ знижувалася на 20,8%, в той час як активність ГГТ достовірно не змінювалася. Підвищення даних показників свідчить про ураження печінки на фоні експериментальної нефропатії, викликаної високими дозами фолієвої кислоти.

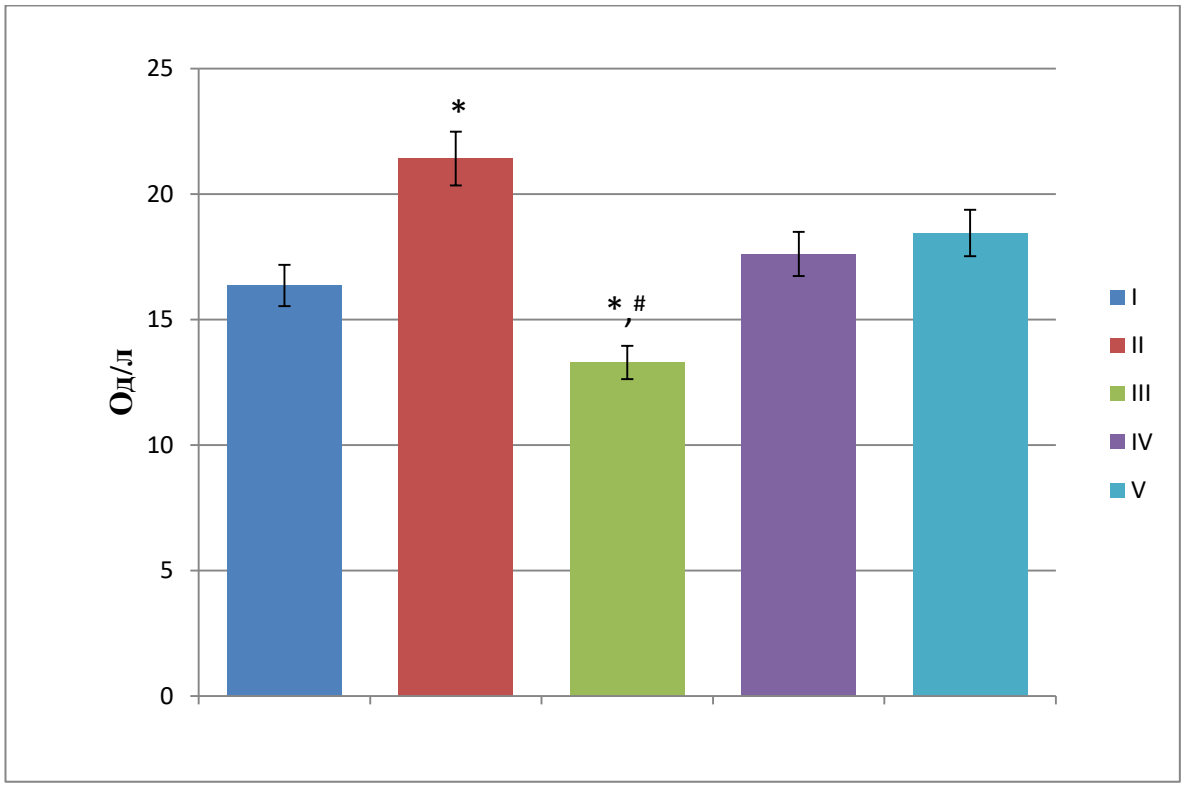

Рис.3.5. Активність γ-глутамілтранспептидази в плазмі крові щурів за умов нефропатії та введення мелатоніну (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено 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 тварин з нефропатією, $p < 0,05$.

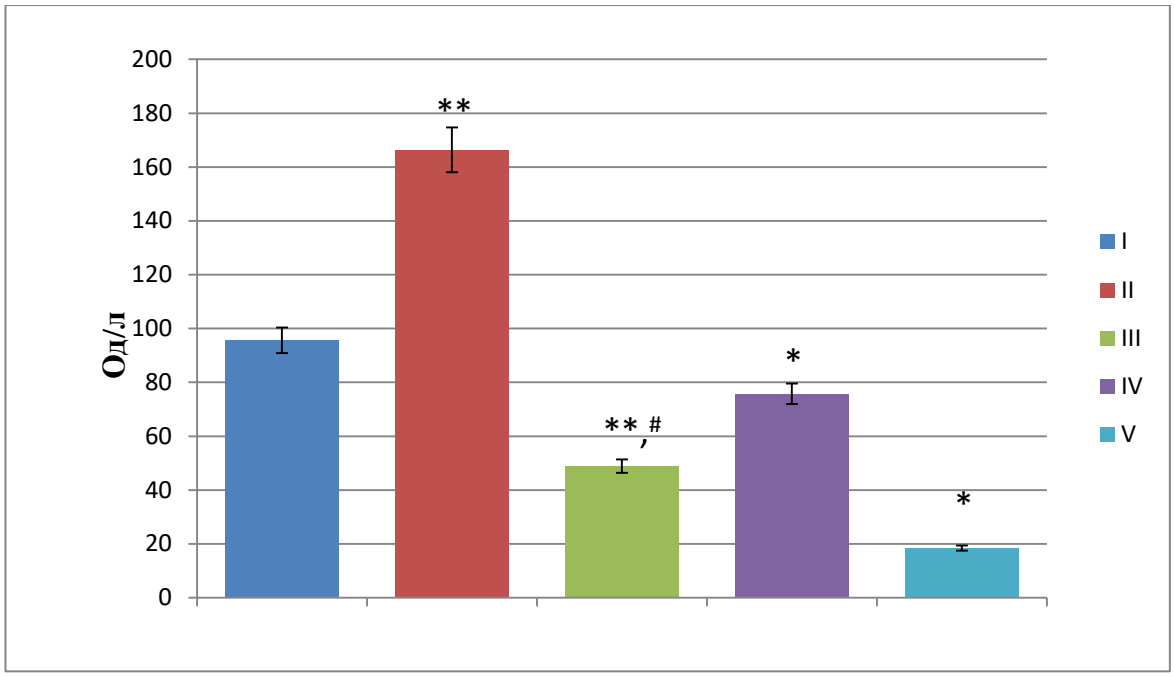

Рис.3.6. Активність аланінамінотрансферази в плазмі крові щурів за умов нефропатії та введення мелатоніну (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено 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 тварин з нефропатією, $p < 0,05$.
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$.

Триденнє введення мелатоніну знижувало активність як ГГТ так і АЛАТ на 37,8% та 70,6% відповідно в порівнянні з показниками тварин з нефропатією. Такий вплив мелатоніну, на нашу думку, пов'язаний з його здатність знижувати рівень окислювального стресу, який, як відомо, є провідною ланкою в патогенезі багатьох захворювань.

Основна роль γ-глутамілтранспептидази – позаклітинний катаболізм глутатіону – основного тіолового антиоксиданта в клітинах ссавців, що дозволяє амінокислотам-попередникам асимулюватися та повторно використовуватися для внутрішньоклітинного синтезу глутатіону. Реакція,

яку каталізує ензим представляє собою перенос γ-глутамілового залишку (зв'язаного через γ -карбонову кислоту глутамату з аміном чи іншою амінокислотою) до акцептора, підтримуючи таким чином адекватні рівні глутатіону [155]. ГГТ також приймає участь в переносі амінокислот через клітинні мембрани та метаболізмі лейкотрієнів [155].

ГГТ присутній в сироватці крові та на зовнішній поверхні клітин різноманітних органів, таких як: печінка, підшлункова залоза, нирки, кишечник та легені. В клінічній практиці використовується в якості діагностичного маркера захворювань гепатобіліарної системи.

АЛАТ – виступає в ролі каталізатора в реакції переносу аміногрупи аланіну на α-кетоглутарат, з утворенням пірувату та глутамату. Найбільш активна аланінамінотрасфераза в тканинах печінки та нирок. Підвищення активності АЛАТ в плазмі крові свідчить про синдром цитолізу, оскільки синтезується внутрішньоклітинно [156]. Найвища концентрація АЛАТ в цитоплазмі гепатоцитів, де активність ензиму в 3000 разів вища, ніж в сироватці крові.

Про ураження печінки високими дозами фолієвої кислоти свідчить і порушення її протеїнсинтезувальної функції. Вміст загального протеїну (рис.3.7) знижувався як на 3 так і на 7 день експериментальної нефропатії на 14,5% та 14,2% відповідно в порівнянні з показниками контрольних тварин. При введенні мелатоніну рівень загального протеїну підвищувався на 21,1% на 3 день та на 13,1% на 7 день експерименту порівняно з показниками тварин з нефропатією та досягав значення контрольних тварин.

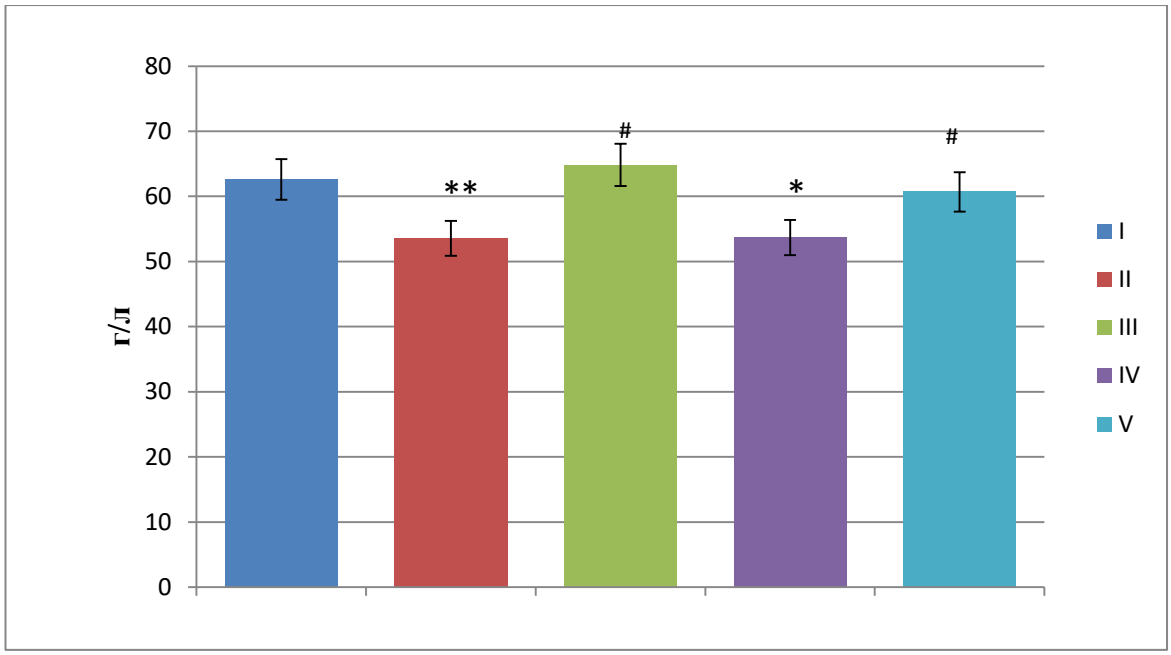

Рис.3.7. Вміст загального протеїну в плазмі крові щурів за умов нефропатії та введення мелатоніну (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено 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 тварин з нефропатією, $p < 0,05$.
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$.

3.2 Вплив мелатоніну на стан оксидантної та антиоксидантної систем і рівень гідроген сульфіду у крові щурів за умов експериментальної нефропатії

Низькі рівні АФО необхідні для передачі сигналів, проліферації, росту і енергетичного метаболізму клітин.

Надмірна їх кількість викликає окиснювальне пошкодження клітинних структур через дисбаланс в оксидантно-антиоксидантній системі. Саме тому доцільним є застосування з терапевтичною метою антиоксидантних засобів, що сприятиме відновленню балансу між продукцією та виведенням АФО.

Однією з вищезазначених причин порушень фільтраційної функції нирок є посилення процесів вільнорадикального окислення біополімерів в нирках. Ступінь вільнорадикального пошкодження оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних протеїнів нейтрального (ОМП370) та основного (ОМП430) характеру в плазмі крові щурів. Нами встановлено (табл.3.1; рис.3.8), підвищення 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 ОМП370 та ОМП430 підвищувався на 57,8% та 19,4% відповідно на 3-ій день нефропатії, в порівнянні з показниками контролю.

Таблиця 3.1

Вплив мелатоніну на показники оксидантної системи крові за умов експериментальної нефропатії (M±m)

	Контроль, n=36	**Нефропатія, 3 день, n=25**	**Нефропатія+мелатонін, 3 день, n=25**	**Нефропатія, 7 день, n=24**	**Нефропатія+мелатонін, 7 день, n=24**
ТБК-активні продукти, мкмоль/л	4,66±0,23	6,19±0,43**	5,30±0,42	5,63±0,18**	4,30±0,23##
ОМП370, мкмоль/г протеїну	0,64±0,02	1,01±0,03**	0,81±0,03**, ##	0,98±0,05**	0,71±0,02**, ##
ОМП430, мкмоль/г протеїну	0,36±0,01	0,43±0,02**	0,32±0,01##	0,54±0,04**	0,51±0,04**

Примітка.

* – 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<0,05;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p<0,01.

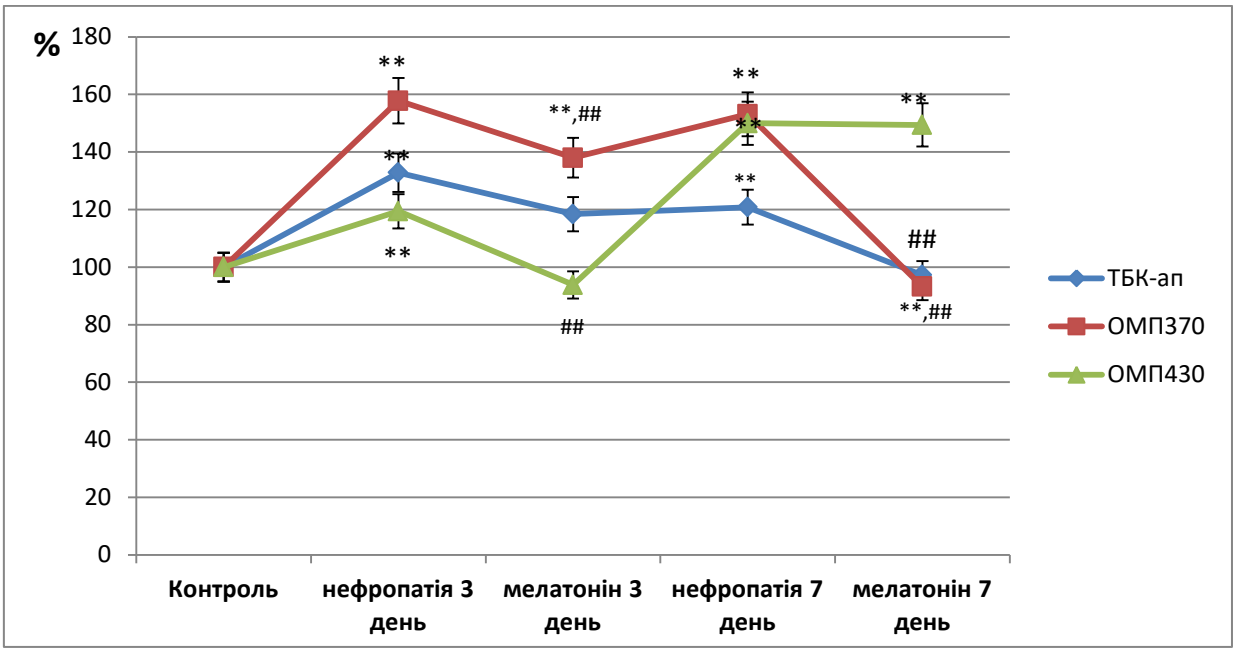

Рис. 3.8. Динаміка зростання показників оксидантної системи крові при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

У тварин з експериментальною нефропатією на 7 день зростає вміст карбонільних похідних протеїнів нейтрального характеру на 53,1% та основного характеру на 50%, порівняно з контрольною групою тварин. Підвищення досліджуваних показників свідчить про посилення процесів вільнорадикального окиснення за умов виникнення нефропатії [157].

Вільнорадикальне окиснення призводить до зміни структурних і функціональних властивостей мембран та активності ферментів, що є несприятливою умовою для функціонування органів та систем [158].

Введення мелатоніну призводило до зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 23,6% на 7-ий день експерименту та досягало рівня контрольних тварин. 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%, але їх вміст все ще достовірно відрізнявся від показників групи контрольних тварин.

Експериментальна нефропатія призводить до порушення і в системі антиоксидантного захисту (табл.3.2; рис.3.9; рис.3.10).

Таблиця 3.2

Вплив мелатоніну на показники антиоксидантної системи та вміст SH груп в крові за умов експериментальної нефропатії (M±m)

	Контроль, n=36	**Нефропатія, 3 день , n=25**	**Нефропатія+мелатонін, 3 день, n=25**	**Нефропатія, 7 день, n=24**	**Нефропатія+мелатонін, 7 день, n=24**
Супероксиддисмутаза, Од/мг Hb	1,90±0,04	1,65±0,08*	1,87±0,09	1,74±0,03*	1,75±0,05*
Каталаза, мкмоль/хв/л	13,16±0,34	10,50±0,30**	12,35±0,26##	10,13±0,47**	11,54±0,55**,#
GPx, нмоль/хв/мг Hb	6,91±0,37	2,02±0,34**	4,11±0,37**,##	2,40±0,28**	4,79±0,29**,##
GST, нмоль/хв/мг Hb	53,04±2,19	50,37±2,39	50,97±2,08	47,32±1,58*	53,10±2,08#
Церулоплазмін, мг/л	180,5±5,7	254,3±13,7**	216,7±12,6**,#	314,0±23,0**	206,2±15,7##
SH-групи, мкмоль/л	2,49±0,06	1,83±0,11**	2,32±0,13##	2,26±0,16**	2,40±0,11

Примітка.

* – 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<0,05;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p<0,01.

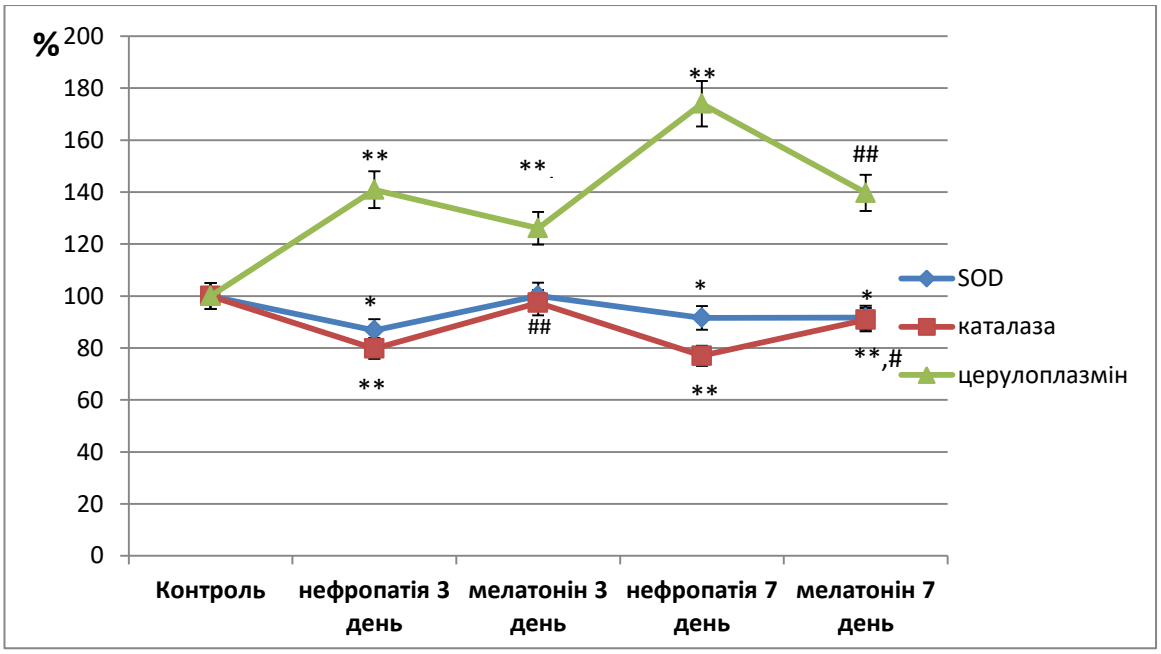

Рис.3.9. Динаміка зростання показників активності супероксиддисмутази, каталази та вмісту церулоплазміну в сироватці крові при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

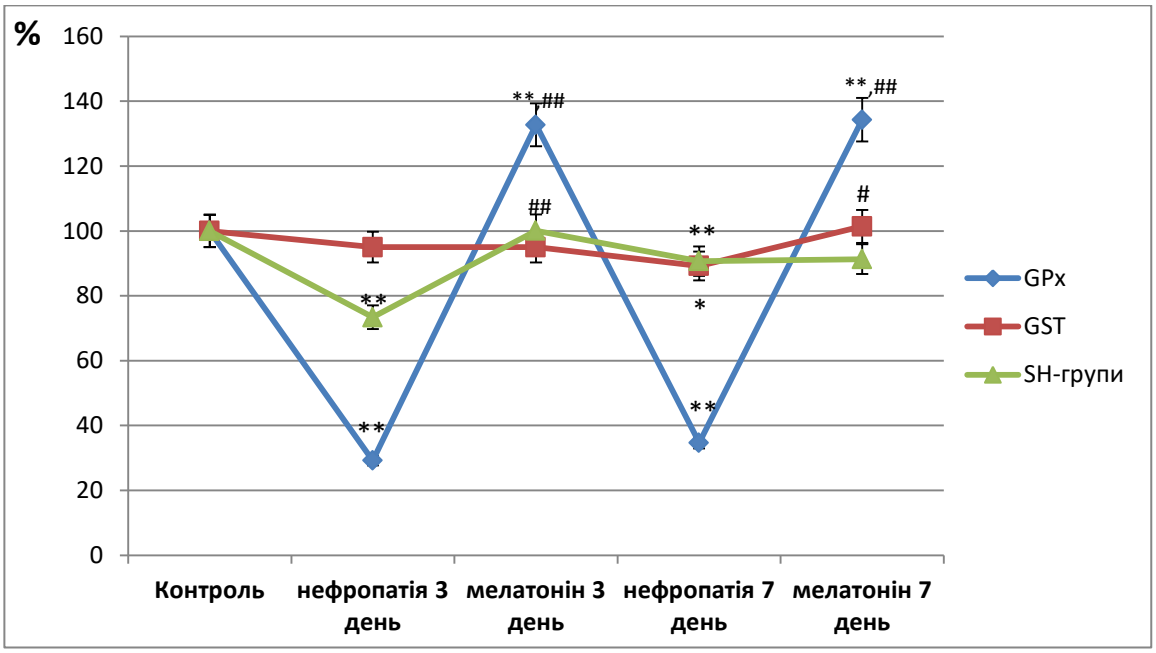

Рис.3.10. Динаміка зростання показників активності глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази та вмісту SH-груп в сироватці крові при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

Так, активність SOD знижувалася як на 3-ій так і на 7-ий день на 13,2% та 8,4% відповідно, в порівнянні з контрольною групою тварин. Результати

нашого експерименту продемонстрували зниження в активності каталази на 20,2% та 23,0% на 3-ій та 7-ий день експерименту відповідно, порівняно з групою контролю.

