

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 577.1:661.29:577.112.3:599.323.4

DOI 10.11603/2415-8798.2019.1.10029

©В. М. Нечипорук¹, Н. В. Заїчко¹, А. В. Мельник¹, Р. С. Остренюк¹, М. М. Корда²

*Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова¹
ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”²*

ВПЛИВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ НА МЕТАБОЛІЗМ СІРКОВІСНИХ АМІНОКИСЛОТ У НИРКАХ ЩУРІВ ПРИ ГІПЕР- ТА ГІПОТИРЕОЗІ

Резюме. Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є незалежним фактором ризику передчасного атеросклеротичного захворювання судин і тромбозу вен. Відомо, що гіпотиреоз пов'язаний із легкою формою ГГЦ, підвищеним ризиком серцево-судинних захворювань, ішемічної хвороби серця. Висока концентрація загального гомоцистеїну (ГЦ) в плазмі крові є незалежним фактором ризику атеросклерозу. Встановлено, що хворі на гіпотиреоз мають помірно підвищені рівні ГЦ, які нормалізуються при замісній гормонотерапії.

Мета дослідження – встановити вплив експериментального гіпер- та гіпотиреозу при ГГЦ на процеси реметилювання та десульфуровання сірковмісних амінокислот у нирках, вміст ГЦ, цистеїну, H_2S в сироватці крові тварин.

Матеріали і методи. Дослідження виконано на білих щурах-самцях, яким моделювали ГГЦ, гіпер- та гіпотиреоз, ГГЦ із різною функцією щитоподібної залози. В нирках визначали активність S-аденозилметіонінсинтети (S-АМС), S-аденозилгомоцистеїнгідролази (S-АГГ), бетаїноггомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ), цистатіонін- β -синтази (ЦБС), цистатіонін- γ -ліази (ЦТЛ) і цистеїнамінотрансферази (ЦАТ), γ -глутамілцистеїнілази (γ -ГЦЛ) цистеїндіоксигенази (ЦДО), сульфат оксиди, тіосульфат-дитіосульфідтрансферази. У сироватці крові визначали загальний вміст ГЦ, цистеїну, H_2S .

Результати досліджень та їх обговорення. Експериментальна ГГЦ спричиняє порушення функціонування в нирках ферментів циклу реметилювання ГЦ унаслідок зниження активності S-АМС та БГМТ та катаболізму цистеїну – ЦДО, що призводить до зростання вмісту ГЦ та цистеїну і зниження рівня H_2S у сироватці крові через зменшення активності ЦБС та ЦГЛ порівняно з контрольною групою тварин. Стан гіпертиреозу, індукований введенням L-тироксину щурам, спричиняє зростання в нирках активності ферментів, що відповідають за утилізацію ГЦ (S-АМС, S-АГГ, БГМТ) та цистеїну (ЦДО, ГГЦЛ, ЦБС, ЦГЛ, ЦАТ) порівняно з контрольною групою тварин. Це призводить до зменшення рівня ГЦ в крові, порівняно з контрольною групою, а також до зростання продукції H_2S порівняно з групою тварин із ГГЦ. Гіпотиреоз у щурів викликає пригнічення процесів реметилювання та десульфуровання. При цьому рівні ГЦ та цистеїну достовірно зростають у сироватці крові порівняно з контрольною групою. Активність ферментів циклу реметилювання зменшилась (S-АМС, S-АГГ, БГМТ). Активність ГГЦЛ, що відповідає за утилізацію цистеїну, достовірно зросла, при цьому активність ЦДО, ТСТ, СО достовірно знизилась порівняно з контрольною групою тварин. Введення L-тироксину щурам із ГГЦ призводило до незначного збільшення активності ферментів циклу реметилювання (S-АГГ БГМТ), катаболізму та цистеїну (ЦДО) порівняно з групою тварин із ГГЦ. Водночас, введення мерказолілу щурам із ГГЦ спричиняло протилежні зміни в активності вищезазначених ферментів, а саме, в циклах реметилювання (S-АМС, S-АГГ) та десульфуровання (ЦБС та ЦГЛ) активність ферментів знизилась порівняно з контрольною групою тварин.

Висновки. Вищенаведені механізми, очевидно, є однією з причин порушення судинного тону та схильності до посиленого тромбоемболоутворення, які бувають у пацієнтів із синдромом гіпотиреозу і можуть бути зумовлені порушеннями метаболізму сірковмісних амінокислот, що призводять до ГГЦ та зниження рівня H_2S у крові.

Ключові слова: тиреоїдні гормони; сірковмісні амінокислоти; процес реметилювання; процес десульфуровання; гомоцистеїн; цистеїн.

