

Materials and methods. The research material consisted of the results of examination and treatment of 140 patients diagnosed with varicose veins of the lower extremities at the Istanbul NS Clinic and the Yeni Ganja Medical Center during 2017-2020. Among the patients there were 98 men, 42 women, average age 57.1±0.62 years.

The duration of diabetes mellitus was 13.8±0.33 years. At the same time, 98 (70%) patients had a history of diabetes mellitus of 10-14 years, 27 (19.29%) patients – 15-19 years, 13 (9.29%) patients – 20-24 years, and 2 (1.43%) patients had more than 25 years. The concentration of sugar in the blood was 183.9±4.9 mg/dl, and the amount of glycohemoglobin was 9.0±0.09%, varying from 7.5% to 11.9%.

EVLA was performed for all patients after appropriate preoperative preparation.

Depending on the energy density, the patients were divided into control and main groups. In 60 patients included in the control group, the speed limit of the extractor device was set at 1 mm/s, and the power was set at 8-10 Watts to supply 80-100 J/cm of energy to the vein. 80 patients of the main group were divided into 2 subgroups of 40 people each.

Results and discussion. Varicose veins of the lower extremities are considered the most obvious clinical sign of chronic venous insufficiency. Varicose veins significantly decreased ($p<0.0001$) in the control group a week after EVLA. Varicose veins were not detected in 57.1% of patients on the right and 25 on the left. In 24 people on the left, the number and volume of varicose veins significantly decreased ($p<0.0001$) and decreased to the level to be assessed at 1 point.

140 patients with diabetes mellitus underwent EVLA. In the control group ($n=60$), energy was applied in 80-100 J/cm; in the main A subgroup ($n=40$) 100-120 J/cm and in the main subgroup ($n=40$) 120-140 J/cm. The results on the VCSS scale were compared a week, 1 month, 6 months and 1 year after EVLA. The analysis proved that EVLA with an energy output of 120-140 J/cm is more effective in patients with diabetes mellitus.

In our study, positive effect was confirmed by the best VCSS quality of life indicators and a significant reduction in the number of relapses after surgery in patients with diabetic varicose veins.

Key words: varicose veins, diabetes mellitus, laser ablation, energy density, treatment.

ORCID and contributionship:

Asgarov I. M.: <https://orcid.org/0000-0001-9798-5106> ^{ABDF}

Gasimov N. M.: <https://orcid.org/0000-0002-1315-1663> ^A

Fattah-Pur V. A.: <https://orcid.org/0000-0003-0826-8864> ^A

Babayev R. M.: – ^B

Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

Corresponding author

Asgarov Ismayil Mubariz

Azerbaijan State Advanced Training Institute of Doctors named after A.Aliyev

Azerbaijan, AZ1012, Baku, 3165 Tbilisi ave.

Tel.: +994557621780

E-mail: Surgeon-scientist@mail.ru

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article.

Received 20.05.2023

Accepted 03.11.2023

DOI 10.29254/2077-4214-2023-4-171-134-145

UDC 577.164.187:661.847.532:546.221.1:616-056.52:639.028

Bobetska O. P., Zaichko N. V.

THE EFFECT OF LIPOIC ACID, ZINC SULFATE AND SODIUM THIOSULFATE ON H_2S METABOLISM IN CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS IN EXPERIMENTAL OBESITY

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya (Vinnytsia, Ukraine)

olenabobetska@gmail.com

The article is devoted to the study of the peculiarities of hydrogen sulfide (H_2S) exchange in the heart and blood vessels during experimental obesity induced by a high-calorie, high-fat diet and to the justification of approaches to the correction of detected violations by modulators of various ways of sulfide exchange. It is known that a decrease in the level of endogenous H_2S is a factor in the development of arterial hypertension, coronary heart disease, left ventricular dysfunction, myocardial fibrosis, and heart failure. The primary source of H_2S in the heart and blood vessels is PLP-dependent L-cysteine desulfurization reactions, an alternative source can be sulfur transferase reactions of thiosulfate exchange. The role of different pathways of H_2S metabolism in the mechanisms of damage to the cardiovascular system due to obesity is unclear, and the search for effective and safe correctors of sulfide metabolism is urgent. The work aimed to find out the effect of lipoic acid, zinc sulfate and sodium thiosulfate on H_2S exchange in the cardiovascular system of rats with experimental obesity (EO) and to compare it with the effect of reference modula-