Обидва вищезазначені ензими перетворюють активні форми оксигену в більш стабільні молекули шляхом складного каскаду реакцій та відіграють ключову роль у захисті клітин від окиснювального пошкодження та підтриманні клітинного окисно-відновлювального гомеостазу [159] .

Нами встановлені зміни активності ензимів глутатіонової системи. Спостерігали зниження активності GPx на 70,8% на 3-ій день та 65,3% на 7-ий день експерименту. Зниження активності GST встановлене на 7-ий день на 10,8% в порівнянні зі значеннями контролю.

GPx – Se-вмісний ензим, функція якого полягає в перетворенні пероксидів та OH• у нетоксичні речовини, шляхом окислення відновленого глутатіону (GSH) до дисульфіду глутатіону (GSSG) [160]. GPx синтезується в переважній більшості в нирках, тому визначення активності GPx в крові є прогностичним маркером захворювання нирок. GST, так само, як і GPx потребує наявності глутатіону, оскільки приймає участь в реакції детоксикації ксенобіотиків, каталізуючи реакцію кон'югації електрофільних субстратів з GSH, таким чином, захищаючи клітину від окиснювального стресу [161]. Зниження активності GPx та GST в крові при експериментальній нефропатії ми пов'язуємо з можливим зменшенням вмісту глутатіону в крові та накопиченням АФО.

В останні роки активно вивчається роль гідроген сульфіду в підтриманні окисно-відновного гомеостазу. H_2S захищає клітини від окиснювального стресу, діючи, як прямий поглинач вільних радикалів, або ж активуючи систему антиоксидантного захисту [13]. H_2S відновлює цистин до цистеїну, цим самим підвищуючи рівень внутрішньоклітинного глутатіону – основного антиоксиданта в клітинному захисті від окисного стресу [14].

Також нами виявлені зміни вмісту вільних SH-груп та H_2S в плазмі крові щурів (табл.3.3; рис.3.11) з експериментальною нефропатією. Спостерігалося

зниження вмісту SH-груп на 26,6% на 3-ій день та 9,3% на 7-ий день експерименту порівняно з групою контрольних тварин. Вміст H_2S знижувався на 28,2% та 24,3% на 3-ій та 7-ий день відповідно, порівняно з групою контролю.

Таблиця 3.3

Вплив мелатоніну на вміст гідроген сульфіду в крові щурів за умов експериментальної нефропатії (M±m)

	Контроль, n=36	**Нефропатія, 3 день, n=25**	**Нефропатія+мелатонін, 3 день, n=25**	**Нефропатія, 7 день, n=24**	**Нефропатія+мелатонін, 7 день, n=24**
H_2S, мкмоль/л	75,71±0,84	53,90±1,14 **	68,27±1,81 **,##	57,30±2,05 **	65,29±1,96 **,#

Примітка.

** – 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<0,05;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p<0,01.

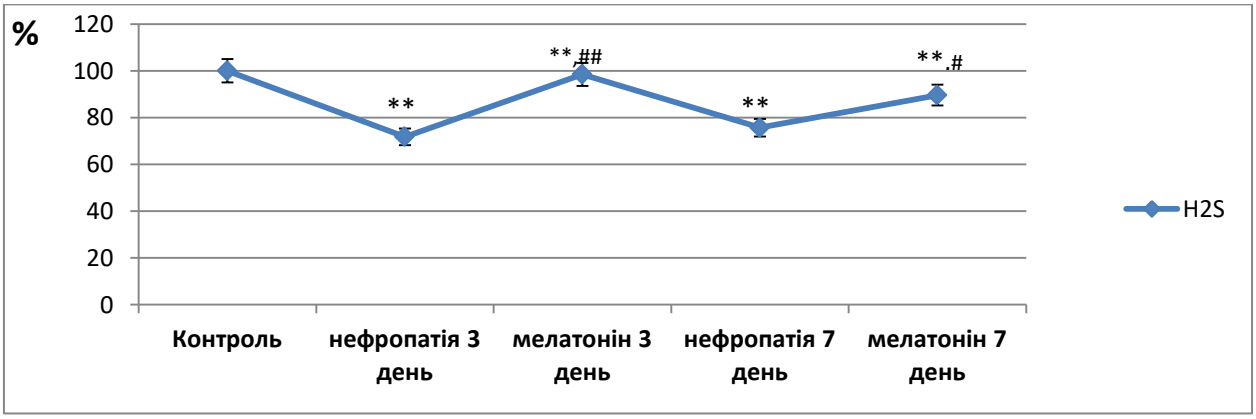

Рис. 3.11. Динаміка зростання вмісту H_2S в сироватці крові при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

Відомо, що SH-вмісні сполуки, до яких відноситься глутатіон, цистеїн, метіонін виконують роль акцепторів OH•, знижуючи цитотоксичну та

деструктивну дію АФО, цим самим, відіграючи суттєву роль у підтриманні редокс-потенціалу клітин крові. Розташовані на поверхні білкової молекули SH- групи здатні інактивувати АФО, окислюючись до дисульфідів, таким чином, захищаючи внутрішні ділянки протеїнів від пошкоджень. 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 [30].

При експериментальній нефропатії 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.

Одночасне зниження усіх показників ензиматичної ланки антиоксидантного захисту свідчить про виснаження антиоксидантної системи та призводить до порушення рівноваги між виробництвом вільних радикалів та системою антиоксидантного захисту. Дисбаланс між системами, що генерують АФО та системами, що знешкоджують їх призводить до окисної модифікації білків, ліпідів та ДНК та запускає шляхи загибелі клітин [162].

При введенні мелатоніну активність каталази в крові щурів підвищувалася на 17,6% на 3-ий день експерименту в порівнянні з групою тварин з нефропатією. На 7-ий день активність каталази підвищувалася на 13,9%, в порівнянні з нефропатією, але все ще достовірно відрізнялася від показників групи контрольних тварин. Активність GPx підвищувалася на третій та сьомий день експерименту на 103,5% і 99,6% відповідно, в порівнянні з показниками тварин з нефропатією, але на 7-ий день все ще достовірно відрізнялися від значень контрольних тварин. Активність GST підвищувалася на 7-ий день на 12,2% в порівнянні із значеннями тварин із нефропатією.

Ведення мелатоніну знижувало вміст 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.

Церулоплазмін – Cu-вмісна фероксидаза, що приймає участь в окисленні Fe^{2+} до його нетоксичної форми Fe^{3+}. Відповідно, метаболізм заліза повинен чітко регулюватися білками, що здатні транспортувати, секвеструвати та мобілізувати залізо із запасів. Саме через свою функцію, церулоплазмін вважають досить ефективним антиоксидантом, що здатен попереджати окиснювальне пошкодження ліпідів, ДНК та білків [163].

Мелатонін підвищує рівень вільних SH-груп на 26,7% на 3-ій 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.

В нашому дослідженні введення мелатоніну сприяє зниженню процесів вільнорадикального окиснення та підвищує антиоксидантний потенціал організму. Захисна дія мелатоніну здійснюється, ймовірно, завдяки беспосередньої участі мелатоніну в нейтралізації вільних радикалів та посиленні експресії генів антиоксидантних ферментів [164].

Пряма антиоксидантна дія мелатоніну пов’язана з його будовою. В своїй структурі він містить ароматичне індольне кільце, багате на електрони, що робить його потужним донором електронів та призводить до значного зниження окиснювального стресу. Однак, дія мелатоніну знижувати окиснювальний стрес іноді також залежить від його взаємодії з мембранними рецепторами мелатоніну, які локалізовані на клітинній мембрані або внутрішньоклітинних органелах. Ця рецепторно-опосередкована дія мелатоніну, ймовірно, полягає в стимуляції антиоксидантних ензимів. Коли мелатонін діє через рецептори, він може досягати антиоксидантного ефекту при більш низьких концентраціях, ніж ті, які потрібні, коли він діє як прямий поглинач вільних радикалів [118].

Окрім того, позитивний вплив мелатоніну на стан оксидантної системи може бути зумовлений тим, що він має здатність підвищувати рівень H_2S в крові. Відомо, що H_2S збільшує рівень внутрішньоклітинного глутатіону [14],

а це сприяє підвищенню активності GPx і GST, які використовують відновлений глутатіон і, таким чином, підвищують спроможності антиоксидантної системи захисту.

Висновки до розділу 3

Моделювання нефропатії фолієвою кислотою призвело до порушення фільтраційної здатності нирок, зміни біохімічних показників, що характеризують функціональний стан печінки, виникнення оксидативного стресу та порушення в системі антиоксидантного захисту, що характеризувалося підвищенням вмісту ТБК-активних продуктів, карбонільних похідних окисномодифікованих протеїнів, церулоплазміну та зниженням активності каталази, супероксиддисмутази, ензимів глутатіонової системи та вмісту SH-груп та H_2S. 7-ми денне введення мелатоніну сприяло нормалізації показників, що характеризують функціональний стан нирок та печінки, оксидантний стан організму та мають позитивний вплив на активність каталази, GPx, GST, вміст церулоплазміну, SH-груп та H_2S.

Результати власних досліджень розділу викладено у публікаціях та апробовано на наукових форумах:

1. Коляник ІО, Геруш ІВ, Григор′єва НП. Вплив мелатоніну на стан оксидантної та антиоксидантної систем і рівень гідроген сульфіду у крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Мед. та клін. хімія. 2021; 23(1): 37-44. [165]
2. Геруш ІВ, Коляник ІО, Ференчук ЄО. Вплив мелатоніну на каталазну активність крові щурів. Матеріали науково-практичної конференції з Міжнародною участю; Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії; Харків, 12-13 квітня, 2018; с.26 [166]
3. Геруш ІВ, Коляник ІО, Лопушинська ІВ. Стан окисної модифікації білків крові щурів за умов експериментальної нефропатії та корекції

мелатоніном. Матеріали 99-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 12,14,19 лютого 2018; Чернівці: Медуніверситет; 2018: с.61 [167]

4. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11,13,18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с.97 [168]
5. Коляник ІО. Вплив 3-ох денного введення мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 10,12,17 лютого 2020; Чернівці: Медуніверситет; 2020: с.86 [169]

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ

Основою патогенезу ниркової патології є розвиток оксидативного стресу, що супроводжується оксидантно-антиоксидантним дисбалансом, і як наслідок – ураження печінки. Печінка є ключовим органом та відіграє важливу роль в метаболізмі, оскільки приймає участь в збереженні та регулюванні рівня ліпідів, вуглеводів, в синтезі найбільш важливих білків та детоксикації токсичних сполук екзо- та ендогенного походження. Також вона забезпечує розщеплення сірковмісних амінокислот та утворення гідроген сульфіду (H_2S) [25]. Саме тому, вона є схильною до окислювальних пошкоджень [170, 171].

Недостатні методи лікування зумовлюють необхідність для удосконалення фармакотерапії та впровадження інших, ефективніших засобів нефропротекції, які впливатимуть на етіологічний, патогенетичний і симптоматичний компоненти захворювання.

Саме тому, завданням розділу було вивчити вплив мелатоніну на оксидантний стан в гепатоцитах, енергетичний обмін, системи антиоксидантного захисту та обміну гідроген сульфіду печінки щурів при експериментальній нефропатії, викликаній високими дозами фолієвої кислоти.

4.1. Вплив мелатоніну на оксидантний стан та енергетичний обмін печінки за умов експериментальної нефропатії

В останні роки є багато доказів того, що окислювальні процеси відіграють ключову роль у розвитку багатьох захворювань. Збільшення активних форм оксигену є ключовим фактором молекулярних пошкоджень, визначених як окислювальний стрес. При цьому антиоксидантна система

неспроможна в повній мірі захистити від дії АФО. Усі основні групи біомолекул зазнають пошкоджень під впливом вільних радикалів. Рівень окисного стресу найчастіше визначається за кількістю пошкоджених продуктів ліпопероксидації, карбонільних похідних протеїну, та пошкоджених нуклеїнових кслот [172].

Нами встановлено посилення процесів окиснення ліпідів та білків в гепатоцитах (табл..4.1; рис.4.1), про що свідчить підвищення вмісту ТВК-активних продуктів на 3-ій та на 7-ий день день експериментальної нефропатії на 19,9%, та на 38,8%; а також вмісту окисно-модифікованих протеїнів нейтрального характеру (ОМП370) на 42,6% та 16,1% відповідно порівняно із значеннями контролю. Підвищення вмісту окисно-модифікованих протеїнів основного характеру (ОМП430) спостерігалося на 17,5% на 7-ий день виникнення нефропатії.

Підвищення ОМП є результатом порушення рівноваги між процесами, що регулюють синтез та оксидацію протеїнів, і зменшення активності протеаз, які селективно розщеплюють оксидовані форми білків [173]. Карбоніли протеїнів найчастіше утворюються, як правило, внаслідок незворотньої окиснювальної модифікації та є більш хімічно стабільними на відміну від продуктів перекисного окиснення ліпідів, які видаляються протягом декількох хвилин [173].

Однією з причин змін ОМП може бути неконтрольована інтенсифікація ПОЛ. Відомо, що продукти ПОЛ, зокрема малоновий диальдегід, реагуючи з лізиновими залишками білків, спричиняють їх деградацію з утворенням різноманітних цитотоксичних сполук. Інтенсифікація ОМП може бути наслідком порушення функціонування захисних протирадикальних систем. Крім того, карбоніли протеїну утворюються на початкових етапах в умовах розвитку окисного стресу та не являються продуктами, що утворюються в результаті дії одного конкретного окислювача, тому їх можна назвати маркером загального окиснення протеїнів. Підвищення вмісту ТБК-активних продуктів та продуктів окислювальної модифікації протеїнів в

постмітохондріальній фракції гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією свідчить про стимулювання процесів вільнорадикального окислення.

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 протеїнів і ліпідів.

Таблиця 4.1

Стан оксидантної системи печінки щурів при експериментальній нефропатії за умов корекції мелатоніном (M±m)

	Контроль, n=36	**Нефропатія, 3 день, n=25**	**Нефропатія+мелатонін, 3 день, n=25**	**Нефропатія, 7 день, n=24**	**Нефропатія+мелатонін, 7 день, n=24**
ТБК-активні продукти, нмоль/хв/мг протеїну	21,04±0,65	25,23±1,60*	19,21±1,11##	29,20±3,31*	20,07±1,79#
ОМП370, нмоль/мг протеїну	3,05±0,11	4,35±0,33**	3,38±0,17##	3,54±0,19*	2,78±0,13##
ОМП430, нмоль/мг протеїну	2,74±0,12	3,05±0,17	2,50±0,12	3,22±0,21*	2,41±0,10##

Примітка.

* – 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<0,05;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p<0,01.

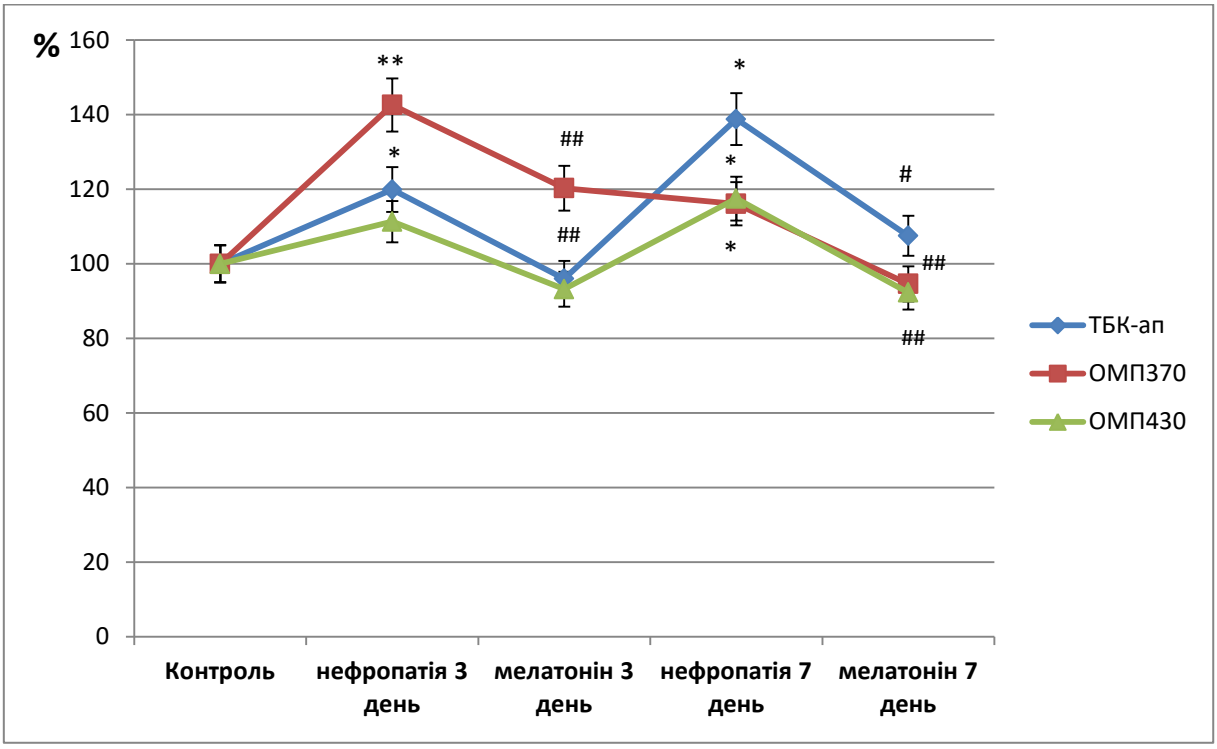

Рис. 4.1. Динаміка зростання показників оксидантної системи в гепатоцитах при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

Окислювальний стрес виникає тоді, коли механізми антиоксидантного захисту не можуть нейтралізувати вільні радикали в клітині. Цей дисбаланс між продукцією окислювальних молекул та антиоксидантним захистом призводить до накопичення АФО, які окислюють та викликають пошкодження ліпідів, білків та молекул ДНК [174, 175].