ВСТУП Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є незалежним фактором ризику передчасного атеросклеротичного захворювання судин і тромбозу вен. Відомо, що гіпотиреоз пов'язаний із легкою формою ГГЦ, підвищеним ризиком серцево-судинних захворювань, ішемічної хвороби серця. Збільшений ризик передчасного атеросклерозу підтверджено аутопсією, яку епідеміологічно досліджено в пацієнтів із гіпотиреозом. Хворі на гіпотиреоз мають підвищений діастолічний артеріальний тиск (унаслідок зростання системного судинного опору), змінений ліпідний профіль (високі рівні загального холестерину, ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) та аполіпопротеїну В). Гомоцистеїн (ГЦ), С-реактивний білок, підвищений артеріальний тиск, ендотеліальну дисфункцію та зміну швидкості коагуляції крові на сьогодні визнано як “нові” фактори ризику розвитку атеросклерозу в пацієнтів із дефіцитом тиреоїдних гормонів.

Результати нещодавніх досліджень показали, що гіпотиреоз впливає на метаболізм фолієвої кислоти та ферменти, залучені в процес реметилювання ГЦ (5,10-ме-

тилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР)). При гіпотиреозі печінкова активність МТГФР знижується. Гормони щитоподібної залози можуть впливати на наявність флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндуклеотид (ФАД) – необхідних для стабілізації МТГФР. Було встановлено, що високий рівень сироваткового креатиніну при гіпотиреозі, ймовірно, відображає знижену швидкість клубочкової фільтрації, що пов'язана з порушенням кліренсу ГЦ нирками та розвитку ГГЦ у пацієнтів із гіпотиреозом.

Метою дослідження було встановити вплив експериментального гіпер- та гіпотиреозу при ГГЦ на процеси реметилювання та десульфуровання сірковмісних амінокислот у нирках, вміст ГЦ, цистеїну, H_2S в сироватці крові експериментальних тварин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Для досліджень використано 48 безпородних щурів-самців масою 150–180 г. Тварин утримували на стандартному раціоні з 12-годинним режимом день/ніч. Воду та гранульований корм отримували ad libitum згідно з нормативами [2].

Усіх тварин поділили на 5 груп: перша – контрольна, тваринам внутрішньошлунково вводили розчин 1 % крохмальному гелю; друга – щури з ГГЦ, яким ввели в організм надлишок екзогенного ГЦ у вигляді тіолактон гомоцистеїну (100 мг/кг маси тіла внутрішньошлунково на 1 % розчині крохмалю один раз на добу протягом 28 діб) [10]; третя – тварини з гіпертиреозом, які щоденно протягом 21-ї доби отримували внутрішньошлунково L-тироксин у дозі 200 мкг/кг на 1 % розчині крохмалю [3]; щури з ГГЦ, яким щоденно протягом 21-ї доби вводили внутрішньошлунково L-тироксин у дозі 200 мкг/кг на 1 % розчині крохмалю; п'ята – тварини з гіпотиреозом, які щоденно протягом 21-ї доби внутрішньошлунково отримували мерказоліл у дозі 10 мг/кг маси на 1 % розчині крохмалю [3]; шоста – щури з ГГЦ, яким щоденно протягом 21-ї доби вводили внутрішньошлунково мерказоліл в дозі 10 мг/кг на 1 % розчині крохмалю.

При дослідженні впливу даних препаратів на біохімічні процеси тварин виводили з експерименту через 24 год після останнього введення. Для дослідів використовували плазму крові, тканини нирок. Дослідження проведено згідно із загальноприйнятими етичними принципами щодо експериментів на тваринах.

Нирки перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду і гомогенізували при 3000 об./хв у середовищі 1,15 % калію хлориду (співвідношення 1:3). Гомогенати нирок центрифугували упродовж 30 хв при 1500 g та +4 °C. У нирках визначали активність S-аденозилметіонін-синтази (S-AMC, КФ 2.5.1.6) [4], S-аденозилгомоцистеїн-гідролізу (S-АГГ, КФ 3.3.1.1) [10], бетаїноггомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ, КФ 2.1.1.5) [8], цистатіонін-β-синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22), цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) і цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) [7]. Активність γ-глутамілцистеїнілази (γ-ГЦЛ, КФ 6.3.2.2) визначали за кількістю утвореного неорганічного фосфату при гідролізі АТФ у реакції між глутаматом та цистеїном [12]. Активність цистеїндіоксигенази (ЦДО, КФ 1.13.11.20) оцінювали адаптованим методом за зменшенням вмісту цистеїну [9]. Активність сульфітоксидази (СО, КФ 1.8.3.1) в печінці визначали за швидкістю окиснення сульфід-аніона при наявності калій гексоціаноферату [5]. Активність тіосульфат-дитіосульфідтрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5) визначали в реакції відновлення тіосульфат-аніона при утворенні сульфід-аніона [13].