tors of the H_2S / cystathionine- γ -lyase pathway. According to the results of our research, EO is characterized by the formation of H_2S deficiency in the heart and blood vessels, a decrease in the activity of the main H_2S -synthesizing enzymes (cystathionine- γ -lyase, cysteine aminotransferase / 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase), inhibition of mitochondrial pathways of H_2S oxidation and deposition. Propargylglycine deepens the disturbance of sulphide metabolism, whereas the reference donor H_2S (NaHS) reduces their severity. Lipoic acid, zinc sulfate, sodium thiosulfate effectively adjust the level of H_2S in the cardiovascular system under EO conditions, activate L-cysteine desulfurization processes and thiosulfate-dependent reactions of H_2S formation, increase the activity of thioredoxin reductase and sulfite oxidase, and are not inferior to NaHS in effectiveness. Establishing the role of modulators of H_2S exchange in regulating the functional state of the cardiovascular system during obesity will allow for improvement in the treatment and prevention of cardiometabolic multimorbidity in the future.

Key words: hydrogen sulfide, obesity, metabolism, heart, vessels.

Connection of publications with planned research works.

The work is a fragment of the planned SRW M. Pyrohov Vinnytsia National Medical University "The role of exogenous and endogenous sulfur-containing compounds in the mechanisms of damage to internal organs and cytoprotection in various pathological conditions" (state registration number 0119U001142).

Introduction.

In recent years, a lot of evidence has been accumulated regarding the significant role of sulfur-containing amino acids (methionine, homocysteine, cysteine) and their low molecular weight metabolite – hydrogen sulfide (H_2S) in the pathogenesis of cardiovascular diseases [1, 2, 3]. It has been established that H_2S has a wide range of physiological effects: it regulates the contractility of smooth myocytes and cardiomyocytes, affects the conduction system of the heart, ensures adaptation of the myocardium to hypoxia and ischemia, exerts an antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic effect [3, 4]. A decrease in the level of endogenous H_2S is a factor in the development of arterial hypertension, coronary heart disease, left ventricular dysfunction, myocardial fibrosis, and heart failure [4, 5]. In the cardiovascular system of animals and humans, the formation of H_2S mainly occurs from L-cysteine (table) with the participation of the PLP-dependent enzymes cystathionine- γ -lyase (CSE, CF 4.4.1.1) and cysteine aminotransferase (CAT, CF 2.6.1.3) together 3-mercaptopyruvate sulfur transferase (3-MST, KF 2.8.1.2), cofactors of the last one are thioredoxin, dihydrolipoic acid and zinc [3, 6]. An additional source of endogenous H_2S can be the reduction reaction of its metabolite-thiosulfate anion with the participation of thiosulfate sulfurtransferases (TST, KF 2.8.1.1; 2.8.1.3; 2.8.1.5), 3-MST, glutathione and thioredoxin [7, 8]. In the mitochondria, H_2S is utilized, which is oxidized to thiosulfate and sulfite (with the participation of the SQR sulfide quinone oxidoreductase system), and sulfite is further transformed into sulfate with the involvement of sulfite oxidase (KF 1.8.3.1) [3, 9, 10]. H_2S is also deposited in mitochondria in the composition of polysulfides, persulfides, and sulfane-bound forms with the participation of sulfurtransferases and thioredoxin [3, 10].

The role of different pathways of H_2S metabolism in the mechanisms of damage to the cardiovascular system due to obesity is

not fully understood. Visceral and perivascular adipose tissue is also known to express CSE and is a producer of H_2S that stimulates adipocyte proliferation in vitro [11]. There is more and more information that specific biological effects of H_2S are realized through the thiosulfate anion, which has its own antioxidant and vasoprotective properties, and thiosulfate sulfurtransferases are involved in the mechanisms of initiation of metabolic disorders [8, 9]. Thus, the search for effective and safe correctors of various pathways of H_2S exchange in the cardiovascular system for obesity remains relevant. Hypothetically, cofactors and cosubstrates of sulfurtransferases – lipoic acid, sodium thiosulfate, zinc sulfate – may have such properties, however, their influence on the exchange of H_2S in the heart and blood vessels due to obesity has not been determined.