Мітохондрії печінки – внутрішньоклітинні органели, що займають до 22% об’єму цитоплазми а їх електрон-транспортна система споживає до 99% кисню в клітині. Основна функція мітохондрій – завершення окислювального розпаду поживних речовин та синтез АТФ, шляхом перенесення електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій.

Досить часто дихальний ланцюг мітохондрій є основним джерелом АФО, які утворюються як побічний продукт переносу електронів [105, 106, 176, 177]. Мітохондріальна дисфункція викликає порушення окисного фосфорилювання, апоптоз та надмірне утворення АФО, що призводить до

порушення енергетичного обміну [178, 179]. Дисфункціональні мітохондрії призводять до «втечі» шкідливих активних форм кисню, що переважно відбувається на ділянках комплексу I та III. [15, 105]. Окислювальний стрес, що виникає призводить до інактивації мітохондріальних ферментів і, як результат, зниження рівня утворення АТФ [180].

Саме тому, нами було досліджено активність мітохондріальних ензимів в гепатоцитах щурів.

Активність NADH-убіхінон-оксидоредуктази (рис.4.2) в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією, індукованою фолієвою кислотою знижувалася на 9,1% на 3-ій день та на 7,0% на 7-ий день експерименту порівняно з групою контрольних тварин. Дихальний комплекс I (NADH- убіхінон-оксидоредуктаза) – є одним із найбільших ферментативних комплексів в окисному фосфорилюванні та точкою входу електронів в дихальний ланцюг мітохондрій. Він окислює НАДН, відновлює убіхінон та переносить протони через внутрішню мітохондріальну мембрану, цим самим сприяючи, генерації протонно-рушійної сили, що необхідна для продукції АФО. Окрім того, комплекс I являється основним генератором внутрішньоклітинних АФО [118, 181]. Відомо, що більшість патологій асоційовані з підвищеним утворенням супероксидного аніон-радикалу саме комплексом I [182]. Отримані дані свідчать про дисфункцію в I комплексі дихального ланцюга.

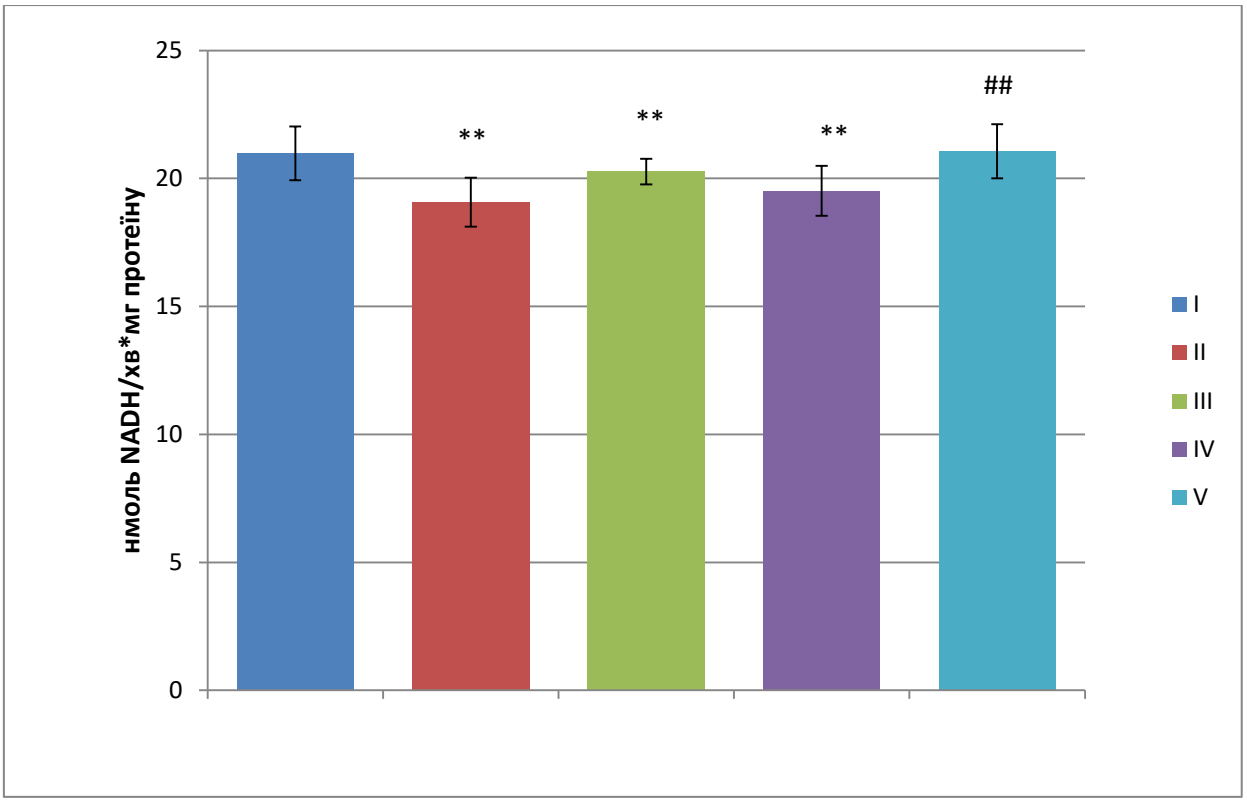

Рис.4.2. Активність NADH- убіхінон-оксидоредуктази в мітохондріях печінки щурів (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+ мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено у вигляді середня ± стандартна помилка середньої (M±m);
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$.
- статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками тварин з нефропатією, $p < 0,01$.

Нами також встановлено (рис.4.3) зниження сукцинатдегідрогеназної активності в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією на 3-ій день експерименту на 26,8% та на 7-ий день на 16,7% в порівнянні із значеннями контрольної групи тварин, що, ймовірно свідчить про порушення і в структурі II дихального комплексу.

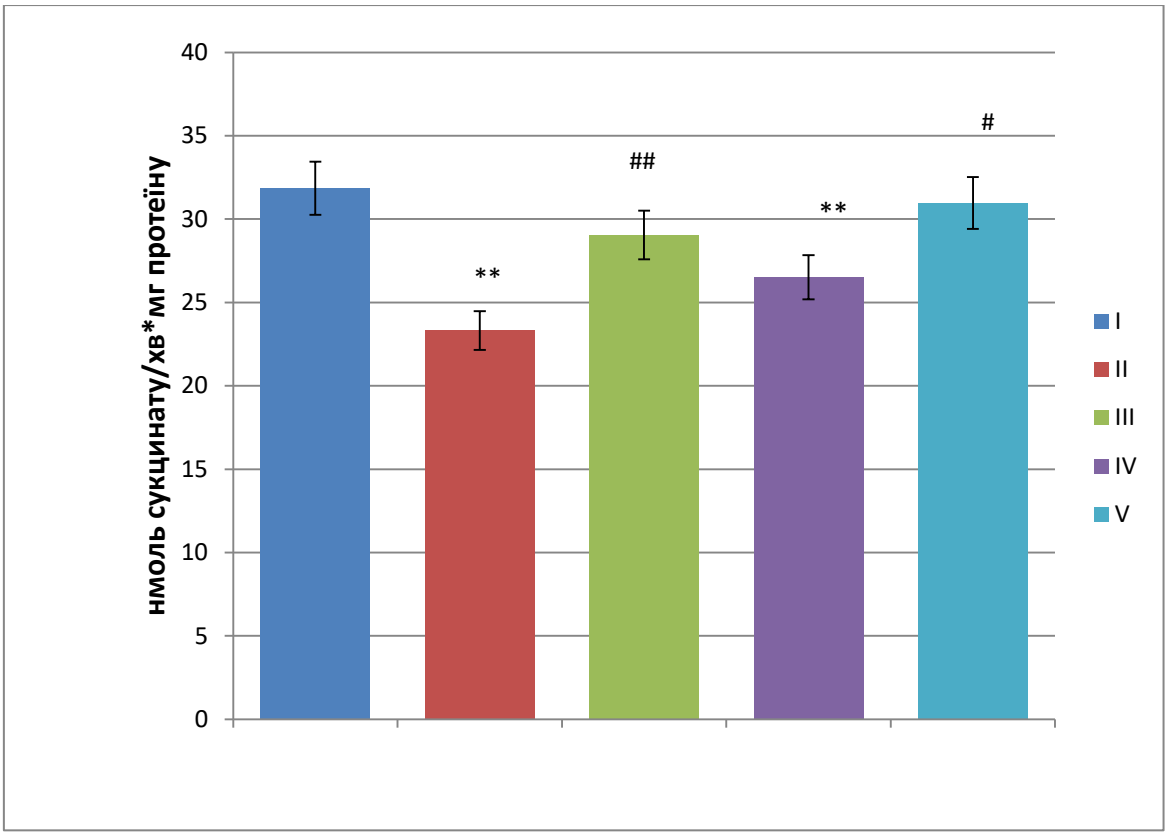

Рис.4.3. Активність сукцинатдегідрогенази в мітохондріях печінки щурів (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+ мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено у вигляді середня ± стандартна помилка середньої (M±m);
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$.
- статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками тварин з нефропатією, $p < 0,01$.

Дихальний комплекс II (сукцинатдегідрогеназа) – білковий комплекс, що приймає участь в окисленні сукцинату до фумарату та відновленні убіхінону, цим самим, пов’язуючи цикл трикарбонових кислот з електронотранспортним ланцюгом. Але сукцинатдегідрогеназа – це єдиний респіраторний комплекс, що не бере участі в перекачці протонів через внутрішню мембрану, протягом всього каталітичного циклу. Довгий час вважалося, що сукцинатдегідрогеназа не приймає участі в утворенні вільних радикалів, але дослідження останніх років [174, 183] демонструють протилежне. Хоча в порівнянні з показниками утворення АФО в комплексах I або III, їх утворення в комплексі II зазвичай є незначними.

Активність цитохром с оксидази та H^+-АТФ-ази (табл.4.2; рис.4.4) в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією знижувалася на 42,0% та 37,5% на 3-ій та на 37,9% та 33,1% на 7-ий день експерименту в порівнянні з контрольною групою тварин.

Дихальний комплекс IV (цитохром с оксидаза) переносить електрони з цитохрому с на кінцевий акцептор електронів O_2 для утворення H_2O [175]. На нашу думку, зниження активності цитохромоксидази пов'язане з дисфункцією I та II комплексів, як наслідок, можливої «втечі» електронів саме на цих ділянках дихального ланцюга.

Таблиця 4.2

Активність цитохром с оксидази та H^+-АТФ-ази в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією (M±m)

	Контроль, n=36	**Нефропатія, 3 день, n=25**	**Нефропатія+мелатонін, 3 день, n=25**	**Нефропатія, 7 день, n=24**	**Нефропатія+мелатонін, 7день, n=24**
ЦО, нмоль/ хвхмг протеїну	0,0169±0,00218	0,0098±0,00169**	0,0175±0,00321##	0,0105±0,00184**	0,0152±0,00137##
H^+-АТФ-аза, ммоль Р/ хвхмг протеїну	4,69±0,13	2,93±0,12**	3,67±0,17**,##	3,14±0,13**	3,91±0,18**,##

Примітка.

** – 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.

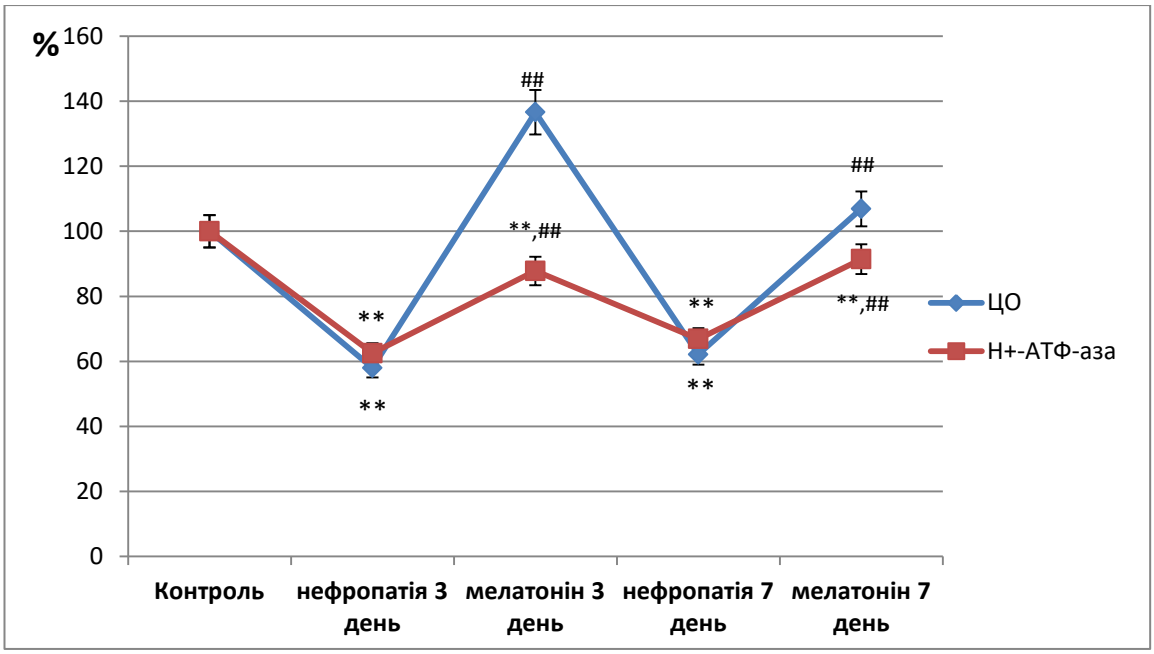

Рис. 4.4. Динаміка зростання показників активності цитохром с оксидази та H^+-АТФ-ази в мітохондріях гепатоцитів при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

Електронний потік пов'язаний з генерацією протонного градієнта через внутрішню мембрану, а енергія, що накопичена в протонному градієнті використовується кінцевим комплексом V для вироблення АТФ [174]. При нефропатії, індукованою фолієвою кислотою знижувалася ефективність фосфорилювання, при окисленні як НАДН+H^+, так і ФАДН$_2$, що, відповідно, і впливало на продукцію АТФ.

Інгібування комплексів I, II, IV та V призводило не лише до індукції АФО, а й також знижувало рівень АТФ в клітинах через переривання мітохондріального дихання [184].

Також, нами виявлені зміни вмісту вільних SH-груп в мітохондріальній фракції печінки щурів (табл..4.3; рис.4.5) з експериментальною нефропатією . Спостерігалося зниження вмісту SH-груп на 30,9% (3-ій день) та на 33,2% (7-ий день) порівняно з групою контрольних тварин.

Таблиця 4.3

Вміст SH-груп в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією (M±m)

	Контроль, n=36	**Нефропатія, 3 день, n=25**	**Нефропатія+мелатонін, 3 день, n=25**	**Нефропатія, 7 день, n=24**	**Нефропатія+мелатонін, 7 день, n=24**
SH-групи, нмоль/мг протеїну	9,01±0,21	6,23±0,37*	6,65±0,36*	6,02±0,42*	6,89±0,42*,#

Примітка.

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, p<0,05;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p<0,05.

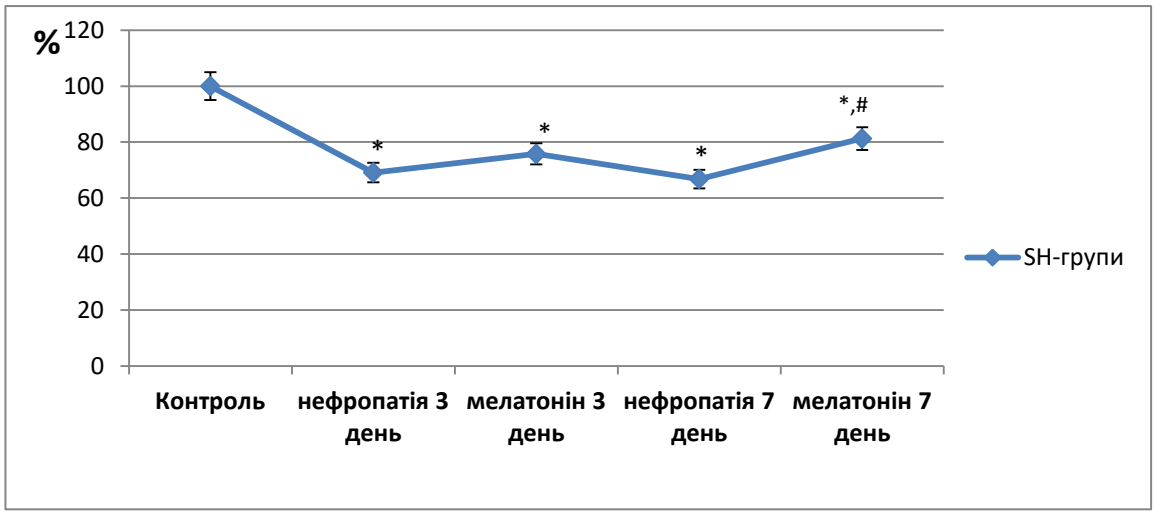

Рис. 4.5. Динаміка зростання вмісту SH-груп в мітохондріях гепатоцитів при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

SH-вмісні сполуки піддаються окисненню в першу чергу. Це оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули. Крім того, тіолові сполуки важливі компоненти підтримання окисно-відновного гомеостазу у клітинах і тканинах. Зміни вмісту SH-груп при експериментальній

нефропатії, ймовірно, пов'язане з високою інтенсивністю генерації АФО, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів в мітохондріях печінки.

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 досягають показників контрольних тварин.

7-денне введення мелатоніну призводить до покращення ферментативної активності комплексів I, II, IV та V, а також до зміни окисно-відновного стану тіолових груп протеїнів дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів, що показує важливу роль мелатоніну на енергетичний обмін та може розглядатися як компенсаторна реакція організму на оксидативний стрес, що викликаний нефропатією. Окрім прямої дії на вільні радикали, мелатонін здатен покращувати ефективність електронного транспортного ланцюга, що запобігає «втечі» електронів та зменшує ризик виникнення оксидативного стресу [185].

Наші дані також підтверджують результати інших дослідників, що мітохондріальна дисфункція викликає порушення окисного фосфорилювання, апоптоз та надмірне утворення АФО, що призводить до порушення енергетичного обміну [178, 179]. Дисфункціональні мітохондрії призводять до «втечі» шкідливих активних форм кисню, що відбувається на

ділянках комплексів I, III та частково II. [105, 118]. Окислювальний стрес, що виникає призводить до інактивації мітохондріальних ферментів і, як результат, зниження рівня утворення АТФ [180].

Мелатонін – досить ліпофільна сполука, яка здатна проникати через клітинні мембрани, досягаючи внутрішньоклітинних органел, в тому числі і мітохондрій. Нещодавніми дослідженнями з'ясовано, що мітохондріальні мембрани володіють спеціальними білками-переносниками, які сприяють швидкому поглинанню мелатоніна через органели проти градієнта концентрації [118]. Припускаємо, що мелатонін може взаємодіяти з комплексами дихального ланцюга мітохондрій, віддаючи та приймаючи електрони, цим самим покращуючи електронний потік. Його антиоксидантна дія та можлива взаємодія з мітохондріальними комплексами, діючи синергічно, здатна покращувати роботу дихального ланцюга та забезпечувати достатнє виробництво АТФ [118].

Пошкодження молекул, викликане особливо високореакційними АФО, можна контролювати, або шляхом попередження утворення їх попередників, або ж шляхом їх видалення одразу після їх утворення [118] . Мелатонін здатен знижувати слабореакційні форми оксигену як за рахунок своїх прямих антиоксидантних властивостей, перехоплюючи вільні радикали на рівні мітохондріального ланцюга переносу електронів, так і за рахунок непрямих – стимулюючи активність антиоксидантних ензимів.

Також доведено, що мелатонін стимулює активність антиоксидантних ферментів, а також покращує ефективність електронотранспортного ланцюга мітохондрій, і, як наслідок, зменшує «втечу» електронів і утворення вільних радикалів [73]. Прямі антиоксидантні та «радикалосхоплюючі» властивості мелатоніну обумовлені його будовою. В своїй структурі він містить ароматичне індольне кільце, багате на електрони, що робить його потужним донором електронів та призводить до значного зниження окислювального стресу [93].

4.2. Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів за умов експериментальної нефропатії

Нами встановлено (табл.4.4; рис.4.6), що експериментальна нефропатія призводить до підвищення активності супероксиддисмутази на 3-ій день експерименту на 30,4% та активності каталази на 3 та 7 день на 24,9% та 19,4% відповідно, порівняно з групою контрольних тварин, і свідчить про активацію цих ензимів у відповідь на зростання АФО.