У сироватці крові визначали загальний вміст ГЦ імуноферментним методом з використанням набору фірми "Axis-Shield" (Великобританія). Рівень загального цистеїну з'ясовували за нінгідриновою реакцією у кислому середовищі після відновлення цистину в цистеїн [9]. Вміст H₂S у сироватці крові визначали за реакцією утворення тіоніну із застосуванням N,N-диметил-p-фенілендіаміну [1]. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стьюдента. Результати виражали як середнє±SEM з 8 експериментів. Зміни p<0,05 розглядали як статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати, отримані в дослідженні, показали, що моделювання у тварин ГГЦ супроводжується зменшенням швидкості утилізації ГЦ в циклі метилування. Активність S-AMC при моделюванні ГГЦ знизилась на 36 % порівняно з контрольною групою тварин (табл. 1). Експериментальний гіпер- та гіпотиреоз у щурів спричиняли порушення функціонального стану ферментів циклу метилування в нирках. Так, пригнічується реакція активації

метіоніну за участі S-AMC при ГГЦ на 36 % порівняно з контрольною групою тварин. Водночас, введення тваринам L-тироксину призводило до зростання активності S-AMC у нирках на 63 та 154 % порівняно з контрольною та групою тварин із ГГЦ. Паралельне введення тваринам розчину L-тироксину з експериментальною ГГЦ призвело лише до зниження активності S-AMC у нирках на 48 % порівняно з групою тварин із гіпертиреозом. Ми встановили, що у тварин з гіпотиреозом активність S-AMC достовірно зменшилась на 40 та 63 % порівняно з контрольною та групою щурів із гіпертиреозом. Паралельне введення тваринам з ГГЦ мерказолілу призводило до зниження активності S-AMC на 62 % проти контрольної групи, 41 % групи з ГГЦ, 77 % проти групи з гіпертиреозом, на 54 % – групи тварин з ГГЦ, яким паралельно вводили L-тироксин. Експериментальна ГГЦ зумовлювала зменшення швидкості синтезу S-аденозилгомоцистеїну при S-АГГ відносно контролю, проте при статистичному аналізі зміни виявилися не достовірними. Гіпертиреоз спричиняв протилежні зміни, активність S-АГГ зросла на 59 та 150 % порівняно з контрольною та групою тварин із ГГЦ. Введення щурами з тривалою ГГЦ L-тироксину призводило до зростання активності S-АГГ на 42 %, ніж у групі тварин із ГГЦ, водночас, активність даного ферменту достовірно була нижчою на 43 % порівняно з групою тварин, яким вводили L-тироксин. Подібно до ГГЦ, гіпотиреоз пригнічував активність S-АГГ на 46 та 66 % проти контрольної та групи тварин із гіпертиреозом. Паралельне введення мерказолілу щурам із ГГЦ викликало зниження активності S-АГГ на 68; 50 та 80 % відповідно проти контрольної, груп тварин із ГГЦ та з гіпертиреозом. ГЦ може бути реметильований фолатнезалежним ферментом БГМТ. При експериментальній ГГЦ зменшується утворення метіоніну з ГЦ за участі БГМТ на 55 % порівняно з контрольною групою тварин. При гіпертиреозі активність БГМТ зростала на 47 % та в 3,3 раза порівняно з контрольною та групою тварин із ГГЦ. Паралельне введення L-тироксину щурам з ГГЦ викликало зростання активності БГМТ у 1,8 раза порівняно з групами тварин із ГГЦ та гіпертиреозом. Введення мерказолілу призводило до зниження активності БГМТ на 47 та 64 % проти контрольної та групи тварин із гіпертиреозом. Активність БГМТ достовірно зменшилась при паралельному введенні мерказолілу на 67 %, порівняно з групою тварин, у яких викликали гіпертиреоз.

Такий напрямок змін активності вищезазначених ферментів циклу метилування логічно повинен призвести до підвищення вмісту ГЦ. Введення щурам тіолактон-ГЦ протягом 28-ї доби збільшувало рівень ГЦ у крові щурів на 28-му добу в 3,6 раза порівняно з контрольною групою ((8,53±0,41) мкмоль/л). Введення тваринам L-тироксину протягом 21-ї доби приводило до зменшення вмісту ГЦ у сироватці крові на 23 %, порівняно з контрольною групою тварин, та на 78 % порівняно з групою щурів із ГГЦ. Результати експерименту показали, що паралельне введення L-тироксину протягом 21-ї доби тваринам із ГГЦ приводило до зменшення рівня ГЦ на 76 % порівняно з контрольною групою тварин. Ми встановили, що експериментальний гіпотиреоз призводив до зростання концентрації ГЦ в 2,6 раза порівняно з контрольною групою тварин. Паралельне введення щурам із ГГЦ мерказолілу збільшувало рівень ГЦ у 4,5 раза, порівняно з контрольною групою, та в 1,7 раза порівняно з групою тварин із гіпотиреозом.