The aim of the study.

To find out the effect of lipoic acid, zinc sulfate and sodium thiosulfate on the exchange of H_2S in the cardiovascular system of rats with experimental obesity and to compare it with the effect of classical modulators of the H_2S / CSE pathway.

Object and research methods.

Experiments were conducted on 70 white sexually mature male laboratory rats with an initial weight of 150-180 g. Experimental studies were planned and completed following the bioethical principles of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986), Directive Council of Europe 86/609/EEC (1986), the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV dated 21.02.2006, Article 26), "General Ethical Principles of Animal Experiments", reflected in resolutions I- VII National Congresses of Ukraine on Bioethics (Kyiv, 2001-2019). The animals were housed in the standard conditions of the experimental biological clinic of the VNMU named after

Table – Main enzymatic reactions of H_2S exchange in the cardiovascular system

Enzyme (cofactor)	Reaction scheme
CSE / PLP	$L\text{-cysteine} + H_2O \rightarrow \text{pyruvate} + H_2S + NH_3$
CAT / PLP	$L\text{-cysteine} + \alpha\text{-ketoglutarate} \rightarrow 3\text{-mercaptopyruvate} + \text{glutamate}$
3-MCT thioredoxin, Zn^{2+} , lipoic acid	$3\text{-mercaptopyruvate} \rightarrow \text{pyruvate} + H_2S$ $S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_3^{2-} + H_2S$ $(3\text{-MCT-SH} \rightarrow 3\text{-MCT-S-SH} + R(SH)_2 \rightarrow RS-S + H_2S)$
TST / glutathione, thioredoxin	$S_2O_3^{2-} + 2\text{G-SH} \rightarrow SO_3^{2-} + H_2S + \text{GS-SG}$ $2HS^- + 2O_2 \rightarrow S_2O_3^{2-} + H_2O$
SQR / FAD	$H_2S + SO_3^{2-} + FAD \rightarrow S_2O_3^{2-} + FADN_2$
Sulfite oxidase	$SO_3^{2-} + H_2O + 2Fe^{3+} (\text{cyt c}) \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 2Fe^{2+} (\text{cyt c})$