Таблиця 4.4

Активність супероксиддисмутази та каталази в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії та введення мелатоніну

	Супероксиддисмутаза Од/мг протеїну	**Каталаза** мкМ/хв×г протеїну
Контроль	0,79±0,02	35,16 ±1,34
Нефропатія 3день	1,03±0,07 **	43,93±1,79**
Нефропатія+Мелатонін 3день	0,83±0,05##	35,83±2,25#
Нефропатія 7день	0,88±0,04	41,98±2,90*
Нефропатія+мелатонін 7день	0,82±0,05	34,92±3,18#

Примітка.

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p<0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p<0,05$;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p<0,01$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p<0,01$.

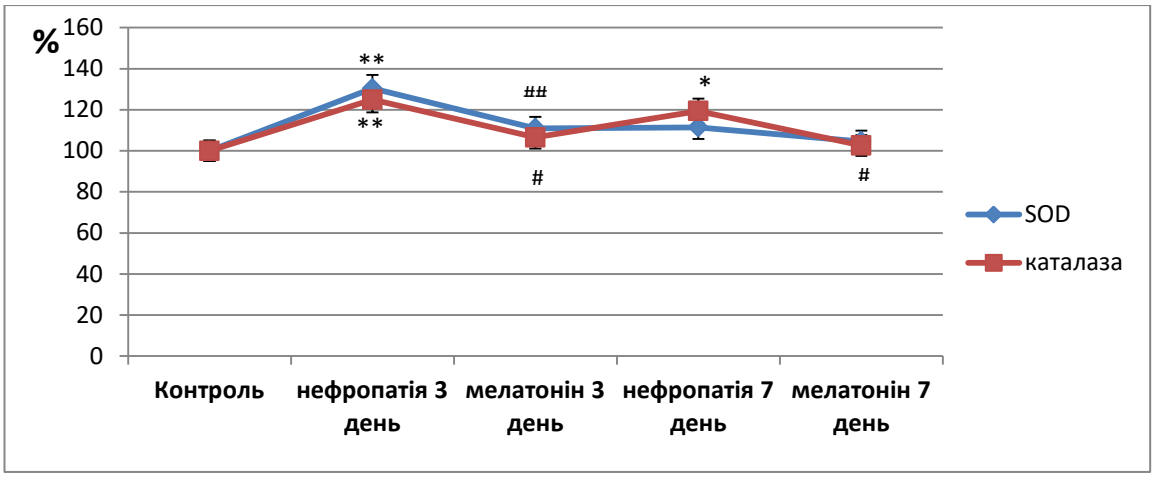

Рис.4.6. Динаміка зростання показників активності супероксиддисмутази та каталази в гепатоцитах при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

Антиоксидантні ензими, такі як супероксиддисмутаза та каталаза перетворюють активні форми оксигену в більш стабільні молекули шляхом складного каскаду реакцій. Одним із найбільш ефективних внутрішньоклітинних ензимів є SOD, яка каталізує реакцію дисмутації $O_2^{\cdot -}$ до H_2O_2, цим самим зменшуючи кількість супероксидних аніон-радикалів [186]. А каталаза, здійснює перетворення H_2O_2 до води та оксигену. Обидва ензими, діючи синергічно, відіграють ключову роль у захисті клітин від окислювального пошкодження та підтриманні клітинного окисно-відновлювального гомеостазу [159] .

Глутатіон – ендогенний трипептид, є найпотужнішим антиоксидантом та детоксикантом завдяки реактивності SH-групи, яка, як сильний нуклеофіл, зв'язує електрофіли. Глутатіон бере участь у білковому та вуглеводневому обмінах, впливаючи на процеси гліколізу в тканинах та виявляючи гепатопротекторну дію.

Нами встановлено (табл.4.5; рис.4.7) зниження вмісту 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 GP на 7-ий день у тварин з нефропатією на 23,1% та 36,5% відповідно, в порівнянні з контролем.

Таблиця 4.5

Вплив мелатоніну на активність ензимів системи глутатіону в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії

	GSH нмоль/мг тканини	**GPx** нмоль/хв×мг протеїну	**GST** нмоль/хв×мг протеїну
Контроль	6,81±0,25	169,8±7,2	61,52±2,34
Нефропатія 3день	4,52±0,36**	150,1±7,9*	47,55±1,99 **
Нефропатія+Мелатонін 3день	5,89±0,38 **, #	151,4±6,1*	49,04±2,72**
Нефропатія 7день	5,24±0,35 **	107,7±9,9 **	56,21±5,40
Нефропатія+мелатонін 7день	6,51±0,40#	150,0±7,8*,#	58,76±7,74

Примітка.

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, p<0,05;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, 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.

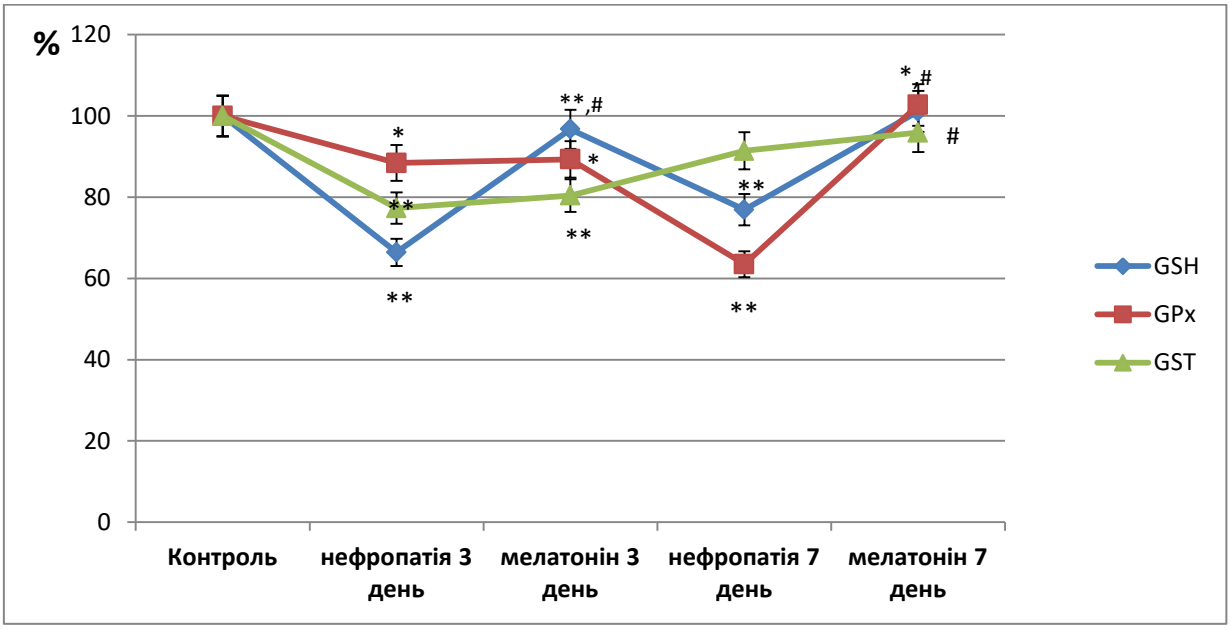

Рис.4.7. Динаміка зростання показників активності ензимів глутатіонової системи в гепатоцитах при нефропатії та за умов введення мелатоніну, %

Глутатіонпероксидаза знешкоджує пероксид гідрогену та гідропероксиди ліпідів, але швидкість реакцій знешкодження цих сполук залежить від вмісту відновленого глутатіону в клітинах. Тому, таке зниження активності GPx може бути результатом зниженого вмісту GSH.

Глутатіон-S-трансфераза є одним із основних ензимів глутатіонової системи, що забезпечує детоксикацію токсичних сполук. Як і GPx, активність GST залежить від концентрації відновленого глутатіону, оскільки з цим ензимом кон'югують токсичні сполуки, в тому числі продукти пероксидного окиснення біополімерів, які утворюються в результаті активації вільнорадикальних процесів. Відомо, що активність GPx і GST найвищою є в печінці, у зв'язку з провідною роллю даного органу в знешкодженні токсичних сполук [187].

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. Активність каталази досягала рівня контрольних тварин, що свідчить про потужні антиоксидантні властивості мелатоніну.

Ведення мелатоніну сприяло зростанню вмісту GSH як на 3-ій, так і на 7-ий день експерименту на 30,3% та 24,2% відповідно у порівнянні з показниками тварин з нефропатією, що, ймовірно, свідчить про встановлення тіол-дисульфідної рівноваги, яка необхідна для здійснення таких процесів, як функціонування мембранних структур і цитоскелету, клітинного поділу, регуляції активності гормонів. Встановлено, що мелатонін підвищував

активність GPx на 39,2% на 7-й день в порівнянні з показниками тварин з нефропатією, однак, однак все ще достовірно відрізнявся від показників контролю.

Використання екзогенних антиоксидантів сприяє нормалізації окисно-відновного балансу та зменшенню пошкодження ниркової тканини молекулами активних форм оксигену. Такий вплив мелатоніну на антиоксидантну систему може бути зумовлений тим, що мелатонін може легко проходити через клітинні мембрани, завдяки своїй високій ліофільності та гідрофільності, цим самим безпосередньо впливаючи на рівень вільних радикалів, сприяючи зниженню окислювального стресу. Або ж стимулюючи активність ряду антиоксидантних ензимів, в тому числі і ензимів синтезу глутатіону – важливого неферментативного низькомолекулярного антиоксиданта, таким чином синергічно взаємодіючи з ним [186]. Крім того, мелатонін здатен покращувати роботу дихального ланцюга мітохондрій, дозволяючи уникнути генерації вільних радикалів [88].

4.3. Вплив мелатоніну на систему обміну гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії

За останнє десятиліття гідроген сульфід зацікавив вчених як газотрансмітер та важлива сигнальна молекула, поряд із монооксидом вуглецю (CO) та монооксидом азоту (NO) [27, 28]. Він утворюється в результаті різноманітних ензиматичних та не ензиматичних реакцій, і регулює безліч фізіологічних та патофізіологічних процесів в різноманітних клітинах та тканинах. Гідроген сульфід діє як судиннорозширюючий, цитопротекторний та протизапальний засіб при низьких концентраціях, але також здатний викликати цитотоксичну дію при більш високих концентраціях. Дефіцит H_2S може сприяти прогресуванню нефропатій та пов’язаних з цим ускладнень [188, 189].

За умов експериментальної нефропатії на 3-ій день спостерігалося зниження концентрації гідроген сульфіду (рис.4.8) в печінці щурів на 37,92% та продукції гідроген сульфіду (рис.4.9) на 34,84%, що супроводжувалося і зниженням активності H_2S-синтезуючих ензимів (рис.4.10): цистатіонін-γ-ліази на 38,98%, цистатіонін-β-синтази на 33,73% та цистеїноамінотрансферази на 26,76% в порівнянні з тваринами контрольної групи. На 7-ий день розвитку нефропатії концентрація гідроген сульфіду знижувалася на 45,2%, а продукція - на 27,9% в порівнянні з показниками контрольної групи тварин, але все ще відрізнялася від показників контролю. Активність H_2S-продукуючих ензимів на 7 день експериментальної нефропатії (рис.4.11) також знижувалася: CSE – на 31,7%, CBS – на 32,1%, CAT – на 32,7% порівняно з показниками групи контрольних тварин.

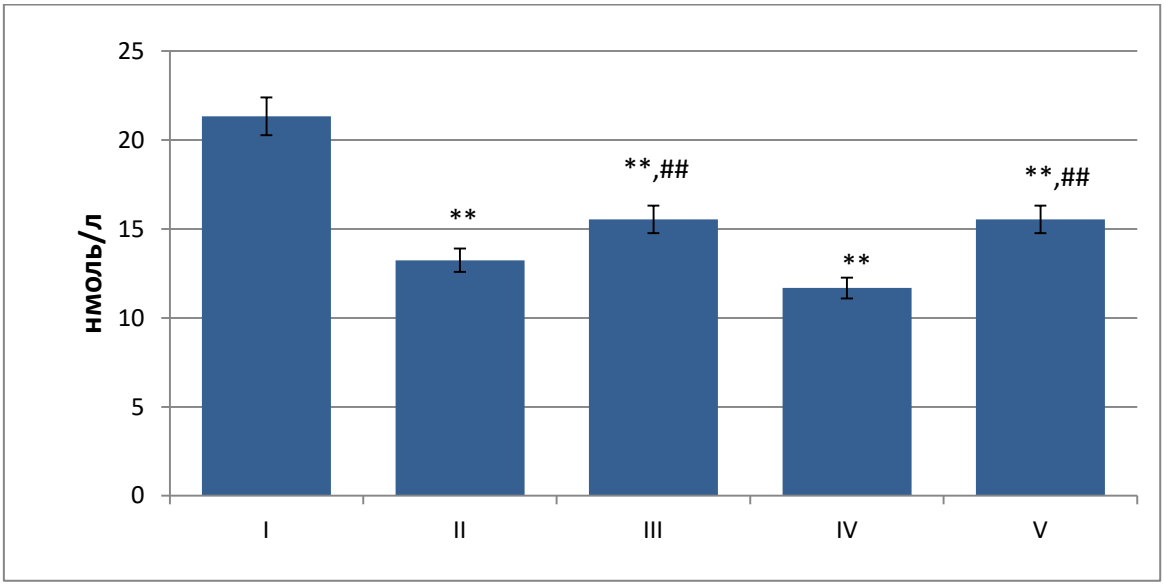

Рис.4.8. Вплив мелатоніну на концентрацію гідроген сульфіду в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+ мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено у вигляді середня ± стандартна помилка середньої (M±m);
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;
- статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками тварин з нефропатією, $p < 0,01$.

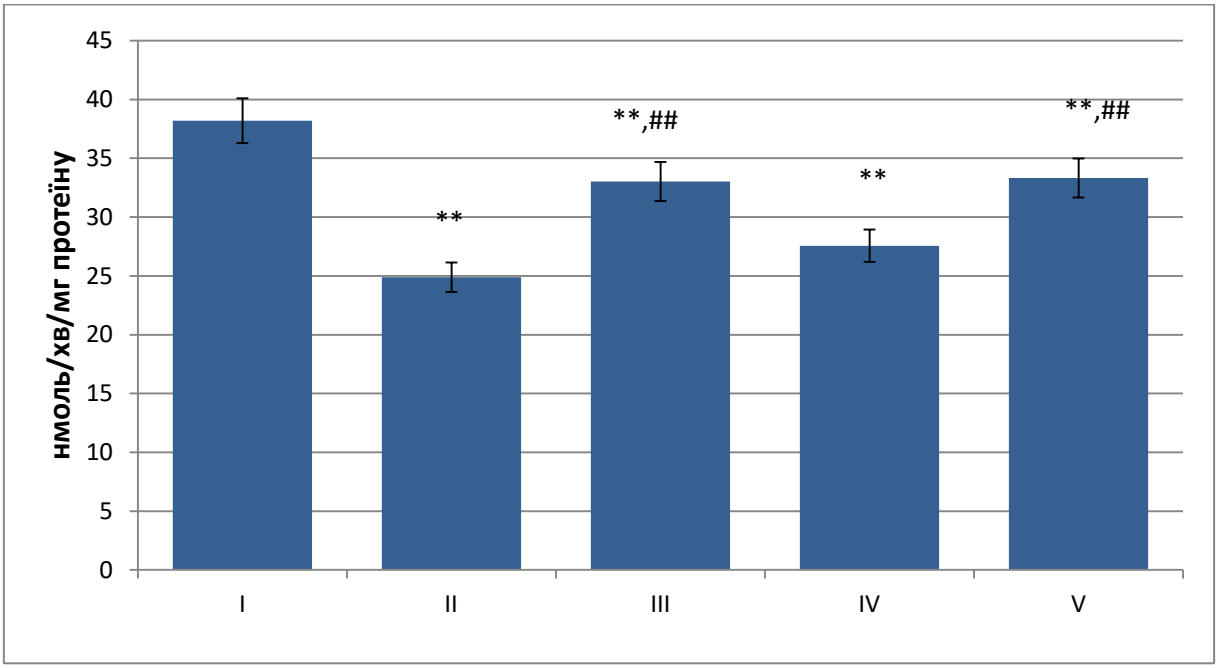

Рис.4.9. Вплив мелатоніну на продукцію гідроген сульфіду в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії (I – контроль; II – нефропатія, 3 день; III – нефропатія+ мелатонін, 3 день; IV – нефропатія, 7 день; V – нефропатія+мелатонін, 7 день)

Примітка.
дані представлено у вигляді середня ± стандартна помилка середньої (M±m);
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;
- статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками тварин з нефропатією, $p < 0,01$.

H_2S – ендогенний газотрансмітер, що утворюється в результаті ензиматичних та неензиматичних реакцій. У випадку використання не ензиматичних систем, персульфіди, тіосульфати та полісульфіди можуть перетворюватися в ендогенний гідроген сульфід в присутності $NADPH^+$ та $NADH^+$ [24]. В процесі ензиматичного шляху CSE та CBS - цитозольні піридоксальзалежні ензими, призводять до утворення гідроген сульфіду з використанням L – цистеїну та гомоцистеїну в якості основних субстратів. CAT також використовує в якості субстрату цистеїн та α-кетоглутарат, з утворенням проміжного продукту 3-меркаптопірувату, перетворення якого, призводить до продукції гідроген сульфіду [30, 31]. Більша частина CAT

локалізується в мітохондріях, оскільки саме там концентрація L-цистеїну в 3 рази вища, ніж в цитоплазмі [21, 24].

H_2S здатний підтримувати мітохондріальні функції, пригнічуючи утворення АФО та, цим самим, виявляючи антиоксидантні ефекти та сприяти репарації мітохондріальної ДНК, шляхом прямої взаємодії з ензимами репарації ДНК [27].

Зміни в системі H_2S при експериментальній нефропатії, можуть призводити до порушення внутрішньоклітинного метаболізму, формування нативної структури білків, синтезу глутатіону та інших важливих біологічно активних сполук.

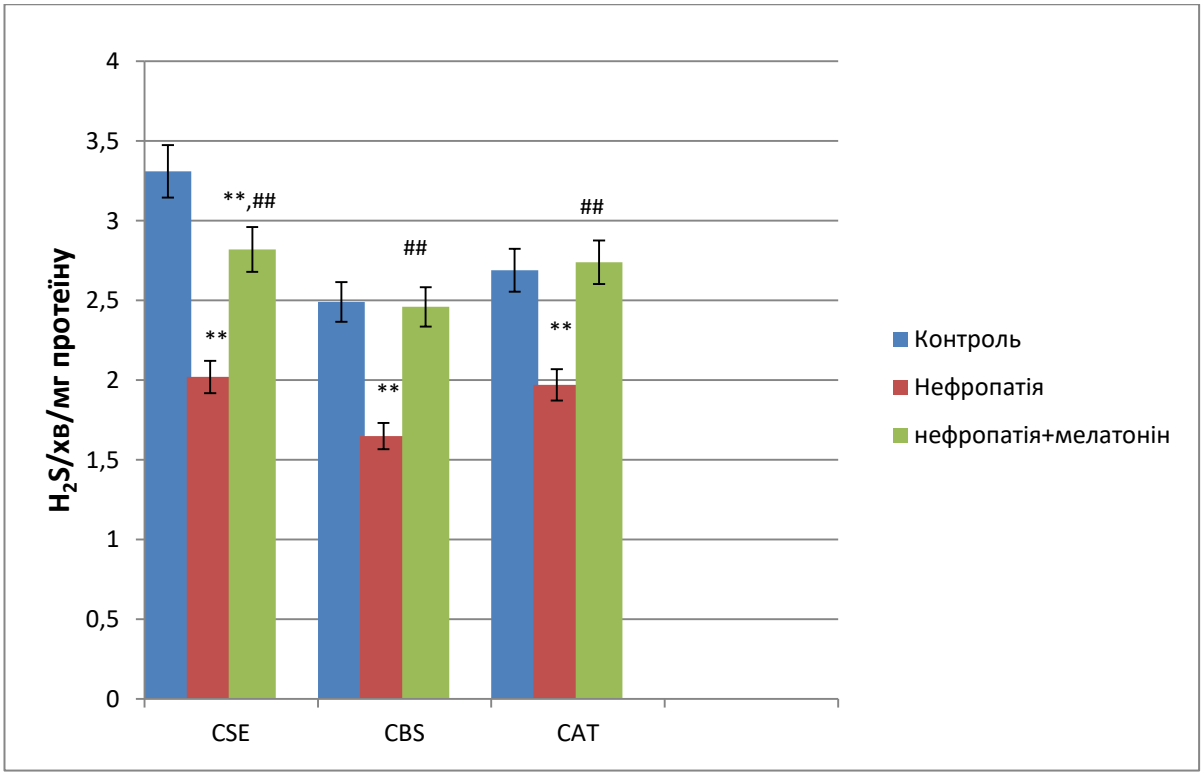

Рис.4.10. Триденний вплив мелатоніну на активність H_2S-продукуючих ензимів в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії

Примітка.
дані представлено у вигляді середня ± стандартна помилка середньої (M±m);
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;
- статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками тварин з нефропатією, $p < 0,01$.