Таблиця 1. Активність (нмоль/хв×мг білка) ферментів циклу метилювання у нирках при гіперцистеїнемії із різною функцією щитоподібної залози (M±m; n=8)

Показник (нмоль/хв/мг білка)	Група тварин					
	інтактні	модель ГГЦ	модель гіпертиреозу	модель гіпертиреозу плюс ГГЦ	модель гіпотиреозу	модель гіпотиреозу плюс ГГЦ
		тіолактон- ГЦ (доба)	час від початку введення L-тироксину (доба)	час від початку введення L-тироксину та тіолактон-ГЦ (доба)	час від початку введення мерказолілу (доба)	час від початку введення мерказолілу та тіолактон-ГЦ (доба)
		28	21	28	21	28
S-AMC	3,04±0,29	1,95±0,24*	4,96±0,30* ^{&}	2,49±0,27 [#]	1,82±0,28* [#]	1,15±0,12* ^{&#}
S-АГГ	3,83±0,38	2,43±0,27	6,08±0,53* ^{&}	3,45±0,12 ^{&}	2,08±0,19*	1,22±0,18* ^{&#}
БГМТ	3,33±0,17	1,51±0,16*	4,90±0,35* ^{&}	2,73±0,24 ^{&#}	1,76±0,15*	1,62±0,24 ^{&#}

Примітки. Тут і в таблицях 2, 3 зміни достовірні:

- 1) * – порівняно з інтактними тваринами;
- 2) & – порівняно з групою тварин, яким вводили тіолактон-ГЦ;
- 3) # – порівняно з групою щурів, які отримували L-тироксин;
- 4) \$ – порівняно з групою тварин, яким вводили мерказоліл.

Відомо, що ГЦ може бути незворотно метаболізований шляхом транссульфування з утворенням цистеїну, що метаболізується двома шляхами – синтезом глутатіону за участі ферменту γ-ГЦЛ або реакцією окиснення при участі ЦДО до цистеїнсульфінату. Шлях трансамінування цистеїнсульфінату за участі ЦАТ до β-сульфінілпірувату, далі до сульфїту, що окиснюється до сульфату ферментом СО. Ми встановили достовірні зміни в активності ферментів десульфуразного шляху утилізації цистеїну (табл. 2), що є джерелом важливої біологічно активної молекули H₂S.

ГГЦ призводила до зниження десульфуразної активності ЦБС на 57 % проти контролю. Гіпертиреоз у щурів-самців збільшував активність ЦБС на 21 та 182 % порівняно з контрольною та групою тварин із ГГЦ. Паралельне введення L-тироксину щурам з ГГЦ спричинило зростання активності ЦБС на 26 % порівняно з групою тварин із ГГЦ. Введення L-тироксину тваринам з експериментальною ГГЦ знижувало активність ЦБС на 36 % проти контрольної групи та 47 %, ніж у групі, яким вводили L-тироксин, проте активність даного ферменту була на 49 % вищою порівняно з групою щурів із ГГЦ. Активність ЦБС при гіпотиреозі достовірно зменшувалась на 28 % проти контрольної групи.

Подібні результати отримали також E. A. Turbat-Negera et al. (2018) [6], які зауважили, що гіпотиреоз тісно пов'язаний з експресією ЦБС та зниженням рівня H₂S у крові. Введення мерказолілу тваринам та тіолактон-ГЦ призводило до зниження активності ЦБС на 58 %, порівняно з контрольною групою, та на 42 % із щурами, в

яких викликали гіпотиреоз. Моделювання експериментальної ГГЦ зумовило зниження активності ЦГЛ на 43 % порівняно з контрольною групою тварин. Гіпертиреоз, навпаки, призводив до зростання активності ЦГЛ в 2 рази та 3,5 рази, порівняно з контрольною та групою тварин, у яких викликали ГГЦ. Введення L-тироксину тваринам із ГГЦ не призводило до різнонаправлених змін при активності ЦГЛ, вона була відповідно вищою на 131 %, порівняно з контрольною групою тварин, і на 35 % нижчою, ніж у групі щурів, у яких викликали гіпертиреоз. Активність ЦГЛ при гіпотиреозі знизилась достовірно на 39 %, порівняно з контрольною, на 70 %, порівняно з групою тварин із гіпертиреозом, та на 53 %, ніж у групі тварин із ГГЦ, яким вводили L-тироксин. При паралельному введенні мерказолілу тваринам з ГГЦ відбувалося зниження активності ЦГЛ на 74; 87; 57 та 80 %, порівняно з контрольною, групою тварин із гіпер- і гіпотиреозом та тваринами з ГГЦ, яким вводили L-тироксин відповідно. Введення L-тироксину тваринам призвело до достовірного збільшення активності ЦАТ на 52 %, порівняно з групою тварин, яким моделювали ГГЦ.

Таке пригнічення реакції десульфуровування під впливом ГГЦ зменшило рівень H₂S в крові на 26 % порівняно з контрольною групою ((8,53±0,41) мкмоль/л). Моделювання гіпертиреозу призвело до зростання рівня H₂S на 64 % порівняно зі щурами із ГГЦ ((64,8±5,95) мкмоль/л). Рівень H₂S при введенні L-тироксину тваринам, у яких моделювали ГГЦ, спричинив зниження його рівня на 19 %, порівняно з інтактними тваринами, та на 34 % з групою щурів із гіпертиреозом ((108,4±8,51) мкмоль/л). Ми

Таблиця 2. Активність (нмоль/хв×мг білка) ферментів синтезу H₂S у нирках щурів при гіперцистеїнемії із різною функцією щитоподібної залози (M±m; n=8)