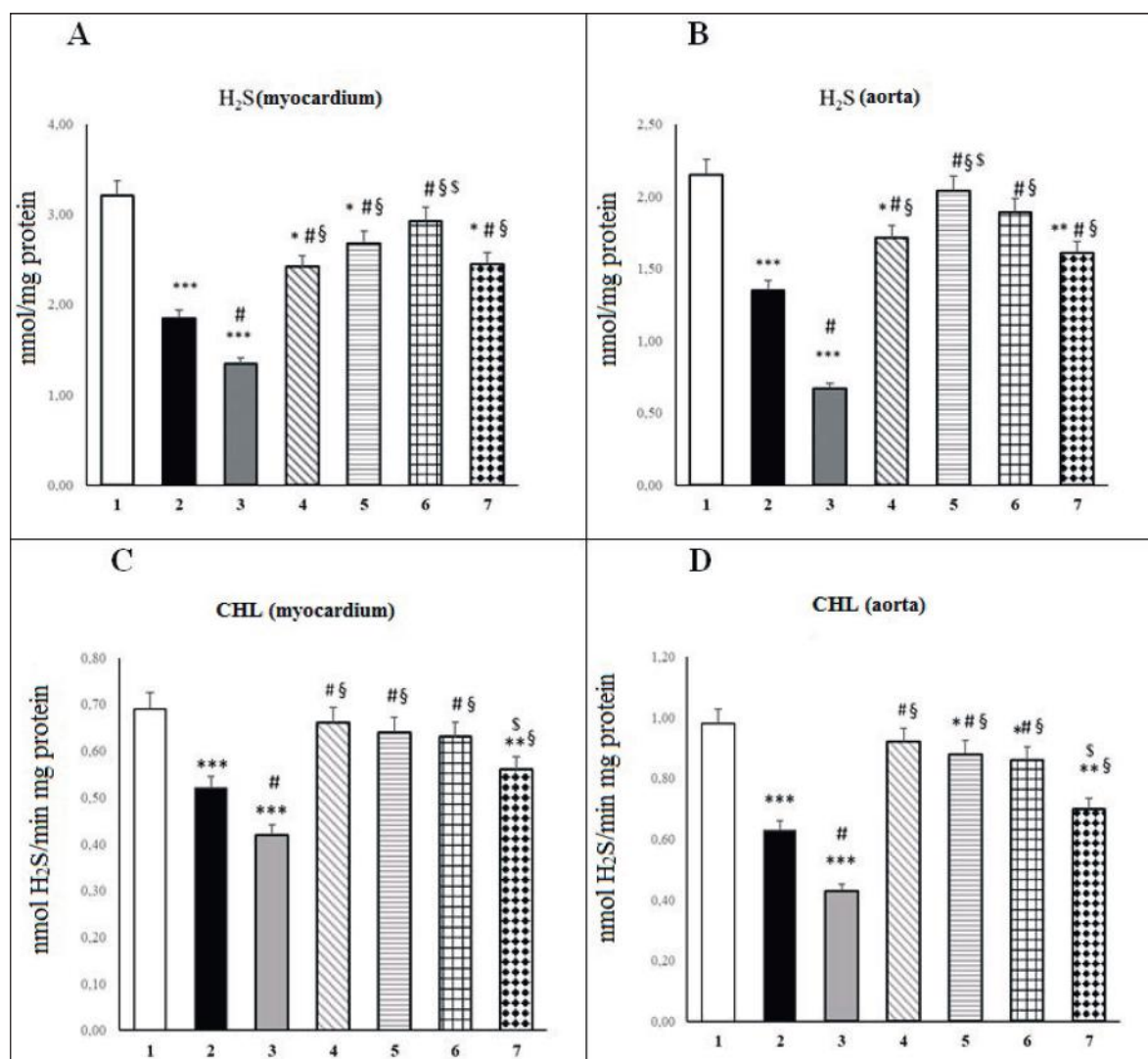


Figure 1 – Comparative assessment of the effect of modulators of H₂S exchange on the state of the H₂S / cystathionine-γ-lyase (CSE) system in the myocardium and aorta of rats with experimental obesity (M±m, n=10).

Notes: 1) groups: 1 – control; 2 – EO; 3 – EO+PGG; 4 – EO+NaHS; 5 – EO+α-LA; 6 – EO+ZnSO₄; 7 – EO + Na₂S₂O₃; 2) statistically significant differences: * – p<0.05 relative to the 1st group (** – p<0.01; *** – p<0.001); # – p<0.05 relative to the 2nd group; § – p<0.05 relative to the 3rd group; \$ – p<0.05 relative to the 4th group.

MI Pirohov: under a 12-hour light regime day/night, temperature 22±2°C and relative air humidity 55±5%, with free access to water and food. When randomizing animals into experimental groups, the principle of minimizing differences in weight and growth parameters was followed.

Experimental obesity (EO) was induced in 6 groups of rats (10 individuals in each group) by using a high-calorie, high-fat diet with an energy value of 4.33 kcal/g (15.7% proteins, 39.5% fats, 44.8% carbohydrates by calorie) for 10 weeks as described [12]. Animals of the control group received a standard diet for laboratory rodents with an energy value of 2.71 kcal/g (22.1% proteins, 10.8% fats, 67.1% carbohydrates by calorie, RPE F.U.D. LLC, Ukraine). From the 8th to the 10th week, EO animals were injected with 1) reference modulators of H₂S exchange: transsulfation inhibitor D,L-propargylglycine (PGG, Sigma, USA) at a dose of 50 mg/kg and H₂S donor – NaHS (Sigma, USA) in a dose of 3 mg/kg administered once a day intraperitoneally; 2) potential modulators of the 3-mercaptopyruvate sulfur transferase pathway and thiosulfate-dependent H₂S synthesis:

zinc sulfate (ZnSO₄) at a dose of 124 mg/kg, α-lipoic acid (α-LA) at a dose of 100 mg/kg, sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃) at a dose of 300 mg/kg was administered intragastrically once a day. Control animals received equivalent amounts of solvents. Animals were removed from the experiment by decapitation under thiopental anesthesia (100 mg/kg intraperitoneally). The heart and thoracic aorta were removed, washed with a chilled solution of 1.15% KCl, a 200 mg tissue weight was taken to determine the H₂S content, the rest of the tissue was chopped with scissors, homogenized in a medium of 0.25 M sucrose, 0.01 M Tris (pH 7.4) in a ratio of 1:4 (mass/volume) at 3000 rpm (Teflon-glass), centrifuged for 30 minutes at 600 g at 4°C, aliquots of the centrifuge were taken into Eppendorf microtubes and stored at -20°C until the research.

The content of H₂S in the myocardium and aorta was determined by the spectrophotometric method, according to Wiliński [13]. The activity of CSE, CAT /3-MST in L-cysteine desulfurization reactions was determined according to Stipanuk [14] in a modification of [15]. The activity of H₂S formation from thiosulfate anion with the

participation of TST was determined as described [15]. The activity of sulfite oxidase was determined by the rate of reduction of potassium hexocyanoferrate in the presence of sulfite anion [16], the activity of thioredoxin reductase (KF 1.8.1.9) – by the rate of NADPH-dependent reduction of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoate) [17]. The protein content in the samples was determined according to Lowry [18].

Statistical processing of the results was carried out in MS Excel and IBM Statistics SPSS 26 for Windows. The average value (M) and the average (m) error were calculated. The Mann-Whitney U test assessed the significance of the differences, the correlation of indicators was determined by the Spearman correlation coefficient (r_s). Differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant. Results are given as $M \pm m$.

Research results and their discussion.

It was established that a 10-week use of a high-calorie diet caused the formation of a deficiency of endogenous H_2S in the cardiovascular system of rats (**fig. 1A, B**). Thus, in the control group, the content of H_2S in the myocardium and aorta was 3.21 ± 0.18 and 2.15 ± 0.11 nmol/mg protein, and in the EO group – 1.85 ± 0.11 and 1.35 ± 0.06 nmol/mg of protein, which was, respectively, lower by 42.4% and 37.2% ($p < 0.001$). Administration of PGG (an irreversible inhibitor of CSE) aggravated H_2S deficiency in the myocardium and aorta of rats with EO: in group 3, this indicator was 58.2 and 68.8% ($p < 0.001$) lower than in control, and 27.6 and 50.3% ($p < 0.05$) lower than in rats of group 2. Administration of NaHS (a classical donor of H_2S) increased the level of H_2S in the myocardium and aorta of rats with EO; this indicator in group 4 was higher by 30.8 and 26.7% ($p < 0.05$) than in group 2. It turned out that all applied metabolic correctors provided a statistically significant increase in H_2S levels in the myocardium and aorta of rats with EO: α -LA (group 5) – by 44.8 and 51.1% ($p < 0.01$), $ZnSO_4$ (group 6) – by 58.4 and 40% ($p < 0.01$), $Na_2S_2O_3$ (group 7) – 32.4 and 19.3% ($p < 0.05$), respectively. Regarding their ability to reduce H_2S deficiency in the heart and vessels induced by a high-calorie diet, these modulators were not inferior to the reference donor NaHS, and α -LA and $ZnSO_4$ even slightly exceeded its effect.

A high-calorie diet caused a statistically significant decrease in the activity of PLP-dependent desulfurization of L-cysteine in the cardiovascular system of rats (**fig. 1C, D**): in the control group, CSE activity in the myocardium and aorta was 0.69 ± 0.02 and 0.98 ± 0.03 nmol H_2S /min mg protein, and in group 2 (EO) – 0.52 ± 0.02 and 0.63 ± 0.04 nmol H_2S /min mg protein, which, respectively, was lower by 24.6 and 35.7% ($p < 0.001$). Administration of PGG caused a more pronounced inhibition of PLP-dependent desulfurization of L-cysteine: CSE activity in the myocardium and aorta in group 3 was 39.1 and 56.1% lower than in control ($p < 0.001$) and 19.2 and 31.7% lower than in group 2 ($p < 0.05$). Administration of NaHS corrected changes in CSE activity in the myocardium and aorta under EO conditions: this indicator in group 4 (EO + NaHS) was higher by 26.9 and 46% ($p < 0.01$) than in group 2. In rats with EO, who received α -LA and $ZnSO_4$, also showed higher CSE activity in the myocardium (by 23.1 and 21.1%, $p < 0.01$) and aorta (by 39.6 and 36.5%, $p < 0.01$) compared to group 2, which practically corresponded to the corrective effect of NaHS. Administration of $Na_2S_2O_3$ did not cause sig-