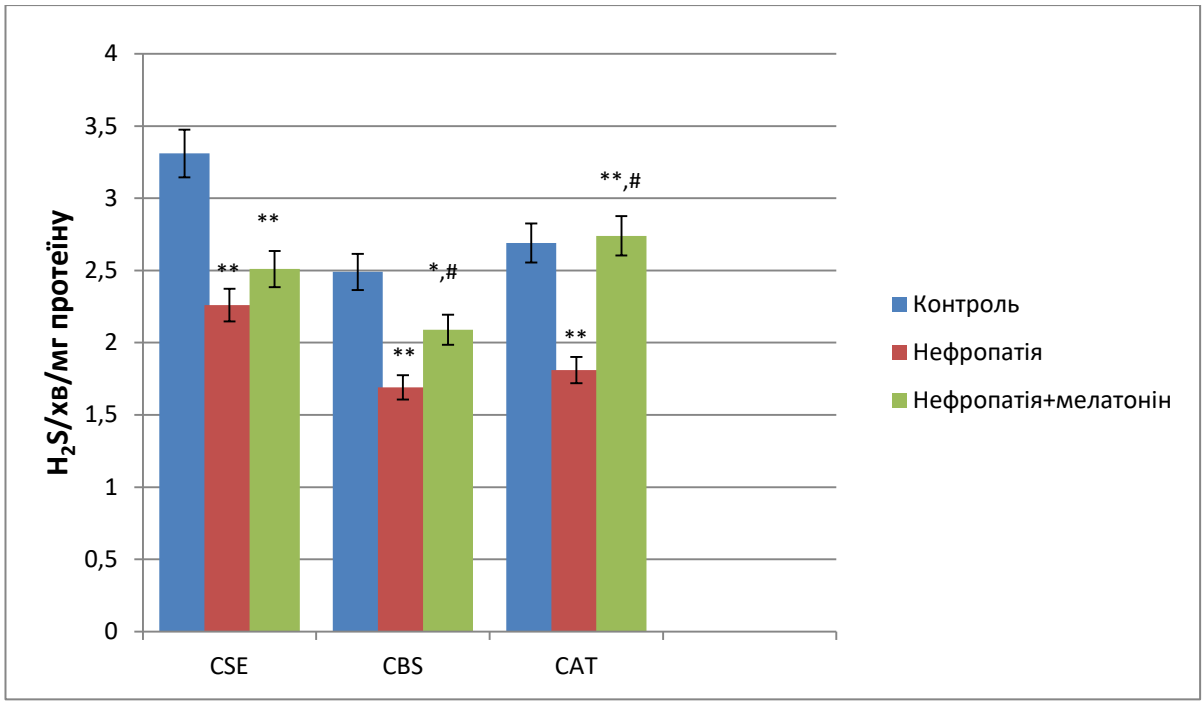

Рис.4.11. Семиденний вплив мелатоніну на активність H_2S-продукуючих ензимів в печінці щурів за умов експериментальної нефропатії

Примітка.
дані представлено 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 тварин з нефропатією, $p < 0,05$;
** - статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;
- статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками тварин з нефропатією, $p < 0,01$.

Введення мелатоніну призводило до зростання показників концентрації та продукції H_2S у печінці щурів на 3-ій день – на 16,59% та 21,30% відповідно в порівнянні з показниками тварин з нефропатією. Мелатонін збільшував рівень гідроген сульфіду шляхом підвищення активності CSE та CBS на 3 день експерименту на 24,15% та 32,52% в порівнянні з групою тварин із нефропатією відповідно. Триденне введення мелатоніну підвищувало також і активність CAT на 28,62% та перевищувало показники активності контрольної групи тварин. Введення мелатоніну упродовж 7 днів сприяло підвищенню показників H_2S-продукції та H_2S-концентрації в печінці щурів на 20,9% та 33,0% відповідно в порівнянні з показниками тварин із

нефропатією, але все ще достовірно відрізнялося від показників контролю. Підвищення рівня гідроген сульфіду, на нашу думку, досягалося 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 під впливом введення мелатоніну все ще достовірно відрізнялися від значень контрольних тварин.

Позитивний вплив мелатоніну на систему H_2S можливий за рахунок здатності мелатоніну безпосередньо перехоплювати вільні радикали, знижуючи окислювальний стрес, та забезпечуючи ефективне функціонування дихального ланцюга мітохондрій [187].

Також мелатонін приймає участь в активації синтезу ензимів глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази, що, як наслідок, сприяє зростанню продукції глутатіону, який бере участь в обміні гідроген сульфіду як цистеїн-вмісний трипептид [190]. H_2S збільшує активність цистин/глутаматного антипортера, тим самим збільшуючи транспорт цистину в клітини, де той, в свою чергу, відновлюється до цистеїну та включається в глутатіон – основний внутрішньоклітинний антиоксидант [19].

Дані зміни також можуть свідчити про здатність мелатоніну підвищувати вміст H_2S, який сам здатний забезпечувати захист клітин від окислювального стресу та сприяє підвищенню рівня відновленого глутатіону [19]. А цистеїн, що міститься в складі глутатіону, в свою чергу, приймає участь в метаболізмі гідроген сульфіду.

Висновки до розділу 4

Встановлено, що ушкодження нирок індуковане високими дозами фолієвої кислоти призводить до виникнення оксидативного стресу, що характеризується підвищеним вмістом ТБК-активних продуктів та окисномодифікованих протеїнів та дисбалансом показників антиоксидантної

системи, що, ймовірно, зумовлено посиленим вільнорадикальним ушкодженням біомолекул.

Виявлено зниження продукції АТФ в мітохондріях печінки, що, ймовірно, пов’язано з пригнічуючим впливом нефропатії на мітохондріальні ензими, а також концентрації та продукції H_2S у печінці щурів, через пригнічення H_2S-генеруючої активності ензимів: CSE, CBS та CAT.

Продемонстровано захисну дію мелатоніну при нефропатії проти окислювального стресу та мітохондріально залежних деструктивних процесів у печінці, а також його здатності підвищувати вміст гідроген сульфіду.

Такий вплив мелатоніну пов’язаний з безпосередньою його участю знешкоджувати вільні радикали, активувати антиоксидантні ензими, обмежувати апоптоз, підтримання ефективності комплексів дихального ланцюга та забезпечення достатнього рівня утворення АТФ, що виникають при експериментальних нефропатіях.

Результати власних досліджень розділу викладено у публікаціях та апробовано на наукових форумах:

1. Геруш І.О., Григор′єва Н.П., Коляник І.О., Ференчук Є.О., Дікал М.В. Вплив мелатоніну на систему гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії. Клінічна та експериментальна патологія. 2018; 3(65): 19-23. [191]
2. Коляник І.О., Геруш І.В. Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів при експериментальній нефропатії. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2020; 4(6): 37-41. [192]
3. Kolianyk I, Gerush I. Melatonin effect on the oxidant state and energy metabolism in the liver mitochondria of rats under conditions of experimental nephropathy. PharmacologyOnline. 2021; 1: 384-394. [193]
4. Коляник І.О., Геруш І.В. Стан системи гідроген сульфіду печінки щурів при експериментальній нефропатії за умов введення мелатоніну. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2021; 1(7): 66-70. [194]

5. Gerush I.V., Kolianyk I.O., Ferenchuk Ye.O., Lopushynska I.V., Riabaia O.V. Melatonin effects on the hepatic hydrogen sulfide system of rats under conditions of experimental nephropathy. Abstracts of the XI-th Parnas Conference - Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3-5 September, 2018; Ukr. Biochem. J; 90; 2018. P. 107. [195]
6. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність в гепатоцитах щурів при експериментальній нефропатії. Матеріали підсумкової 102-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету; Чернівці, 8,10,15 лютого 2021; Чернівці: Медуніверситет; 2021: с.87. [196]
7. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на сукцинатдегідрогеназну та H^+-АТФ-азну активність в мітохондріях печінки щурів при експериментальній нефропатії. Збірник матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 3.0»; Київ, 26 березня 2021; с.51. [197]

РОЗДІЛ 5
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Сьогодні в світі гостре пошкодження нирок і, як наслідок – смертність, залишається на високому рівні та становить приблизно 20-75%. Високий рівень захворюваності та смертності пов'язаний також з поширеністю COVID-19 у всьому світі, що викликає важкий гострий респіраторний синдром та характеризується позалегеневими ускладненнями різних органів та систем, в тому числі і нирок [1].

Багато факторів ризику, такі як лікарські препарати, сепсис, ішемія/реперфузія зазвичай призводять до зниження ШКФ, а також до гострої загибелі клітин канальців. ХПН – серйозна медична проблема у всьому світі, пов’язана з швидкою поширеністю таких захворювань як цукровий діабет та артеріальна гіпертензія. Запалення є важливим компонентом пошкодження, як при ГПН так і при ХПН, що супроводжує інтерстиційний фіброз. Інфільтруючі запальні клітини сприяють пошкодженню нирок за рахунок генерації активних форм оксигену, подальшого рекрутування лейкоцитів і виробництва прозапальних і профібротичних цитокінів [198].

Нефротоксичність, викликана лікарськими препаратами досить часте явище, в зв’язку з широкою поширеністю онкозахворювань, а також неконтрольованим застосуванням антибіотиків. Найчастіше нефротоксичність, проявляється некрозом канальців, інтерстиціальним нефритом, кристалічною нефропатією, ангіопатією, змінами внутрішньоклубочкової гемодинаміки, рабдоміолізом та фіброзом, які в кінцевому результаті призводять до ниркової недостатності [73].

На долю нефротоксичності, викликаної лікарськими препаратами припадає 66% випадків ниркової недостатності серед людей похилого віку. Токсичне ушкодження ниркової тканини характеризується високою захворюваністю та смертністю у 40-70% пацієнтів з ГПН [73].

Окиснювальний стрес залучений в патогенез різноманітних захворювань нирок, включаючи гостре та хронічне пошкодження нирок, а також гіпертонічну та діабетичну нефропатії [5, 160]. Він характеризується підвищенням внутрішньоклітинного рівня АФО, що відіграє важливу роль в пошкодженні нирок та є потенційною ціллю для терапевтичного втручання. Окислювальний стрес проявляється неспроможністю антиоксидантного захисту знешкодити вільні радикали, з подальшим розвитком запальної реакції, пошкодженням гломеруло-тубулярних клітин та їх некрозом. Саме тому пошук можливих ефективних та безпечних засобів лікування з вираженою антиоксидантною дією не втрачає своєї актуальності і сьогодні.

Одним із найбільш поширених антиоксидантів є мелатонін, що відомий як активний перехоплювач вільних радикалів. Окрім того, мелатонін стимулює синтез антиоксидантних ферментів та активує синтез глутатіону [16].

Нефропатія, індукована ФК – модель, що використовується для вивчення механізмів, в основі яких лежить нефротоксичне пошкодження канальців та поступове прогресування ниркового фіброзу. Пошкодження нирок, в даному випадку, пов’язане з токсичною дією високих доз фолієвої кислоти на епітелій канальців нирок та утворенням кристалів в їх просвіті. Дегенерація води і вакуолей є початковими патологічними проявами пошкодження канальців. Дані зміни в нирках щурів свідчать про розвиток ГПН та відтворюють всі основні процеси пошкодження нирок людини [5].

Моделювання нефропатії здійснювали шляхом внутрішньоочеревинного введення фолієвої кислоти в дозі 250мг/кг маси тіла. Нефропатію підтверджували патоморфологічно. Найбільш виражені зміни спостерігалися на третю добу нефропатії. Виявлено кристали фолієвої кислоти в канальцях нирок. Епітелій звивистих канальців з ознаками оборотного набухання клітини. Зокрема, епітелій проксимальних канальців переважно з ознаками вакуольної дистрофії. Показник поширеності альтерації (загибель та атрофія) становить 84,8%. Зростає окислювальна модифікація протеїнів, що

підтверджується за допомогою комп'ютерної мікроспектрофотометрії за методом Мікель Кальво (згідно коефіцієнту R/B) [126, 127], а також знижується вміст глікогену.

Для оцінки функціонального стану нирок також визначали концентрацію креатиніну та сечовини в плазмі крові щурів.

Нами встановлено, підвищення концентрації креатиніну та сечовини на 140,5% та 26,6% відповідно на 3 день та на 30,7% і 14,6% відповідно на 7 день експерименту в порівнянні з групою контролю.

Кінцеві продукти азотистого обміну – креатинін та сечовина відображають одну із найважливіших функцій нирок – азотовидільну, порушення якої спостерігається при токсичному ураженні нирок. Значне підвищення цих показників в плазмі крові свідчить про погіршення фільтраційної функції нирок, посилення пасивної реабсорбції в ниркових канальцях та порушення здатності нирок виводити з кровотоку продукти азотистого метаболізму.

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.

Однією з причин зазначених порушень фільтраційної функції нирок є посилення процесів вільнорадикального окислення біополімерів в нирках. Інтенсивність вільнорадикальних процесів є одним із найбільш значимих інтегральних показників стану організму при будь-яких патологічних станах.

Ступінь вільнорадикального пошкодження оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних протеїнів нейтрального та основного характеру в плазмі крові щурів. Встановлено, підвищення 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 ОМП370 та ОМП430 підвищувався на 57,8% та 19,4% відповідно на 3-ій день нефропатії, в порівнянні з показниками контролю. У тварин з експериментальною нефропатією на 7 день зростає вміст карбонільних похідних протеїнів нейтрального характеру на 53,1% та основного характеру на 50%, порівняно з контрольною групою тварин.

Підвищення досліджуваних показників свідчить про посилення процесів вільнорадикального окиснення за умов виникнення нефропатії та призводить до зміни структурних і функціональних властивостей мембран та активності ензимів, що є несприятливою умовою для функціонування органів та систем.

Введення мелатоніну сприяло зниженню вмісту ТБК-активних продуктів на 23,6% на 7-ий день експерименту та досягало рівня контрольних тварин. 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%, але їх вміст все ще достовірно відрізнявся від показників групи контрольних тварин.

Підвищення рівня показників, що характеризують ступінь вільнорадикального окиснення біомолекул пов’язані зі зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту. Так, активність SOD знижувалася як на 3-ій так і на 7-ий день на 13,2% та 8,4% відповідно, в порівнянні з контрольною групою тварин. Результати нашого експерименту продемонстрували зниження в активності каталази на 20,2% та 23,0% на 3-ій та 7-ий день експерименту відповідно, порівняно з групою контролю. Зміни активності антиоксидантних ферментів можуть знижувати загальний потенціал антиоксидантів організму, що призводить до збільшення рівня вільнорадикального окиснення.

Обидва вищезазначені ензими перетворюють активні форми оксигену в більш стабільні молекули шляхом складного каскаду реакцій та відіграють

ключову роль у захисті клітин від окиснювального пошкодження та підтриманні клітинного окисно-відновлювального гомеостазу.

Нами встановлені зміни активності ензимів глутатіонової системи крові. Спостерігали зниження активності GPx на 70,8% на 3-ій день та 65,3% на 7-ий день експерименту. Зниження активності GST встановлене на 7-ий день на 10,8% в порівнянні зі значеннями контролю.

Функція GPx полягає в перетворенні пероксидів та OH• у нетоксичні речовини, шляхом окислення відновленого глутатіону (GSH) до дисульфіду глутатіону (GSSG). GPx синтезується в переважній більшості в нирках, тому визначення активності GPx в крові є прогностичним маркером захворювання нирок. GST, так само, як і GPx потребує наявності глутатіону, оскільки приймає участь в реакції детоксикації ксенобіотиків, каталізуючи реакцію кон'югації електрофільних субстратів з GSH, таким чином, захищаючи клітину від окиснювального стресу. Зниження активності GPx та GST в крові при експериментальній нефропатії ми пов'язуємо з можливим зменшенням вмісту глутатіону в крові та накопиченням АФО.

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 порівняно з групою контрольних тварин. 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.

Функціональні SH-групи білків складають невід'ємну частину біокаталітичної системи живого організму. Поряд із виконанням своєї функції у ферментах сульфгідрильні групи проявляють вплив на різні фізіолого-біохімічні процеси. В основному, SH-вмісним сполукам належить провідна роль у захисті клітин від радикалу OH•, що утворюється в реакції Фентона чи в результаті розкладання H_2O під дією іонізуючого

випромінювання. Поскільки малі значення часу життя й радіуса дифузії OH• у біологічних субстратах роблять неможливим існування спеціалізованих протективних систем, подібних супероксиддисмутазі чи каталазі. Відзначено, що SH-вмісні сполуки піддаються окисненню в першу чергу. Це оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули. Крім того, тіолові сполуки важливі компоненти підтримання окисно-відновного гомеостазу у клітинах і тканинах.

Гідроген сульфід володіє властивістю захищати клітини від окисного стресу за рахунок своєї здатності підвищувати рівень внутрішньоклітинного глутатіону декількома шляхами [21, 41]. На синтез GSH впливає позаклітинний глутамат. Цистин є основним джерелом цистеїну, необхідного для внутрішньоклітинного синтезу глутатіону і, оскільки глутамат і цистин використовують один і той же білок, що транспортує амінокислоти, високі концентрації позаклітинного глутамату конкурують з цистином, перешкоджаючи внутрішньоклітинному синтезу глутатіону [199]. Однак, H_2S відновлює нормальний транспорт цистину, цим самим сприяючи внутрішньоклітинному синтезу глутатіону [199].

Більше того, H_2S здатний підвищувати внутрішньоклітинні рівні ензимів, які беруть участь в синтезі глутатіону, що являється частиною механізму збільшення GSH гідроген сульфідом. Як показують дослідження, H_2S сприяє синтезу відновленого глутатіону через Nrf2-залежний шлях [199, 200].

При експериментальній нефропатії 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.

Церулоплазмін – металоензим, що приймає участь в окисленні Fe^{2+} до його нетоксичної форми Fe^{3+}. Двовалентне залізо досить небезпечне, через його здатність генерувати токсичні вільні радикали, особливо супероксидні і гідроксильні. У той же час залізо є супутнім чинником у багатьох важливих ферментативних реакціях, включаючи транспорт кисню і оксиду азоту.

Діючи як фероксидаза, церулоплазмін запобігає утворенню токсичних іонів заліза та активації пероксидного окиснення ліпідів і запобігає пошкодженню клітинних мембран. Саме через свою функцію, церулоплазмін вважають досить ефективним антиоксидантом, що здатен попереджати окиснювальне пошкодження ліпідів, ДНК та білків [163, 201, 202].

При введенні мелатоніну активність каталази в крові щурів підвищувалася на 17,6% на 3-ий день експерименту в порівнянні з групою тварин з нефропатією. На 7-ий день активність каталази підвищувалася на 13,9%, в порівнянні з нефропатією, але все ще достовірно відрізнялася від показників групи контрольних тварин. Активність GPx підвищувалася на третій та сьомий день експерименту на 103,5% і 99,6% відповідно, в порівнянні з показниками тварин з нефропатією, але на 7-ий день все ще достовірно відрізнялися від значень 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 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.

Основою патогенезу ниркової патології є розвиток оксидативного стресу, що супроводжується оксидантно-антиоксидантним дисбалансом, і як наслідок – ураженням печінки. Печінка є ключовим органом та відіграє важливу роль в метаболізмі, оскільки приймає участь в збереженні та регулюванні рівня ліпідів, вуглеводів, в синтезі найбільш важливих білків та детоксикації токсичних сполук. Саме тому, вона є схильною до окислювальних пошкоджень [170, 171].

Про ураження печінки свідчить підвищення рівня ГГТ та АЛТ в плазмі крові щурів, що є маркерами захворювання гепатобіліарної системи. Про токсичне ураження печінки свідчить і порушення протеїнсинтезувальної функції, що виявляється в зниженні рівня загального протеїну в плазмі крові як на 3-ій так і на 7-ий день експериментальної нефропатії.

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

Однією з причин змін ОМП може бути неконтрольована інтенсифікація ПОЛ. Відомо, що продукти ПОЛ, зокрема малоновий диальдегід, реагуючи з лізиновими залишками білків, спричиняють їх деградацію з утворенням різноманітних цитотоксичних сполук. Інтенсифікація ОМП може бути наслідком порушення функціонування захисних протирадикальних систем.