Показник (нмоль/хв/мг білка)	Група тварин					
	інтактні	модель ГГЦ	модель гіпертиреозу	модель гіпертиреозу плюс ГГЦ	модель гіпотиреозу	модель гіпотиреозу плюс ГГЦ
		тіолактон- ГЦ (доба)	час від початку введення L-тироксину (доба)	час від початку введення L-тироксину та тіолактон-ГЦ (доба)	час від початку введення мерказолілу (доба)	час від початку введення мерказолілу та тіолактон-ГЦ (доба)
		28	21	28	21	28
ЦБС	3,31±0,10	1,42±0,08*	4,01±0,20* ^{&}	2,12±0,24* [#]	2,37±0,25* ^{&}	1,38±0,20* ^{\$}
ЦГЛ	0,92±0,04	0,52±0,02*	1,84±0,15* ^{&}	1,20±0,13* [#]	0,56±0,03* [#]	0,24±0,07* ^{&#}
ЦАТ	1,28±0,03	0,94±0,18	1,43±0,10 ^{&}	1,17±0,18	1,04±0,07	1,10±0,07

встановили, що експериментальний гіпотиреоз призводив до достовірного зменшення рівня H_2S на 24 % порівняно з групою інтактних тварин. Паралельне введення мерказолілу щурами із ГГЦ спричиняло зменшення рівня H_2S у 1,7 раза порівняно з контрольною групою.

Ми зауважили, що ферменти окисно-кон'югаційного шляху утилізації цистеїну в нирках щурів дуже чутливі до високих концентрацій тіолактон-ГЦ (табл. 3). За умов ГГЦ відбувалося зниження швидкості окиснення цистеїну до цистеїнсульфіату при участі ЦДО на 48 %, порівняно із показниками в контрольній групі. Гіпертиреоз викликав зростання активності ЦДО в 2 та 3,8 раза порівняно з контрольною і групою тварин із ГГЦ. Введення L-тироксину щурам із ГГЦ спричиняло інгибування активності ЦДО на 54 %, порівняно з групою тварин, у яких моделювали гіпертиреоз, що призводив до зниження активності ЦДО на 43 % порівняно з контрольною групою. Водночас, збільшилась активність реакції кон'югації цистеїну з глутаматом у 2 рази за участі ГГЦЛ при гіпертиреозі, порівняно з контрольною групою тварин, та в 3,4 раза порівняно з групою щурів із ГГЦ. Паралельне введення L-тироксину тваринам із ГГЦ спричинило достовірне зниження активності ГГЦЛ на 59 %, порівняно з групою тварин, яким вводили L-тироксин. Гіпотиреоз призводив до зростання активності ГГЦЛ в 1,7 раза, порівняно з контролем, та у 2,7 раза проти групи щурів із ГГЦ. Паралельне введення мерказолілу тваринам із ГГЦ призводило до зниження активності ГГЦЛ на 74 та на 67 % порівняно з групами тварин, у яких викликали гіпер- та гіпотиреоз.

Ми встановили, що тільки гіпотиреоз впливав на активність тіосульфаттрансферази (ТСТ), вона достовірно зменшилась на 32 % порівняно з контрольною групою тварин. ГГЦ призводила до зниження активності СО на 25 %, водночас, гіпотиреоз спричиняв зростання активності даного ферменту на 53 % проти групи щурів із ГГЦ. Гіпотиреоз, модельований мерказолілом, призводив до зниження активності СО на 40 % порівняно з контрольною групою тварин. Активність СО при введенні мерказолілу тваринам із ГГЦ достовірно зменшувалась – на 31 % проти контрольної групи.

Резюмуючи отримані дані, що свідчать про пригнічення десульфуразного та окисно-кон'югаційного шляху в тварин із моделлю ГГЦ та гіпотиреозу, логічно було б очікувати, що рівень цистеїну в крові щурів повинен знизитися. Проте ми отримали протилежні результати, які вказують, що введення тваринам тіолактон-ГЦ протягом 28-ї доби призводить до зростання вмісту цієї амінокислоти в крові на 34 % порівняно з контрольною групою тварин ((111,5±6,61) мкмоль/л). Водночас, введення L-тироксину тваринам із ГГЦ призводило до зростання рівня цистеїну на 26 %, порівняно з тваринами з гіпертиреозом, та на 47 %, порівняно з контрольною групою. Ми зауважили, що експериментальний гіпотиреоз призводив до зростання рівня цистеїну на 40 та 89 % порівняно з контрольною та групою тварин із ГГЦ. Введення мерказолілу щурам із ГГЦ спричинило збільшення концентрації загального цистеїну процесів утилізації цистеїну в 1,6 раза. Це, очевидно, можна пояснити порушеннями під впливом тіолактон-ГЦ та мерказолілу.