Дисфункція мітохондрій є одним із патогенних факторів пошкодження нирок та призводить не лише до зниження рівня АТФ, а й також і до гіперпродукції АФО, що в свою чергу, викликає окислювальний стрес і запускає запальну реакцію, що призводить до апоптозу клітин [203]. Досить часто порушення функціонування енергетичного метаболізму сприяє прогресуванню нефропатії.

Дихальний ланцюг мітохондрій є основним джерелом АФО, які утворюються як побічний продукт переносу електронів [105, 106]. Саме тому, нами було досліджено активність мітохондріальних ензимів в гепатоцитах щурів.

Активність NADH-убіхінон оксидоредуктази в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією, індукованою фолієвою кислотою знижувалася 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% порівняно з показниками контрольних тварин. Отримані дані свідчать про дисфункцію в I та II комплексі дихального ланцюга.

Активність цитохром с оксидази та H^+-АТФ-ази в мітохондріях гепатоцитів щурів з експериментальною нефропатією знижувалася на 42,0% та 37,5% на 3-ій та на 37,9% та 33,1% на 7-ий день експерименту в порівнянні з контрольною групою тварин.

Електронний потік пов'язаний з генерацією протонного градієнта через внутрішню мембрану, а енергія, що накопичена в протонному градієнті використовується кінцевим комплексом V для вироблення АТФ [174]. При нефропатії, індукованою фолієвою кислотою знижувалася ефективність фосфорилювання, при окисленні як НАДН+H^+, так і $ФАДН_2$, що, відповідно, і впливало на активність цитохром с оксидази та продукцію АТФ.

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.

Також, нами виявлені зміни вмісту вільних SH-груп в мітохондріальній фракції печінки щурів з експериментальною нефропатією. Спостерігалося зниження вмісту SH-груп на 30,9% (3-ій день) та на 33,2% (7-ий день) порівняно з групою контрольних тварин.

Окиснення SH-вміснісних сполук оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули. Окрім того, тіолові сполуки важливі компоненти підтримання окисно-відновного гомеостазу у клітинах і тканинах. Зміни вмісту SH-груп, ймовірно, пов'язане з високою інтенсивністю генерації АФО, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів в мітохондріях печінки.

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 досягало показників контрольних тварин.

При нефропатії знижувалась здатність мітохондрій окислювати субстрати, генеровані НАДН та FAD, а зниження продукції АТФ в мітохондріях печінки, ймовірно, пов'язано з пригнічуючим впливом нефропатії, індукованою фолієвою кислотою на мітохондріальні ферменти. Таким чином, при 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.

Застосування мелатоніну зменшувало деградація тканин, про що свідчить зниження інтенсивності перекисного окислення ліпідів, та вмісту похідних карбонілу. Мелатонін покращував здатність мітохондрій окислювати субстрати, як генеровані НАДН, так і ФАД, має позитивний вплив на цитохром с оксидазну та H^+-АТФазну активності, що, ймовірно, сприяло покращанню мітохондріального зчеплення при окислювальному стресі, викликаному нефропатією. Мелатонін, завдяки своїм антиоксидантним властивостям здатен покращувати функціонування

дихальних комплексів за рахунок поглинання вільних радикалів, зниження рівня оксидативного стресу, обмеження апоптозу, підтримання ефективності комплексів дихального ланцюга та забезпечення достатнього рівня утворення АТФ, що виникають при експериментальних нефропатіях.

Припускаємо, що мелатонін може взаємодіяти з комплексами дихального ланцюга мітохондрій, віддаючи та приймаючи електрони, цим самим покращуючи електронний потік. Його антиоксидантна дія та взаємодія з мітохондріальними комплексами здатна покращувати роботу дихального ланцюга та забезпечувати достатнє виробництво АТФ [118].

Здатність мелатоніну накопичуватися в мітохондріях відіграє важливу роль для лікування патологій, пов’язаних з виникненням оксидативного стресу порівняно з іншими антиоксидантами, що не здатні проникати через мітохондріальні мембрани.

Безпосередньо приймаючи участь в процесах детоксифікації АФО мелатонін збільшує синтез АТФ і за рахунок підтримання високих рівнів мітохондріального GSH, захищаючи, таким чином, мітохондріальні білки та ДНК від окислювального пошкодження [71, 75].

Мітохондрії – органели, що володіють ключовими функціями в адаптивних та дезадаптивних реакціях, а також активно приймають участь в шляхах загибелі клітин, таких як апоптоз, некроз та аутофагія [204]. В умовах збільшення проникності мітохондріальної мембрани через відкриття пор переходу мітохондріальної проникності, такі проапоптичні фактори, як цитохром с та фактор, викликаючий апоптоз (AIF) потрапляють в цитозоль. Завдяки своїй амфіфільності мелатонін, потрапляючи в клітину блокує каскад реакцій, що призводить до пригнічення вивільнення цитохрому с та інгібування утворення апоптосом та каспази 3, в результаті чого клітини отримують сигнал, що сигналізують про виживання [93].

Як показують дослідження, проникність мітохондрій збільшується через відкриття пори переходу мітохондріальної проникності (mPTP), що призводить до деполяризації мітохондріальної мембрани, її набуханню та

подальшої активації шляхів апоптозу та некрозу. Саме тому mPTP розглядається як остання стадія загибелі клітин [205, 206]. Дослідження показують, що застосування гормону інгібує mPTP, протидіє набуханню мітохондрій та деполяризації мембран, попереджаючи, таким чином, вивільнення цитохрому с, а також перекисному окисненню кардіоліпіна [207, 208]. Вважається, що пригнічення mPTP опосередковане MT1 взаємодією [209] протидіє окислювальному стресу.

Кардіоліпін – фосфоліпід, важливий компонент внутрішньої мембрани мітохондрій, який необхідний для функціонування багаточисленних ензимів, що приймають участь в енергетичному обміні [208].

Роль мелатоніну в якості модулятора протизапального процесу пов’язана зі встановленням рівноваги між про- та протизапальними цитокінами [210, 211]. Крім того мелатонін пригнічує експресію циклоксигенази та індуцибельної синтази оксиду нітрогена (iNOS), що відіграє роль в попередженні синтезу надмірної кількості простаноїдів, лейкотрієнів та NO, а також інших медіаторів запального процесу, таких як хемокіни та молекули адгезії. [210, 212].

Протизапальна дія мелатоніну полягає і в пригніченні експресії генів інфламасом NLRP3, інгібуючи, таким чином, каспазу 1 та інтерлейкін 1β. Інфламасома запускає запальний сигнальний каскад, що призводить до піроптозу – форма запрограмованої загибелі клітин, подібна до апоптосоми, яка програмує смерть клітин по шляху апоптозу [213, 214].

Нами встановлено і зміни активності антиоксидантних ензимів в гепатоцитах щурів з експериментальною нефропатією. Підвищення активності SOD на 3-ій день експерименту на 30,4% та активності каталази на 3 та 7 день на 24,9% та 19,4% відповідно, порівняно з групою контрольних тварин, і свідчить про активацію цих ензимів у відповідь на зростання АФО.

SOD – представляє собою групу металоферментів, які каналізують реакцію дисмутації $O_2^{\cdot-}$ до H_2O_2, цим самим зменшуючи кількість

супероксидних аніон-радикалів [186] та складають першу лінію захисту від вільнорадикального окиснення.

Супероксид аніон-радикал – це негативно заряджений вільний радикал, що утворюється як результат одноелектронного відновлення кисню. Сам по собі він помірно реакційноздатний, але приймає участь в реакціях з утворенням більш активних форм оксигену та нітрогену, таких як H_2O_2 та $ONOO^-$ [215]. Однак, H_2O_2 в присутності відновлених перехідних металів (Fe^{2+}) за допомогою реакції Фентона також може піддаватися перетворенням у високореакційноздатний гідроксильний радикал. Хоча каталаза здатна нейтралізувати H_2O_2, перетворюючи його у H_2O та O_2. Обидва ензими, діючи синергічно, відіграють ключову роль у захисті клітин від окислювального пошкодження та підтриманні клітинного окисно-відновлювального гомеостазу [159].

Нами встановлено зниження вмісту 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.

GPx приймає участь в знешкодженні пероксиду гідрогену та гідропероксидів ліпідів, але швидкість реакцій знешкодження цих сполук залежить від вмісту відновленого глутатіону в клітинах. Тому, таке зниження активності GPx може бути результатом зниженого вмісту GSH. Активність GST, як і GPx залежить від концентрації відновленого глутатіону, оскільки з цим ензимом кон′югують токсичні сполуки, в тому числі продукти пероксидного окиснення біополімерів, які утворюються в результаті активації вільнорадикальних процесів. Відомо, що активність GPx і GST найвищою є в печінці, у зв’язку з провідною роллю даного органу в знешкодженні токсичних сполук [187].

Розташовані на поверхні білкової молекули SH- групи здатні інактивувати АФО, окислюючись до дисульфідів, таким чином, захищаючи

внутрішні ділянки протеїнів від пошкоджень. Сульфгідрильна група (-SH) глутатіону приймає участь в реакціях відновлення та кон'югації, що є найбільш важливими функціями GSH, та забезпечує видалення пероксидів та інших ксенобіотиків. GSH також приймає участь у білковому та вуглеводневому обмінах, впливаючи на процеси гліколізу в тканинах та виявляючи гепатопротекторну дію.

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.

Зростання вмісту GSH, ймовірно, свідчить про встановлення тіол-дисульфідної рівноваги, яка необхідна для здійснення таких процесів, як функціонування мембранних структур і цитоскелету, клітинного поділу, регуляції активності гормонів.

Такий вплив мелатоніну на антиоксидантну систему може бути зумовлений тим, що мелатонін може легко проходити через клітинні мембрани, завдяки своїй високій ліпофільності та гідрофільності, цим самим безпосередньо впливаючи на рівень вільних радикалів, сприяючи зниженню окислювального стресу (рис. 5.1). Або ж стимулюючи активність ряду антиоксидантних ензимів, таких як SOD, каталаза, GST та GPx [186].

GPx використовує відновлений глутатіон в якості субстрату для переносу електронів на H_2O_2, перетворюючи його в дві молекули води, тим самим перешкоджаючи утворенню вільного гідроксильного радикалу через

реакцію Фентона. Також мелатонін стимулює активність глутатіонредуктази (GRd) та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6PD) [73]. GRd використовує НАДФН в якості кофактора, рівні якого відновлюються G6PD. Стимуляція активності цих ферментів призводить до відновлення концентрації глутатіону - головного внутрішньоклітинного антиоксиданта.

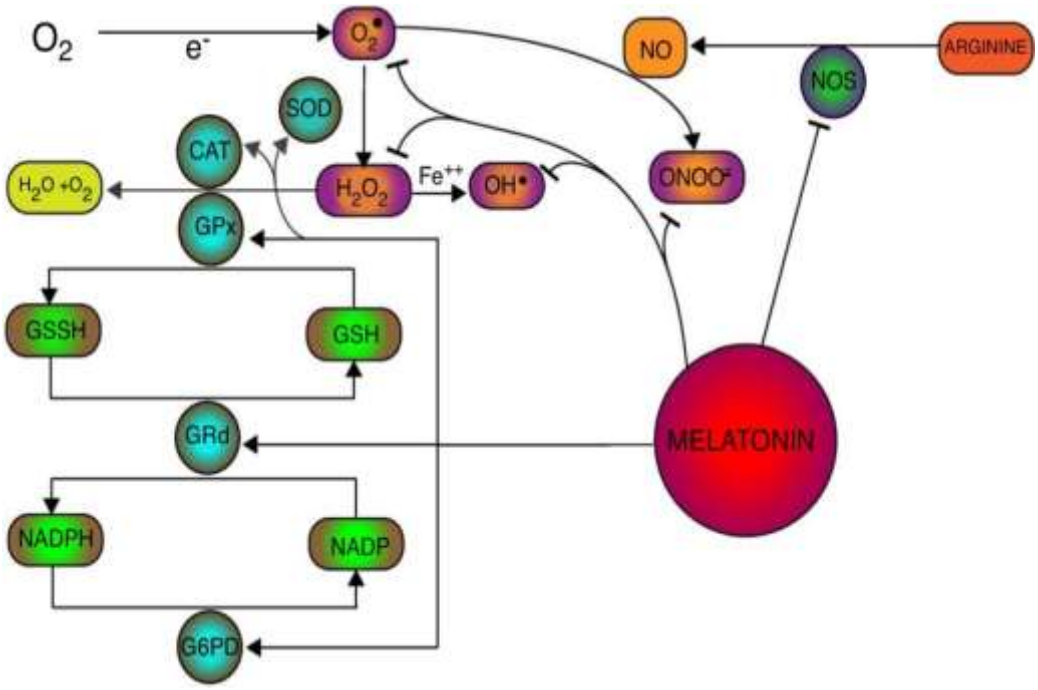

Рис. 5.1. Механізм антиоксидантної дії мелатоніну [73]

За останнє десятиліття гідроген сульфід зацікавив вчених як газотрансмітер та важлива сигнальна молекула, поряд із монооксидом вуглецю (CO) та монооксидом азоту (NO) [27, 28]. H_2S регулює безліч фізіологічних та патофізіологічних процесів в різноманітних клітинах та тканинах і діє як судиннорозширюючий, цитопротекторний та протизапальний засіб при низьких концентраціях, але також здатний викликати цитотоксичну дію при більш високих концентраціях.

З’ясовано, що на 3-ій експериментальний день спостерігалося зниження концентрації гідроген сульфіду в печінці щурів на 37,92% та продукції гідроген сульфіду на 34,84%, що супроводжувалося і зниженням активності

H_2S-синтезуючих ензимів: цистатіонін-γ-ліази на 38,98%, цистатіонін-β-синтази на 33,73% та цистеїноамінотрансферази на 26,76% в порівнянні з тваринами контрольної групи. На 7-ий день розвитку нефропатії концентрація гідроген сульфіду знижувалася на 45,2%, а продукція - на 27,9% в порівнянні з показниками контрольної групи тварин, але все ще відрізнялася від показників контролю. Активність H_2S-продукуючих ензимів на 7 день експериментальної нефропатії також знижувалася: 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.

Хоча експресія CSE найбільша саме в печінці, відсутність позитивного ефекту після введення мелатоніну ми пов’язуємо з цитолізом гепатоцитів.

Зміни в системі H_2S при експериментальній нефропатії, можуть призводити до порушення внутрішньоклітинного метаболізму, формування нативної структури білків, синтезу глутатіону та інших важливих біологічно активних сполук.

Позитивний вплив мелатоніну на систему H_2S можливий за рахунок здатності мелатоніну безпосередньо перехоплювати вільні радикали, знижуючи окислювальний стрес, та забезпечуючи ефективне функціонування

дихального ланцюга мітохондрій [187]. Також H_2S збільшує активність цистин/глутаматного антипортера, тим самим збільшуючи транспорт цистину в клітини, де той, в свою чергу, відновлюється до цистеїну та включається в глутатіон – основний внутрішньоклітинний антиоксидант [19]. А цистеїн, що міститься в складі глутатіону, в свою чергу, приймає участь в метаболізмі гідроген сульфіду.

H_2S посилює активність GCL – ензим, що каталізує реакцію синтезу глутатіону, цим самим збільшуючи його вміст. Саме через зв'язок H2S – цистеїн – GSH гідроген сульфід може функціонувати як попередник L-цистеїну і глутатіону, завдяки чому здійснюється цитопротекторна дія H2S [21, 216]. Крім того, H_2S посилює перерозподіл GSH в мітохондрії – основне джерело АФО [41]. Відповідно, гідроген сульфід, що утворюється в мітохондріях відіграє важливу роль в консервації клітин в умовах окислювального стресу.

Дані зміни свідчать про здатність мелатоніну підвищувати вміст H_2S, який сам здатний забезпечувати захист клітин від окислювального стресу та сприяє підвищенню рівня відновленого глутатіону [19].

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.

ВИСНОВКИ

Результати експериментальних досліджень розширюють уявлення щодо ефекту мелатоніну на розвиток окислювального стресу, антиоксидантну системи крові та печінки, його корегуючий вплив на систему енергозабезпечення в мітохондріях гепатоцитів та обмін гідроген сульфіду за умов нефропатії, індукованою фолієвою кислотою.

1. На моделі нефропатії, індукованої високими дозами фолієвої кислоти виявили зміни біохімічних показників, що характеризують функціональний стан нирок та печінки, а також оксидантно-антиоксидантної системи крові щурів, які проявлялися в підвищення концентрації креатиніну ($p<0,05$) та сечовини ($p<0,05$), вмісту ТБК-ап ($p<0,01$), а також ОМП370 та ОМП430 ($p<0,01$) – як на 3-ій, так і на 7-ий день нефропатії; активностей ГГТ та АЛАТ ($p<0,05$) - на 3-ій день, а також зниженні вмісту загального протеїну ($p<0,05$) на 3-ій та 7-ий день, що свідчить про погіршення фільтраційної функції нирок, порушення функції печінки та посилення процесів вільнорадикального окиснення біомолекул. Спостерігали зниження активності антиоксидантних ензимів: SOD ($p<0,05$), каталази ($p<0,01$) та GPx ($p<0,01$) - на 3-ій та 7-ий день, GST ($p<0,05$) - на 7-ий день в порівнянні зі значеннями контролю. З’ясовано, що саме 7-ми денне введення екзогенного мелатоніну знижує прояви нефротичного синдрому та вільнорадикального окиснення біомолекул, а також має нормалізуючий вплив на антиоксидантну систему крові, що зумовлено його здатністю нейтралізувати вільні радикали та активувати антиоксидантні ензими.

2. Встановлено посилення процесів окиснення ліпідів та протеїнів в постмітохондріальній фракції гепатоцитів, про що свідчить підвищення вмісту як на 3-ій так і на 7-ий день: ТБК-ап ($p<0,05$), вмісту ОМП370 $p<0,05$, а також ОМП430 ($p<0,05$) - на 7-ий день виникнення нефропатії порівняно із значеннями контролю. Експериментальна нефропатія призводила і до змін в системі енергозабезпечення гепатоцитів, що проявлялося в пригніченні

ензимів дихального ланцюга мітохондрій, і, відповідно, утворенні АТФ. Застосування мелатоніну зменшувало деградація тканин та покращувало функціонування дихальних комплексів, дозволяючи уникнути генерації вільних радикалів, ймовірно, за рахунок амфіфільної природи мелатоніну, здатності накопичуватися в мітохондріях та можливої взаємодії з мітохондріальними комплексами.

3. Доведено, що нефропатія призводить до зміни в антиоксидантній системі печінки. Активність SOD ($p<0,01$) зростала на 3-ій день; каталази ($p<0,05$) на 3 та 7 день. Вміст GSH ($p<0,05$) та GP_x ($p<0,05$) знижувалася на 3-ій та 7-ий день, GST ($p<0,01$) на 3-ий день виникнення нефропатії. Мелатонін нормалізував активність ряду антиоксидантних ензимів, в тому числі і ензимів синтезу глутатіону – важливого внутрішньоклітинного антиоксиданта.

4. З'ясовано, що за умов експериментальної нефропатії знижувалася концентрація та продукції H_2S ($p<0,01$) в печінці щурів на 3 день на 7 день, що супроводжувалося і зниженням активності H_2S-синтезуючих ензимів ($p<0,01$) як на 3-ій так і на 7-ий день, порівняно з показниками контрольних тварин. Введення мелатоніну сприяло підвищенню вмісту H_2S, як за рахунок підвищення активності H_2S-генеруючих ензимів, так, ймовірно, і за рахунок здатності мелатоніну підтримувати адекватні рівні відновленого глутатіону, який як цистеїнвмісний трипептид здатний включатися в процеси синтезу H_2S.

5. Встановлено, однонаправлені зміни між порушенням обміну гідроген сульфіду та змінами оксидантно-антиоксидантної системи печінки щурів за умов розвитку нефропатії та введення мелатоніну. Зокрема, спостерігається зростання продукції та концентрації гідроген сульфіду, активності H_2S-продукуючих ензимів, а також ензимів антиоксидантного захисту та вмісту GSH, що зумовлено тим, що мелатонін забезпечує підвищення вмісту H_2S, який володіє властивостями захищати клітини від окисного стресу, як за

рахунок своєї здатності підвищувати рівень глутатіону, так і за рахунок активації антиоксидантних ензимів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Gasparini M, Khan S, Patel JM et al. Renal impairment and its impact on clinical outcomes in patients who are critically ill with COVID-19: a multicentre observational study. Anaesthesia. 2021; 76(3): 320-326.
2. Gerush IV, Bevzo VV, Ferenchuk YeO. The effect of melatonin on lipid peroxide oxidation, oxidative modification of proteins and mitochondria swelling in the skeletal muscle tissue of rats under alloxan diabetes. Ukr. Biochem. J. 2018; 90:62-69.
3. Yuan T, Yang T, Chen H et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. Redox Biol. 2019; 20: 247-260.
4. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. Journal of the Formosan Medical Association 2018; 117(8): 662-675.
5. Irazabal M, Torres V. Reactive Oxygen Species and Redox Signaling in Chronic Kidney Disease. Cells, 2020; 9(6): 1342.
6. Li X, Zou Y, Xing J, Fu YY, Wang KY, Wan PZ, Zhai XY. Pretreatment with Roxadustat (FG-4592) Attenuates Folic Acid-Induced Kidney Injury through Antiferroptosis via Akt/GSK-3β/Nrf2 Pathway. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020: 1–17.
7. Yang HC, Zuo Y, Fogo AB. Models of chronic kidney disease. Drug discovery today. Disease models. 2010; 7(1-2): 13–19.
8. Newbury LJ, Wang JH, Hung G, Hendry BM, Sharpe CC. Inhibition of Kirsten-Ras reduces fibrosis and protects against renal dysfunction in a mouse model of chronic folic acid nephropathy. Sci Rep. 2019; 9(1): 14010.
9. Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri R. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. Exper. and Toxic. Pathol. 2012; 64(3): 225.

10. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. Nat Rev Nephrol. 2018;14(10):607-25.
11. Black LM, Lever JM, Agarwal A. Renal Inflammation and Fibrosis: A Double-edged Sword. J Histochem Cytochem. 2019; 67(9): 663-681.
12. Juybari KB, Hosseinzadeh A, Ghaznavi H et al. Melatonin As a Modulator of Degenerative and Regenerative Signaling Pathways in Injured Retinal Ganglion Cells. Curr Pharm.2019; 25(28): 3057-73.
13. Xiao Q, Ying J, Xiang L, Zhang C. The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. Medicine, 2018; 97(44): p.e13065.
14. Corsello T, Komaravelli N, Casola A. Role of Hydrogen Sulfide in NRF2- and Sirtuin-Dependent Maintenance of Cellular Redox Balance. Antioxidants, 2018; 7(10), 129.
15. Tan DX, Reiter RJ. Mitochondria: the birth place, battle ground and the site of melatonin metabolism in cells. Melatonin Research. 2019; 2(1): 44-66.
16. Banerjee A, Chattopadhyay A, Pal P, Bandyopadhyay D. Melatonin is a potential therapeutic molecule for oxidative stress induced red blood cell (RBC) injury : A review. Melatonin Research. 2020; 3: 1-31.
17. Bahrampour Juybari K, Pourhanifeh MH, Hosseinzadeh A, Hemati K, Mehrzadi S. Melatonin potentials against viral infections including COVID-19: Current evidence and new findings. Virus Res. 2020;287:198108.
18. Wagner C. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. J. Nephrol. 2009; 22 (2): 173–176.
19. Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. Antioxidants & redox signaling. 2014; 20(5): 783–793.
20. Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H2S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. EMBO J. 2014;20:6008–16.

21. Kimura H. Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide. Antioxidants & redox signaling. 2015; 22(5): 362–76.
22. Olas B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. Clin. Chim. Acta. 2015;439:212–218.
23. Yang W, Yang G, Jia X, et al. Activation of KATP channels by H2S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. J Physiol. 2010;569:519–31.
24. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Wang XY, Bian JS. Implications of hydrogen sulfide in liver pathophysiology: Mechanistic insights and therapeutic potential. J. Advanced Research. 2021; 27: 127-135.
25. Wu DD, Wang DY, Li HM, Guo JC, Duan SF, Ji XY. Hydrogen Sulfide as a Novel Regulatory Factor in Liver Health and Disease. Oxid Med Cell Longev. 2019: 3831713.
26. Заічко Н.В. Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфіду в плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв’язок з поліморфізмом C677T в гені метилентетрагідрофолатредуктази. Експер. та кл. фіз. і біохімія. 2010; 4: 35–41.
27. Szabo C, Papapetropoulos A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H_2S Levels: H_2S Donors and H_2S Biosynthesis Inhibitors. Pharmacological reviews. 2017; 69(4): 497–564.
28. Wei W, Wang C, Li D. The content of hydrogen sulfide in plasma of cirrhosis rats combined with portal hypertension and the correlation with indexes of liver function and liver fibrosis. Exp. Ther. Med. 2017; 14(5): 5022–5026.
29. Cao X, Ding L, Xie ZZ, Yang Y, Whiteman M, Moore PK, Bian JS. A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? Antioxid Redox Signal. 2019; 31(1): 1-38.

30. Loiselle JJ, Yang G, Wu L. Hydrogen sulfide and hepatic lipid metabolism - a critical pairing for liver health. Br. J. Pharmacol. 2020; 177(4): 757-768.
31. Zhang N, Zheng Y, Chen WG, Li R, Song LX, Xu LH, et al. Changes in hydrogen sulfide in rats with hepatic cirrhosis in different stages. Curr. Med. Sci. 2017; 37(5): 705-710.
32. Shibuya N, Koike S, Tanaka M, et al. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. Nat Commun. 2013; 4: 1366.
33. Jackson MR, Melideo SL, and Jorns MS. Role of human sulfide: quinone oxidoreductase in H_2S metabolism. Methods Enzymol. 2015; 554: 255–270.
34. Jackson MR, Melideo SL, Jorns MS. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. Biochemistry. 2012;51(34):6804-15.
35. Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. Biochem Pharmacol. 2001;62(2):255-259.
36. Bostelaar T, Vitvitsky V, Kumutima J, et al. Hydrogen Sulfide Oxidation by Myoglobin. J Am Chem Soc. 2016;138(27):8476-88.
37. Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H. Changes in arterial hydrogen sulfide (H(2)S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. J Infect. 2003;47(2):155-160.
38. Mok YYP, Atan M, Bin MS, et al. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. Br J Pharmacol. 2004;143: 881–889.
39. Zhi-Zhong X, Yang L, Jin-Song B. HydrogenSulfide and Cellular Redox Homeostasis. Oxid Med Cell Longev. 2016.

40. Corsello T, Komaravelli N, Casola A. Role of Hydrogen Sulfide in NRF2- and Sirtuin-Dependent Maintenance of Cellular Redox Balance. Antioxidants. 2018; 7(10):129.
41. Shefa U, Kim MS, Jeong NY, Jung J. Antioxidant and Cell-Signaling Functions of Hydrogen Sulfide in the Central Nervous System. Oxid Med Cell Longev. 2018: 1873962.
42. Scammahorn JJ, Nguyen ITN, Bos EM, Van Goor H, Joles JA. Fighting Oxidative Stress with Sulfur: Hydrogen Sulfide in the Renal and Cardiovascular Systems. Antioxidants. 2021; 10(3): 373.
43. Amaral JH, Rizzi ES, Alves-Lopes R, Pinheiro LC, Tostes RC, Tanus-Santos JE. Antioxidant and antihypertensive responses to oral nitrite involves activation of the Nrf2 pathway. Free Radic. Biol. Med. 2019; 141: 261–268.
44. Tabassum R, Jeong NY. Potential for therapeutic use of hydrogen sulfide in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases. International journal of medical sciences, 2019; 16(10): 1386–1396.
45. Guo C, Liang F, Shah Masood W, Yan X. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF-κB dependent anti-inflammation pathway. Eur J Pharmacol. 2014;725:70-78.
46. Liu J, Wu J, Sun A, et al. Hydrogen sulfide decreases high glucose/palmitate-induced autophagy in endothelial cells by the Nrf2-ROS-AMPK signaling pathway. Cell Biosci. 2016;6:33.
47. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(46):17977-82.
48. Paul BD, Snyder SH. H2S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration. Trends Biochem Sci. 2015;40(11):687-700.

49. Zhang D, Du J, Tang C, Huang Y, Jin H. H_2S-Induced Sulfhydration: Biological Function and Detection Methodology. Front Pharmacol. 2017;8:608.
50. Paul BD, Snyder SH. H2S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration. Trends Biochem Sci. 2015;40(11):687-700.
51. Yang G, Zhao K, Ju Y, et al. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. Antioxid Redox Signal. 2013;18(15):1906-1919.
52. Cao X, Zhang W, Moore PK, Bian J. Protective Smell of Hydrogen Sulfide and Polysulfide in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. International journal of molecular sciences. 2019; 20(2): 313.
53. Ngowi EE, Sarfraz M, Afzal A, et al. Roles of Hydrogen Sulfide Donors in Common Kidney Diseases. Front Pharmacol. 2020; 11: 564281.
54. Yuan X, Zhang J, Xie F, et al. Loss of the protein cystathionine β-synthase during kidney injury promotes renal tubulointerstitial fibrosis. Kidney Blood Press. Res. 2017; 42: 428–443.
55. Sun H-J, Wu Z-Y, Cao L, et al. Hydrogen Sulfide: Recent Progression and Perspectives for the Treatment of Diabetic Nephropathy. Molecules. 2019; 24(15):2857.
56. Song K, Wang F, Li Q, et al. Hydrogen sulfide inhibits the renal fibrosis of obstructive nephropathy. Kidney Int. 2014; 85(6), 1318–1329.
57. Bos EM, Wang R, Snijder PM, et al. Cystathionine gamma-lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. J. Am. Soc. Nephrol. JASN. 2013; 24(5), 759–770.
58. Bos EM, van Goor H, Joles JA, Whiteman M, Leuvenink HG. Hydrogen sulfide: physiological properties and therapeutic potential in ischaemia. Br J Pharmacol. 2015;172(6):1479-1493.

59. Maassen H, Hendriks KDW, Venema LH, et al. Hydrogen sulphide-induced hypometabolism in human-sized porcine kidneys. PLoS ONE. 2019; 14(11): e0225152.
60. Leigh J, Juriasingani S, Akbari M, et al. Endogenous H_2S production deficiencies lead to impaired renal erythropoietin production. Can. Urol. Assoc. J. 2018; 13: 210–219.
61. Kuang Q, Xue N, Chen J, et al. Low plasma hydrogen sulfide is associated with impaired renal function and cardiac dysfunction. Am. J. Nephrol. 2018; 47(5): 361–371.
62. Lee HJ, Feliers D, Barnes JL, et al. Hydrogen sulfide ameliorates aging-associated changes in the kidney. GeroScience. 2018; 40(2): 163–176.
63. Morales-Loredo H, Barrera A, Garcia JM, et al. Hydrogen sulfide regulation of renal and mesenteric blood flow. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2019; 317(5): 1157-1165.
64. Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2012; 109(23): 9161–9166.
65. Pieretti JC, Junho C, Carneiro-Ramos MS, Seabra AB. H_2S- and NO-releasing gasotransmitter platform: A crosstalk signaling pathway in the treatment of acute kidney injury. Pharmacological research. 2020; 161: 105121.
66. Stomberski CT, Hess DT, Stamler JS. S-Nitrosylation Protein. Determinants of specificity and enzymatic regulation of S-Nitrosothiol-Based signaling. Antioxidants Redox Signal. 2019; 30(10): 1331–1351.
67. Zhang R, Wang X, Gao Q, et al. Taurine supplementation reverses diabetes-induced podocytes injury via modulation of the CSE/TRPC6 Axis and improvement of mitochondrial function. Nephron. 2020; 144(2): 84–95.

68. Yi J, Yuan Y, Zheng J, Hu N. Hydrogen sulfide alleviates uranium-induced kidney cell apoptosis mediated by ER stress via 20S proteasome involving in Akt/GSK-3β/Fyn-Nrf2 signaling. Free Rad. Res. 2018; 52(9), 1020–1029.
69. Han SJ, Kim JI, Park JW, Park KM. Hydrogen sulfide accelerates the recovery of kidney tubules after renal ischemia/reperfusion injury. Nephrol Dial Transplant. 2015; 30(9): 1497-1506.
70. Tan Z, Shi Y, Yan Y, Liu W, Li G, Li R. Impact of endogenous hydrogen sulfide on toll-like receptor pathway in renal ischemia/reperfusion injury in rats. Ren Fail. 2015; 37(4):727-733.
71. Ahmad A, Olah G, Szczesny B, Wood ME, Whiteman M, Szabo C. AP39, A Mitochondrially Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Exerts Protective Effects in Renal Epithelial Cells Subjected to Oxidative Stress in Vitro and in Acute Renal Injury in Vivo. Shock. 2016; 45(1): 88-97.
72. Song K, Wang F, Li Q, et al. Hydrogen sulfide inhibits the renal fibrosis of obstructive nephropathy. Kidney Int. 2014; 85(6): 1318-1329.
73. Raza Z, Naureen Z. Melatonin ameliorates the drug induced nephrotoxicity: Molecular insights. Nefrologia. 2020; 40(1): 12-25.
74. Della Coletta Francescato H, Cunha FQ, Costa RS, et al. Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage. Nephrol Dial Transplant. 2011; 26(2): 479-488.
75. Zhou X, Feng Y, Zhan Z, Chen J. Hydrogen sulfide alleviates diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model. J Biol Chem. 2014;289(42): 28827-34.
76. Yuan P, Xue H, Zhou L, et al. Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. Nephrol Dial Transplant. 2011; 26(7): 2119-26.
77. Геруш ІВ, Лугініч НМ. Вплив 14 добового введення мелатоніну на продукцію гідроген сульфіду у печінці щурів з алоксаніндукованим

цукровим діабетом. Вісник проблем біології і медицини. 2019; 2 (149): 126–129.

78. Liu Y, Zhao H, Qiang Y, et al. Effects of hydrogen sulfide on high glucose-induced glomerular podocyte injury in mice. International journal of clinical and experimental pathology. 2015; 8(6): 6814–6820.
79. Wang Y, Shi S, Dong S, Wu J, Song M, Zhong X, Liu Y. Sodium hydrosulfide attenuates hyperhomocysteinemia rat myocardial injury through cardiac mitochondrial protection. Mol Cell Biochem. 2015; 399(1-2): 189-200.
80. Li JJ, Li Q, Du HP, et al. Homocysteine Triggers Inflammatory Responses in Macrophages through Inhibiting CSE-H2S Signaling via DNA Hypermethylation of CSE Promoter. International journal of molecular sciences. 2015; 16(6): 12560–12577.
81. Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide. Curr Med Chem. 2014; 21(32): 3662-72.
82. Sen U, Sathnur PB, Kundu S, et al. Increased endogenous H2S generation by CBS, CSE, and 3MST gene therapy improves ex vivo renovascular relaxation in hyperhomocysteinemia. Am J Physiol Cell Physiol. 2012; 303(1): 41-51.
83. Sen U, Basu P, Abe OA, et al. Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. Am J Physiol Renal Physiol. 2009; 297(2): 410-419.
84. Singh M, Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. Drug Discov Today. 2014; 19(9): 1410-1418.
85. Comai S, Gobbi G. Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. J Psychiatry Neurosci. 2014; 39(1): 6-21.

86. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougerou C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. Curr Neuropharmacol. 2017; 15(3): 434-443.
87. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. J Pineal Res. 2014; 57(2): 131-146.
88. Anwar MJ, Muhammad BY, Bader AA, Abdulghani M, Mahmood D, Haider M. An insight into the scientific background and future perspectives for the potential uses of melatonin. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences. 2015; 2(3): 139-152.
89. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cell Mol Life Sci. 2014;71(16):2997-3025.
90. Favero G, Franceschetti L, Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. Int J Endocrinol. 2017;1835195.
91. Vlachou M, Siamidi A, Dedeloudi A, Konstantinidou SK, Papanastasiou IP. Pineal hormone melatonin as an adjuvant treatment for COVID-19 (Review). International Journal of Molecular Medicine. 2021;47:47.
92. Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Battagello DS, et al. The absence of maternal pineal melatonin rhythm during pregnancy and lactation impairs offspring physical growth, neurodevelopment, and behavior. Horm Behav. 2018;105:146-156.
93. Tarocco A, Caroccia N, Morciano G. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms andclinical implications for newborn care. Cell Deadh. Dis. 2019, 10, 317.
94. Maitra S, Baidya DK, Khanna P. Melatonin in perioperative medicine: Current perspective. Saudi J Anaesth. 2013; 7(3): 315-321.
95. Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. Eurasian J Med. 2016; 48(2): 135-141.

96. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2016; 56: 361-383.
97. Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. Br J Pharmacol. 2016; 173(18): 2702-2725.
98. Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. Br J Pharmacol. 2016;173(18):2702-25.
99. Boutin JA. Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. Expert Opin Ther Targets. 2016;20(3):303-317.
100. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. Pharmacol Rev. 2010;62(3):343-380.
101. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. J Pineal Res. 2014; 57(2): 131-146.
102. Galano A, Castañeda-Arriaga R, Pérez-González A, Tan DX, Reiter RJ. Phenolic Melatonin-Related Compounds: Their Role as Chemical Protectors against Oxidative Stress. Molecules. 2016; 21(11): 1442.
103. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. Molecules. 2015; 20(10): 18886-906.
104. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. J Pineal Res. 2013; 54(3): 245-257.
105. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. Exp Mol Med. 2019;51(12):1-13.

106. García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial Oxidative Stress and Antioxidants Balance in Fatty Liver Disease. Hepatol Commun. 2018; 2(12): 1425-1439.
107. Morciano G, Bonora M, Campo G, et al. Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. Adv Exp Med Biol. 2017;982:169-189.
108. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis. FEBS J. 2018; 285(3): 416-431.
109. Ugarte-Uribe B, García-Sáez AJ. Apoptotic foci at mitochondria: in and around Bax pores. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2017; 372 (1726): 20160217.
110. Bonora M, Morganti C, Morciano G, et al. Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F_1F_O ATP synthase dimers and C-ring conformation. EMBO Rep. 2017; 18(7):1077-1089.
111. Huo X, Wang C, Yu Z, et al. Human transporters, PEPT1/2, facilitate melatonin transportation into mitochondria of cancer cells: An implication of the therapeutic potential. J Pineal Res. 2017;62(4):28099762.
112. Mayo JC, Sainz RM, González-Menéndez P, Hevia D, Cernuda-Cernuda R. Melatonin transport into mitochondria. Cell Mol Life Sci. 2017;74(21):3927-3940.
113. García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. J Pineal Res. 2014; 56(3) :225-237.
114. Waseem M, Tabassum H, Parvez S. Melatonin modulates permeability transition pore and 5-hydroxydecanoate induced $_{KATP}$ channel inhibition in isolated brain mitochondria. Mitochondrion. 2016;31:1-8.
115. Stacchiotti A, Favero G, Giugno L, Lavazza A, Reiter RJ, Rodella LF, Rezzani R. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. PloS one. 2014; 9(10): e111141.

116. Sinha B, Wu Q, Li W, et al. Protection of melatonin in experimental models of newborn hypoxic-ischemic brain injury through MT1 receptor. J Pineal Res. 2018;64(1).
117. Eirin A, Lerman A, Lerman LO. The Emerging Role of Mitochondrial Targeting in Kidney Disease. Handb Exp Pharmacol. 2017; 240: 229-250.
118. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin′s Antioxidant and Anti-Aging Actions. Molecules. 2018; 23(2): 509.
119. Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. J Pineal Res. 2015;59(4):403-419.
120. García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. J Pineal Res. 2014; 56(3): 225-237.
121. Ganie SA, Dar TA, Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A. Melatonin: A Potential Anti-Oxidant Therapeutic Agent for Mitochondrial Dysfunctions and Related Disorders. Rejuvenation Res. 2016; 19(1):21-40.
122. Reiter RJ, Paredes SD, Korkmaz A, Jou MJ, Tan DX. Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level. Interdiscip Toxicol. 2008; 1(2): 137-149.
123. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Cardinali DP. Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. Int J Alzheimers Dis. 2011: 326320.
124. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? J Pineal Res. 2007; 42(1): 28-42.

125. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of
animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Communities. 276, 33-79.
126. Давиденко ІС. Заходи стандартизації гістохімічної методики на окиснювальню модифікацію білків. Український медичний альманах. 2013;16(3):180-181.
127. Давиденко ІС, Грицюк МІ, Давиденко ОМ. Методика кількісної оцінки результатів гістохімічної реакції з бромфеноловим синім для встановлення співвідношення між аміно-та карбоксильними групами в білках. Вісник морської медицини. 2017; 4(77): 141-148.
128. Назаренко ОА, Сергеєва ТА, Солдаткін ОП. Креатинін та методи його визначення. Біотехнологія. 2009; 2 (1): 107-116.
129. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 1957; 28 (1): 56.
130. Влізло ВВ, Федорук РС, Ратич ІБ та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: СПОЛОМ. 2012: 764 с.
131. Мещишен ІФ. Метод визначення окисно модифікованих білків плазми (сироватки) крові. Буковинський медичний вісник. 1998; 2(1): 156–158.
132. Камышников ВС. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: изд. Беларусь. 2002; 494 с.
133. Beutler E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods. Orlando: Grune & Stration. 1990; 134 p.
134. Карпищенко АИ, Глушков СИ, Смирнов ВВ. Глутатионзависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном. Токсикологический вестник. 1997; 3: 17-23.