Таблиця 3. Активність (нмоль/хв×мг білка) ферментів циклу транссульфування у печінці при гіпергомоцистеїнемії із різною функцією щитоподібної залози ($M \pm m$; $n=8$)

Показник (нмоль/хв/мг білка)	інтактні	Група тварин				
		модель ГГЦ	модель гіпертиреозу	модель гіпертиреозу плюс ГГЦ	модель гіпотиреозу	модель гіпотиреозу плюс ГГЦ
		тіолактон- ГЦ (доба)	час від початку введення L-тироксину (доба)	час від початку введення L-тироксину та тіолактон-ГЦ (доба)	час від початку введення мерказолілу (доба)	час від початку введення мерказолілу та тіолактон-ГЦ (доба)
	28	21	28	21	28	
ЦДО	0,42±0,03	0,22±0,05*	0,85±0,07*	0,39±0,08&	0,24±0,03*&	0,30±0,05&
ГГЦЛ	2,66±0,58	1,75±0,10	5,90±0,56*&	2,39±0,35#	4,75±0,45*&	1,56±0,25#&
ТСТ	0,84±0,08	0,75±0,10	0,89±0,09	0,63±0,10	0,57±0,04*	0,49±0,12
СО	3,67±0,29	2,74±0,15*	4,19±0,27&	3,39±0,17	2,22±0,10*	2,54±0,15*

ВИСНОВКИ 1. Експериментальна ГГЦ спричиняє порушення функціонування в нирках ферментів циклу реметилювання ГЦ унаслідок зниження активності S-АМС (на 36 %) та БГМТ (на 55 %) та шляхів катаболізму цистеїну – ЦДО (на 48 %), що очевидно, призвело до зростання вмісту ГЦ (в 3,6 раза) і цистеїну (на 34 %) та зниження рівня H_2S (на 26 %) у сироватці крові через зменшення активності ЦБС (на 57 %) та ЦГЛ (на 43 %) порівняно з контрольною групою тварин.

2. Стан гіпертиреозу в щурів супроводжується зростанням у нирках активності ферментів, що відповідають за утилізацію ГЦ (S-АМС – 63 %, S-АГГ – 59 %, БГМТ – 47 % проти контрольної групи) та цистеїну (ЦДО, ГГЦЛ – у 2 рази; ЦБС, ЦГЛ – в 2 рази; ЦАТ – на 52 %). Це призводить до зменшення рівня ГЦ у крові на 23 %, порівняно з контрольною групою, а також до зростання продукції H_2S на 64 % порівняно з групою тварин із ГГЦ.

3. Гіпотиреоз призводить до пригнічення процесів реметилювання та десульфуровання. При цьому має місце достовірне підвищення рівня ГЦ в 2,6 раза та цистеїну на 40 % в сироватці крові порівняно з контрольною групою. Активність ферментів циклу реметилювання достовірно зменшилась (S-АМС – на 40 %, S-АГГ – на 62 % та БГМТ – на 67 %). Активність ГГЦЛ достовірно зросла в 1,7 раза, при цьому активність ЦДО – на 43 %, ТСТ – на 32 % та СО – на 25 % достовірно знизилась порівняно з контрольною групою тварин.

4. Введення L-тироксину тваринам із ГГЦ призводило до незначного зростання активності ферментів циклу реметилювання (S-АГГ – на 48 %, БГМТ – в 1,8 раза), катаболізму та цистеїну (ЦДО – на 54 %) порівняно з групою тварин із ГГЦ. Водночас, введення мерказолілу щурам з ГГЦ призводило до протилежних змін в активності вищезазначених ферментів, а саме, зазнавав при-

гнічення цикл реметирування (S-АМС – на 40 %, S-АГГ – на 68 %) та десульфурування (ЦБС – на 58 % та ЦГЛ – на 43 %) активності ферментів знизилась порівняно з контрольною групою тварин.