135. Мещишен ІФ, Григор’єва НП. Метод кількісного визначення HS-груп у крові. Буковинський медичний вісник. 2002; 6: 190-192.
136. Колб ВГ, Камышников ВС. Справочник по клинической химии. Минск: изд. Беларусь. 1982; 290 с.
137. Дубинина ЕЕ, Сальникова А. Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови. Лабораторное дело. 1983; 10: 30-33.
138. Григор'єва НП, Мацьопа ІВ. Хроноритми активності супероксиддисмутази у нирках щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2008; 1: 41-43.
139. Королюк КА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1: 16-19.
140. Власова СН, Шабунина ЕИ, Перслегина ИА. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. дело. 1990; 8:19-22.
141. Геруш ІВ, Мещишен ІФ. Стан глутатіонової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастродуоденальної зони та дії настойки ехінацеї пурпурової. Вісник проблем біол. та медицини. 1998; 7: 10-15.
142. Habig WH, Pabs MJ, Fleischner G. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1974; 71: 3879-82.
143. Weinbach EC. A procedure for isolating stable mitochondria from rat liver and kidney. Anal Biochem. 1961; 2(4): 335-43.
144. Sharova IV, Vekshin NL. Rotenone-insensitive NADH oxydation in mitochondrial suspension occurs by NADH dehydrogenase of respiratory chain fragments. Biophysic. 2004; 49 (5): 814-21.
145. Прохорова МИ. Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та. 1982: 193-194.

146. Остапченко ЛІ. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій. Київ: Київський університет. 2005: 268 с.
147. Габибов ММ. Влияние гипербарической оксигенации на активность протонной АТР-азы митохондрий различных тканей крыс. Укр. биохим. журн. 1986; 58 (5): 81-83.
148. Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004; 286: 678-85.
149. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. Biochem J. 1982; 206: 267-277.
150. Yang G, Yang W, Wu L, Wang R. H_2S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. J Biol Chem. 2007; 282: 16567-76.
151. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1): 265-75.
152. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион. 2000: 320 с.
153. Kuhn V, Diederich L, Stevenson KellerIV TC, et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemiaegulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. Antioxidants & Redox Signaling. 2017; 26(13); 718-742.
154. Геруш ІВ, Григор’єва НП, Ференчук ЄО. Вплив глутатіону на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Мед. і кл. хімія. 2018; 3: 27-32.
155. Kunutsor SK. Gamma-glutamyltransferase-friend or foe within? Liver Int. 2016; 36(12): 1723-1734.
156. Moriles KE, Azer SA. Alanine Amino Transferase. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): 2021.

157. Ferenchuk Ye, Gerush I, Grigorieva N. Effect of glutathione on oxidant-antioxidant system and the content of hydrogen sulphide in the blood by experimental nephropathy. PharmacologyOnLine. 2020; 1: 113-120.
158. Zhou T, Prather E, Garrison D, Zuo L. Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle. Int J Mol Sci. 2018; 19(2): 417.
159. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2019; 9613090.
160. Hong YA, Park CW. Catalytic Antioxidants in the Kidney. Antioxidants (Basel). 2021; 10(1): 130.
161. Kaur M, Jindal R. Oxidative stress response in liver, kidney and gills of ctenopharyngodon idellus(cuvier & valenciennes) exposed to chlorpyrifos. MOJ Biology and Medicine. 2017; 1(4): 103–112.
162. Лугініч НМ, Геруш ІВ. Вплив введення мелатоніну на стан глутатіонової системи і рівень гідроген сульфіду у крові щурів при алоксановому цукровому діабеті. Укр.біофармацевтичний журнал. 2019; 3(60); 51–56.
163. Kurhaluk N, Tkachenko H, Lukash O, Winklewski P, Wszedybyl-Winklewska M. Melatonin maintains the function of the blood redox system at combined ethanol-induced toxicity and subclinical inflammation in mice. Sleep and Breathing. 2020.
164. Зинчук ВВ, Фираго МЭ. Участие мелатонина в регуляции кислородтранспортной функции крови при окислительном стрессе, вызванном введением липополисахарида. Биомедицинская химия. 2017; 63(6); 520–526.
165. Коляник ІО, Геруш ІВ, Григор’єва НП. Вплив мелатоніну на стан оксидантної та антиоксидантної систем і рівень гідроген сульфіду у крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Мед. та клін. хімія. 2021; 23(1): 37-44.

166. Геруш ІВ, Коляник ІО, Ференчук ЄО. Вплив мелатоніну на каталазну активність крові щурів. Матеріали науково-практичної конференції з Міжнародною участю; Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії; Харків: 12-13 квітня 2018; с.26
167. Геруш ІВ, Коляник ІО, Лопушинська ІВ. Стан окисної модифікації білків крові щурів за умов експериментальної нефропатії та корекції мелатоніном. Матеріали 99-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 12,14,19 лютого 2018; Чернівці: Медуніверситет; 2018: с.61
168. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11,13,18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с.97
169. Коляник ІО. Вплив 3-ох денного введення мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 10,12,17 лютого 2020; Чернівці: Медуніверситет; 2020: с.86
170. Esposti DD, Hamelin J, Bosselut N, et al. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. Biochemistry Research International. 2012.

171. Alamri ZZ. The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis**.** Int. J. Basic Clin.Pharmacol. 2018; 7(11): 2271-6,
172. Dasuri K, Zhang L. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. Free Radic. Biol. Med. 2013; 62: 170-185.
173. Weber D, Davies MJ, Grune T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. Redox Biol. 2015; 5: 367-380.
174. Jara C, Torres AK. Mitochondrial dysfunction as a key event during aging: from synaptic failure to memory loss. Mitochondria and brain disorders.; Greece: 2019.
175. Zhao R, Jiang S, Zhang L, Yu Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). Int. J. Mol. Med. 2019; 44(1): 3-15.
176. Ferenchuk YeO, Gerush IV. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24.
177. Gerush IV, Ferenchuk YeO. Hydrogen sulfide and mitochondria. Biopolym. Cell. 2019; 35(1): 3-15
178. Ishimoto Y, Inagi R. Mitochondria: a therapeutic target in acute kidney injury. Nephrol Dial Transplant. 2016; 31(7): 1062-1069.
179. Jin K, Norris K, Vaziri ND. Dysregulation of hepatic fatty acid metabolism in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2013; 28(2): 313-320.
180. Auger C, Alhasawi A, Contavadoo M, Appanna VD. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. Front Cell Dev Biol. 2015; 3: 40.

181. Xue YP, Kao MC, Lan CY. Novel mitochondrial complex I-inhibiting peptides restrain NADH dehydrogenase activity. Sci. Rep. 2019; 9: 13694.
182. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem Sci. 2000; 25(10): 502-508.
183. Hadrava Vanova K, Kraus M, Neuzil J, Rohlena J. Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. Redox Rep. 2020; 25(1): 26-32.
184. Perez-Gomez R, Magnin V, Mihajlovic Z. Downregulation of respiratory complex I mediates major signalling changes triggered by TOR activation. Sci. Rep. 2020; 10: 4401
185. Juybari KB, Hosseinzadeh A, Ghaznavi H, Kamali M, Sedaghat A, Mehrzadi S, Naseripour M. Melatonin As a Modulator of Degenerative and Regenerative Signaling Pathways in Injured Retinal Ganglion Cells. Curr Pharm Des. 2019; 25(28): 3057-3073.
186. Hacışevki A, Baba B. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: A biochemical approach. Mol. Biol. Clin. Pharm. Approaches. 2018; 59-85.
187. Luhinich N, Gerush I. Effects of 7-day melatonin introduction on the hydrogen sulfide production and glutathione system in the liver of alloxan induced diabetic rats. Georg Med News. 2019;289:135–139.
188. Ferenchuk EO, Gerush IV. Effect of 7-day introduction of glutathione on activities of H_2S-producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. Medical and Clinical Chemistry. 2019; (1): 5-9.
189. Ференчук Є, Геруш ІВ. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфіду у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. Укр. біофарм. журнал. 2018; 1 (58): 18-21.

190. 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.
191. Геруш І.О., Григорʼєва Н.П., Коляник І.О., Ференчук Є.О., Дікал М.В. Вплив мелатоніну на систему гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії. Клінічна та експериментальна патологія. 2018; 3(65): 19-23.
192. Коляник І.О., Геруш І.В. Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів при експериментальній нефропатії. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2020; 4(6): 37-41.
193. Kolianyk I, Gerush I. Melatonin effect on the oxidant state and energy metabolism in the liver mitochondria of rats under conditions of experimental nephropathy. PharmacologyOnline. 2021; 1: 384-394.
194. Коляник І.О., Геруш І.В. Стан системи гідроген сульфіду печінки щурів при експериментальній нефропатії за умов введення мелатоніну. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2021; 1(7): 66-70.
195. Gerush I.V., Kolianyk I.O., Ferenchuk Ye.O., Lopushynska I.V., Riabaia O.V. Melatonin effects on the hepatic hydrogen sulfide system of rats under conditions of experimental nephropathy. Abstracts of the XI-th Parnas Conference - Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3-5 September, 2018; Ukr. Biochem. J; 90; 2018. P. 107.
196. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність в гепатоцитах щурів при експериментальній нефропатії. Матеріали підсумкової 102-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету;

Чернівці, 8,10,15 лютого 2021; Чернівці: Медуніверситет; 2021: с.87.

197. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на сукцинатдегідрогеназну та H^+-АТФ-азну активність в мітохондріях печінки щурів при експериментальній нефропатії. Збірник матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 3.0»; Київ, 26 березня 2021; с.51.
198. Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. Zool Res. 2018 18;39(2):72-86.
199. Feng Y, Prokosch V, Liu H. Current Perspective of Hydrogen Sulfide as a Novel Gaseous Modulator of Oxidative Stress in Glaucoma. Antioxidants. 2021; 10(5):671.
200. Majid AS, Majid AM, Yin ZQ, Ji D. Slow regulated release of H2S inhibits oxidative stress induced cell death by influencing certain key signaling molecules. Neurochem Res. 2013;38(7):1375-93.
201. Das S, Sahoo PK. Ceruloplasmin, a moonlighting protein in fish. Fish Shellfish Immunol. 2018; 82: 460-488.
202. Jerebtsova M, Saraf SL, Lin X, et al. Identification of ceruloplasmin as a biomarker of chronic kidney disease in urine of sickle cell disease patients by proteomic analysis. Am J Hematol. 2018;93(2): 45-47.
203. Shen W, Jiang XX, Li YW, He Q. Mitochondria-mediated disturbance of fatty acid metabolism in proximal tubule epithelial cells leads to renal interstitial fibrosis. 2018; 22:810-819.
204. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. 2018;25(3):486-541.
205. Morciano G, Bonora M, Campo G, et al. Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. Adv Exp Med Biol. 2017;982:169-189.

206. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, et al. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol. 2015;78:142-153.

207. Waseem M, Tabassum H, Parvez S. Melatonin modulates permeability transition pore and 5-hydroxydecanoate induced K_{ATP} channel inhibition in isolated brain mitochondria. Mitochondrion. 2016;31:1-8.

208. Petrosillo G, Moro N, Ruggiero FM, Paradies G. Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. Free Radic Biol Med. 2009;47(7):969-974.

209. Sinha B, Wu Q, Li W, et al. Protection of melatonin in experimental models of newborn hypoxic-ischemic brain injury through MT1 receptor. J Pineal Res. 2018;64(1).

210. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. J Pineal Res. 2013;54(1):1-14.

211. Yu GM, Kubota H, Okita M, Maeda T. The anti-inflammatory and antioxidant effects of melatonin on LPS-stimulated bovine mammary epithelial cells. PLoS One. 2017;12(5):e0178525.

212. Deng WG, Tang ST, Tseng HP, Wu KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. Blood. 2006;108(2):518-524.

213. Cao Z, Fang Y, Lu Y, et al. Melatonin alleviates cadmium-induced liver injury by inhibiting the TXNIP-NLRP3 inflammasome. J Pineal Res. 2017;62(3).

214. Liu Z, Gan L, Xu Y, Luo D, Ren Q, Wu S, Sun C. Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF-κB/GSDMD signal in mice adipose tissue. J Pineal Res. 2017;63(1): 28398673.

215. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. J Cell Biol. 2018;217(6):1915-1928.

216. Rodrigues, C, Percival, SS. Immunomodulatory Effects of Glutathione, Garlic Derivatives, and Hydrogen Sulfide. Nutrients. 2019;11(2): 295.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Геруш І.О., Григор'єва Н.П., Коляник І.О., Ференчук Є.О., Дікал М.В. Вплив мелатоніну на систему гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії. Клінічна та експериментальна патологія. 2018; 3(65): 19-23. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).
2. Коляник І.О., Геруш І.В. Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів при експериментальній нефропатії. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2020; 4(6): 37-41. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).
3. Kolianyk I, Gerush I. Melatonin effect on the oxidant state and energy metabolism in the liver mitochondria of rats under conditions of experimental nephropathy. PharmacologyOnline. 2021; 1: 384-394. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).
4. Коляник І.О., Геруш І.В., Григор'єва Н.П. Вплив мелатоніну на стан оксидантної та антиоксидантної систем і рівень гідроген сульфіду у крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Медична та клінічна хімія. 2021; 23(1): 37-44. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

5. Коляник І.О., Геруш І.В. Стан системи гідроген сульфіду печінки щурів при експериментальній нефропатії за умов введення мелатоніну. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2021; 1(7): 66-70. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

6. Геруш І.В., Коляник І.О., Ференчук Є.О. Вплив мелатоніну на каталазну активність крові щурів. Матеріали науково-практичної конференції з Міжнародною участю; Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії; Харків, 12-13 квітня, 2018; с.26. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

7. Геруш І.В., Коляник І.О., Лопушинська І.В. Стан окисної модифікації білків крові щурів за умов експериментальної нефропатії та корекції мелатоніном. Матеріали 99-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 12,14,19 лютого 2018; Чернівці: Медуніверситет; 2018: с.61. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

8. Gerush I.V., Kolianyk I.O., Ferenchuk Ye.O., Lopushynska I.V., Riabaia O.V. Melatonin effects on the hepatic hydrogen sulfide system of rats under conditions of experimental nephropathy. Abstracts of the XI-th Parnas Conference - Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3-5 September, 2018; Ukr. Biochem. J; 90; 2018. P. 107. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

9. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11,13,18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с.97. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

10. Коляник І.О. Вплив 3-ох денного введення мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність крові щурів за умов експериментальної нефропатії. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; Чернівці, 10,12,17 лютого 2020; Чернівці: Медуніверситет; 2020: с.86. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

11. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність в гепатоцитах щурів при експериментальній нефропатії. Матеріали підсумкової 102-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету; Чернівці, 8,10,15 лютого 2021; Чернівці: Медуніверситет; 2021: с.87. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

12. Коляник І.О. Вплив мелатоніну на сукцинатдегідрогеназну та H^+-АТФ-азну активність в мітохондріях печінки щурів при експериментальній нефропатії. Збірник матеріалів науково-практичної конференції з

міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 3.0»; Київ, 26 березня 2021; с.51. (*Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку*).

ДОДАТОК Б

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю. Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії (Харків, 12-13 квітня, 2018 р.);

(Геруш ІВ, Коляник ІО, Ференчук ЄО. Вплив мелатоніну на каталазну активність крові щурів).

Форма участі – – виступ на секційному засіданні.

2. 99-а підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (Чернівці, 12,14,19 лютого 2018 р.);

(Геруш ІВ, Коляник ІО, Лопушинська ІВ. Стан окисної модифікації білків крові щурів за умов експериментальної нефропатії та корекції мелатоніном).

Форма участі – – виступ на секційному засіданні.

3. XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Kyiv, 3–5 September 2018);

(Gerush IV, Kolianyk IO, Ferenchuk YeO, Lopushynska IV, Riabaia OV. Melatonin effects on the hepatic hydrogen sulfide system of rats under conditions of experimental nephropathy).

Форма участі – постерна доповідь на секційному засіданні.

4. 100-а підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвячена 75-річчю БДМУ (Чернівці, 11, 13, 18 лютого 2019 р.);

(Коляник І.О. Вплив мелатоніну на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії).

Форма участі – – виступ на секційному засіданні.

5. 101-а підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (Чернівці, 10,12,17 лютого 2020 р);

(Коляник І.О. Вплив 3-ох денного введення мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність крові щурів за умов експериментальної нефропатії).

Форма участі – – виступ на секційному засіданні.

6. 102-а науково-практична конференція з міжнародною участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету (Чернівці, 8,10,15 лютого 2021 р);

(Коляник І.О. Вплив мелатоніну на вміст ТБК-активних продуктів та каталазну активність в гепатоцитах щурів при експериментальній нефропатії).

Форма участі – – виступ на секційному засіданні.

7. Науково-практична конференція з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 3.0» (Київ, 26 березня 2021 р);

(Коляник І.О. Вплив мелатоніну на сукцинатдегідрогеназну та H^+-АТФ-азну активність в мітохондріях печінки щурів при експериментальній нефропатії).

Форма участі – заочна.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор
з науково-педагогічної роботи
Буковинського державного
медичного університету
к.мед.н., доцент
_____ Ігор ГЕРУШ
«20» травня 2021р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Вплив мелатоніну на обмін гідроген сульфіду та антиоксидантну систему печінки при експериментальній нефропатії
2. **Установа-розробник, автор:** «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м.Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Коляник І.О.
3. **Джерело інформації:**

3.1. Геруш І.О., Григор'єва Н.П., Коляник І.О., Ференчук Є.О., Дікал М.В. Вплив мелатоніну на систему гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії. Клінічна та експериментальна патологія. 2018; 3(65): 19-23.

3.2. Коляник І.О., Геруш І.В. Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів при експериментальній нефропатії. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2020; 4(6): 37-41.

4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету
5. **Термін впровадження:** лютий – березень 2021
6. **Форма впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає
8. **Обговорено і затверджено на засіданні кафедри** (протокол №16 від 17.05.2021 року)

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри патологічної фізіології
д.мед.н., проф. Юрій РОГОВИЙ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
МОЗ України
проф. _____ Іван КЛІЩ
«28» січня 2021р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Вплив мелатоніну на обмін гідроген сульфіду та антиоксидантну систему печінки при експериментальній нефропатії
2. **Установа-розробник, автор:** Буковинський державний медичний університет, кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м. Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Коляник І.О.
3. **Джерело інформації:** Геруш І.В., Григор'єва Н.П., Коляник І.О., Ференчук Є.О., Дікал М.В. Вплив мелатоніну на систему гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії. Клінічна та експериментальна патологія. 2018; 3(65): 19-23.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
5. **Термін впровадження:** вересень 2020 – лютий 2021 р.
6. **Форма впровадження:** у науковий та освітній процес кафедри медичної біохімії.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає
8. **Обговорено і затверджено на засіданні кафедри** (протокол № *1* від *26 січня 2021 року*).

Відповідальний за впровадження:
д.б.н., професор кафедри медичної біохімії
Тернопільського національного медичного
університету імені І. Я. Горбачевського
МОЗ України Петро ЛИХАЦЬКИЙ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Івано-Франківського національного
медичного університету
д.мед.н., професор
Олег ПАКАЛЮК
«12» лютого 2021р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Вплив мелатоніну на обмін гідроген сульфіду та антиоксидантну систему печінки при експериментальній нефропатії
2. **Установа-розробник, автор:** Буковинський державний медичний університет, кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м.Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Коляник І.О.
3. **Джерела інформації:** Геруш І.О., Григор'єва Н.П., Коляник І.О., Ференчук Є.О., Дікал М.В. Вплив мелатоніну на систему гідроген сульфіду печінки щурів за умов експериментальної нефропатії. Клінічна та експериментальна патологія. 2018; 3(65): 19-23;
   Коляник І.О., Геруш І.В. Вплив мелатоніну на антиоксидантну систему печінки щурів при експериментальній нефропатії. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2020; 4(6): 37-41.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Івано-Франківський національний медичний університет
5. **Термін впровадження:** лютий – березень 2021
6. **Форма впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає
8. **Обговорено і затверджено на засіданні кафедри** (протокол № 2 від 9.02.2021 року)

Відповідальний за впровадження:
В.о. завідувача кафедри біологічної
та медичної хімії імені академіка Г.О. Бабенка
к.біол.н., доцент Тарас МАКСИМЧУК