5. Вищенаведені механізми, очевидно, є однією з причин порушення судинного тону та схильності до посиленого тромбоутворення, які бувають у пацієнтів із гіпотиреозом і можуть бути зумовлені порушеннями метаболізму сірковмісних амінокислот, що призводять до ГГЦ та зниження рівня H_2S у крові.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні кореляційних взаємозв'язків між змінами показників, що характеризуються обміном сірковмісних амінокислот і загальними метаболічними параметрами, зумовленими гіпер- та гіпотиреозом, що відображають порушення обміну вуглеводів та ліпідів. Це дає змогу більш фундаментально зрозуміти механізми, що призводять до порушень процесів реметирування і транссульфування при станах, які супроводжуються змінами концентрації тиреоїдних гормонів в організмі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Визначення вмісту гідроген сульфиду в сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк [та ін.] // Вісн. наук. дослідж. – 2009. – № 1 (54). – С. 29–32.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів / за ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
3. Нечипорук В. М. Метаболізм цистеїну при експериментальному гіпер- та гіпотиреозі в щурів / В. М. Нечипорук, М. М. Корда // Мед. та клініч. хімія. – 2017. – Т. 19, № 4(73). – С. 32–40.
4. Chiang P. K. Activation of methionin for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms / P. K. Chiang, G. L. Cantoni // J. Biol. Chem. – 1977. – Vol. 252, No. 13. – P. 4506–4513.
5. Cohen H. J. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties / H. J. Cohen, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1971. – Vol. 246, No. 2. – P. 359–366.
6. Cystathione beta-synthase is increased in thyroid malignancies / E. A. Turbat-Herrera, M. J. Kilpatrick, J. Chen [et al.] // Anticancer Research. – 2018. – Vol. 38, No. 11. – P. 6085–6090.
7. Dombkowski R. A. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout / R. A. Dombkowski, M. J. Russell, K. R. Olson // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2004. – Vol. 286, No. 4. – P. 678–685.
8. Ericson L. E. Betaine-homocysteine methyltransferases. The methyl donor specificity of the transferase isolated from pig liver / L. E. Ericson // Acta Chemica Scandinavica. – 1960. – Vol. 14. – P. 2127–2134.
9. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid / M. K. Gaitonde // Biochem. J. – 1967. – 104, No. 2. – P. 627–633.
10. Stangl G. I. Homocysteine thiolactone-induced hyperhomocysteinemia does not alter concentrations of cholesterol and SREBP-2 target gene mRNAs in rats / G. I. Stangl // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2007. – 232, No. 1. – P. 81–87.
11. Isa Y. Effect of vitamin B6 deficiency on S-adenosylhomocysteine hydrolase activity as a target point for methionine metabolic regulation / Y. Isa, H. Tsuge, T. Hayakawa // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 2006. – Vol. 52, No. 5. – P. 302–306.
12. Orłowski M. Partial reaction by γ -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate / M. Orłowski, A. Mrister // J. Biol. Chem. – 1971. – Vol. 246, No. 23. – P. 7095–7105.
13. Papenbrock J. Characterization of a sulfurtransferase from Arabidopsis thaliana / J. Papenbrock, A. Schmidt // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267, No. 1. – P. 145–154.

Отримано 05.02.19

©V. M. Nechiporuk¹, N. V. Zaichko¹, A. V. Melnik¹, R. S. Ostrenyuk¹, M. M. Korda²
 M. Pyrohov Vinnytsia National Medical University¹
 I. Horbachevsky Ternopil State Medical University²

EFFECT OF HYPERHOMOCYSTEINEMIA ON THE METABOLISM OF SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS IN THE KIDNEYS OF RATS WITH HYPER- AND HYPOTHYROIDISM

Summary. Hyperhomocysteinemia (HHC) is an independent risk factor for premature atherosclerotic vascular disease and venous thrombosis. It is known that hypothyroidism is associated with a mild case of HHC, an increased risk of cardiovascular, coronary heart diseases. High concentration of homocysteine (Hcy) in the blood plasma is an independent risk factor for atherosclerosis. It was established that patients with hypothyroidism have moderately elevated levels of Hcy that are normalized after hormone replacement therapy.

The aim of the study – to establish the effect of experimental hyper- and hypothyroidism at HHcy on the processes of remethylation cycle and transsulfuration pathway of sulfur-containing amino acids exchange in the kidneys, the concentration of Hcy, cysteine, and hydrogen sulfide (H_2S) in the serum blood of rats.

Materials and Methods. The research was performed on white male rats, which were simulated HHC, hyper- and hypothyroidism, HHC with different functions of the thyroid gland. The activity of S-adenosylmethionine synthetase (S-AMS), S-adenosylhomocysteine hydrolase (S-AHH), betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT), cystathionine- β -synthase (CBS), cystathionine- γ -lyase (CSE) and cysteine aminotransferase (CAT), γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL), cysteine dioxygenase (CDO), sulfite oxidase (SO), thiosulfate-dithiol sulfurtransferase (TST) was determined in kidneys. Total concentration of Hcy, cysteine, H_2S was determined in the blood serum.

Results and Discussion. Experimental HHC causes disorders of functioning in kidneys of the enzymes of the Hcy remethylation cycle due to a decrease in S-AMS and BHMT activity and cysteine catabolism – CDO, increases the concentration of Hcy and cysteine and decreases concentration of H_2S in the blood serum compared to the control group. The hyperthyroidism performed by the administration of L-thyroxin to rats leads to an increase in kidney activity of enzymes responsible for metabolism of Hcy (S-AMS, S-AHH, BHMT) and cysteine (CDO, GCL, CBS, CGL, CAT) compared to the control group of animals. Such changes in the activity

of enzymes lead to a decrease in the level of Hcy in the blood as compared with the control, as well as an increase in the production of H₂S as compared with the group of animals with HHcy. Hypothyroidism in rats causes inhibition of the process of remethylation and transsulfuration cycles. In this case, the level of Hcy and cysteine increases significantly in the serum compared with the control. The activity of the enzyme remethylation cycle was decreased (S-AMS, S-AHH, BHMT). The activity of GCL, which is responsible for the utilization of cysteine, significantly increased, while the activity of CDO, TST, and CO significantly decreased compared with the control group. The administration of L-thyroxine in animals with HHcy led to a slight increase in the activity of enzymes of the remethylation cycle (S-AHH, BHMT), catabolism and cysteine (GCL) compared with the group of animals with HHcy. At the same time, the administration of mercazole to animals with HHC led to opposite changes in the activity of enzymes of remethylation cycle (S-AMS, S-AHH) and transsulfuration (CBS and CSE), the activity of enzymes were decreased compared to the control group of animals.

Conclusions. The described metabolic mechanisms are obviously one of the causes of the violation of cardiovascular diseases and increased thrombosis that occur in patients with hypothyroidism and may be due to violations of sulfur-containing amino acid metabolism disorders, leading to the HHC and decrease of H₂S levels.

Key words: thyroid hormones; sulfur-containing amino acids; remethylation process; desulphurisation process; homocysteine; cysteine.

©В. М. Нечипорук¹, Н. В. Заичко¹, А. В. Мельник¹, Р. С. Остренюк¹, М. М. Корда²

Винницький національний медичний університет імені Н. І. Пирогова¹

ГВУЗ "Тернопольський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"²

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА МЕТАБОЛИЗМ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ГИПЕР- И ГИПОТИРЕОЗЕ

Резюме. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является независимым фактором риска преждевременного атеросклеротического заболевания сосудов и тромбоза вен. Известно, что гипотиреоз связан с легкой формой ГГЦ, повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, ишемической болезни сердца. Высокая концентрация гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови является независимым фактором риска атеросклероза. Установлено, что больные гипотиреозом имеют умеренно повышенные уровни ГЦ, которые нормализуются при заместительной гормонотерапии.

Цель исследования – установить влияние экспериментального гипер- и гипотиреоза при ГГЦ на процессы реметилирования и десульфирования серосодержащих аминокислот в почках, содержание ГЦ, цистеина, H₂S в сыворотке крови животных.

Материалы и методы. Исследование выполнено на белых крысах-самцах, которым моделировали ГГЦ, гипер- и гипотиреоз, ГГЦ с разной функцией щитовидной железы. В почках определяли активность S-аденозилметионинсинтетазы (S-АМС), S-аденозилгомоцистеингидролазы (S-АГГ), бетаингомоцистеинметилтрансферазы (БГМТ), цистатионин-β-синтазы (ЦБС), цистатионин-γ-лиазы (ЦГЛ) и цистеинаминотрансферазы (ЦАТ), γ-глутамилцистеинлигазы (γ-ГЦЛ), цистеиндиоксигеназы (ЦДО), сульфитоксидазы, тиосульфат-дитиосульфидтрансферазы. В сыворотке крови определяли общее содержание ГЦ, цистеина, H₂S.

Результаты исследований и их обсуждение. Экспериментальная ГГЦ вызывает нарушение функционирования в почках ферментов цикла реметилирования ГЦ вследствие снижения активности S-АМС и БГМТ и катаболизма цистеина – ЦДО, увеличивается содержания ГЦ и цистеина и снижается уровень H₂S в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой животных. Состояние гипертиреоза, индуцированное введением L-тироксина крысам, приводит к росту в почках активности ферментов, отвечающих за утилизацию ГЦ (S-АМС, S-АГГ, БГМТ) и цистеина (ЦДО, ГГЦЛ, ЦБС, ЦГЛ, ЦАТ) по сравнению с контрольной группой животных. Такие изменения в активности ферментов приводит к уменьшению уровня ГЦ в крови, по сравнению с контрольной группой, а также к росту продукции H₂S по сравнению с группой животных с ГГЦ. Гипотиреоз у крыс вызывает угнетение процессов реметилирования и десульфирования. При этом имеет место уровень ГЦ и цистеина достоверно возрастает в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой. Активность ферментов цикла реметилирования уменьшилась (S-АМС, S-АГГ, БГМТ). Активность ГГЦЛ, что отвечает за утилизацию цистеина, достоверно возросла, при этом активность ЦДО, ТСТ, СО достоверно снизилась по сравнению с контрольной группой животных. Введение L-тироксина крысам с ГГЦ приводило к незначительному росту активности ферментов цикла реметилирования (S-АГГ БГМТ), катаболизма и цистеина (ЦДО) по сравнению с группой животных с ГГЦ. В то же время, введение мерказолила крысам с ГГЦ приводило к противоположным изменений в активности вышеназванных ферментов, а именно в циклах реметилирования (S-АМС, S-АГГ) и десульфирования (ЦБС и ЦГЛ) активности ферментов снизилась по сравнению с контрольной группой животных.

Выводы. Приведенные выше механизмы, очевидно, являются одной из причин нарушения сосудистого тонуса и склонности к усиленному тромбообразованию, которые встречаются у пациентов с синдромом гипотиреоза и могут быть обусловлены нарушениями метаболизма серосодержащих аминокислот, приводящих к ГГЦ и снижению уровня H₂S в крови.

Ключевые слова: тиреоидные гормоны; серосодержащие аминокислоты; процесс реметилирования; процесс десульфирования; гомоцистеин; цистеин.

Адреса для листування: В. М. Нечипорук, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 2018, Україна, e-mail: nechiporuk@vnmu.edu.ua