nificant changes in CSE activity in the myocardium and aorta of rats with EO, and this indicator was statistically significantly lower (by 15.2 and 23.9%, $p < 0.05$) than in rats with EO that received NaHS.

The modulators of the H_2S exchange mentioned above caused practically comparable changes in the H_2S /CSE system in the myocardium and aorta. Subsequently, the effect of modulators on the mitochondrial pathways of sulfide metabolism was investigated only in the myocardium, where the expression of sulfurtransferases is more active. It was established that a 10-week high-calorie diet caused a statistically significant decrease in the activity of mitochondrial H_2S synthesis in the myocardium of rats (**fig. 2A, B**). In the control group, the activity of CAT/3-MST and TST was 1.56 ± 0.06 and 2.66 ± 0.16 nmol H_2S /min·mg protein, and in group 2 (EO) – 0.94 ± 0.04 and 1.59 ± 0.07 nmol H_2S /min mg protein, which was lower by 39.7 and 40.2% ($p < 0.001$), respectively. The introduction of PGG caused a more pronounced suppression of the activity of CAT/3-MST and TST in the myocardium: in group 3, these indicators were 43.0 and 49.2% lower than in control ($p < 0.001$), but the differences compared to group 2 were not statistically significant. The introduction of NaHS caused an increase in the activity of CAT/3-MST and TST in the myocardium under conditions of EO: in group 4, these indicators were higher by 24.5 and 54.1% ($p < 0.05$) than in group 2. In rats with EO, administration of α -LA caused an increase in CAT/3-MST activity by 40.4 and 23.9% ($p < 0.05$), and administration of $ZnSO_4$ by 54.2 and 66% ($p < 0.01$), respectively, compared to group 2. When using $Na_2S_2O_3$, a moderate increase in CAT/3-MST activity (by 20.2%, $p < 0.05$) and a significant increase in TST activity (by 79.8%, $p < 0.05$) was recorded, compared to group 2.

Under the conditions of a high-calorie diet, a decrease in the activity of the ways of deposition and utilization of sulfides was observed in the myocardium of rats (**fig. 2C, D**). Thus, in rats with EO, thioredoxin reductase and sulfite oxidase activity were 39.7 and 40.2% lower than in the control group. In EO rats treated with PGG, the activity of thioredoxin reductase and sulfite oxidase decreased more clearly (by 59.3 and 44.3%, $p < 0.001$) compared to the control, but the differences in group 2 were not statistically significant. On the other hand, the administration of NaHS to rats with EO provided a statistically significant increase in the activity of thioredoxin reductase and sulfite oxidase (by 38.4 and 39.0%, $p < 0.01$) compared to group 2.

The introduction of α -LA, $ZnSO_4$ and $Na_2S_2O_3$ caused an increase in the activity of thioredoxin reductase (by 46.1; 61.9 and 32.7%, $p < 0.01$) and sulfite oxidase (by 32.1; 48.9 and 65%, $p < 0.01$) compared to group 2. In terms of the ability to correct changes in the activity of mitochondrial enzymes of sulfide metabolism induced by a high-calorie diet, α -LA and $ZnSO_4$ were not inferior to the reference donor NaHS, and $Na_2S_2O_3$ even surpassed its effect on TST and sulfite oxidase (by 16.7 and 18.6%, $p < 0.05$).

Thus, under EO, an H_2S deficiency is formed in the cardiovascular system of rats, which is associated with a decrease in the activity of key H_2S -synthesizing enzymes (CSE, CAT/3-MST) and suppression of the activity of mitochondrial enzymes involved in the oxidation and deposition of H_2S . NaHS, cofactors of sulfide exchange

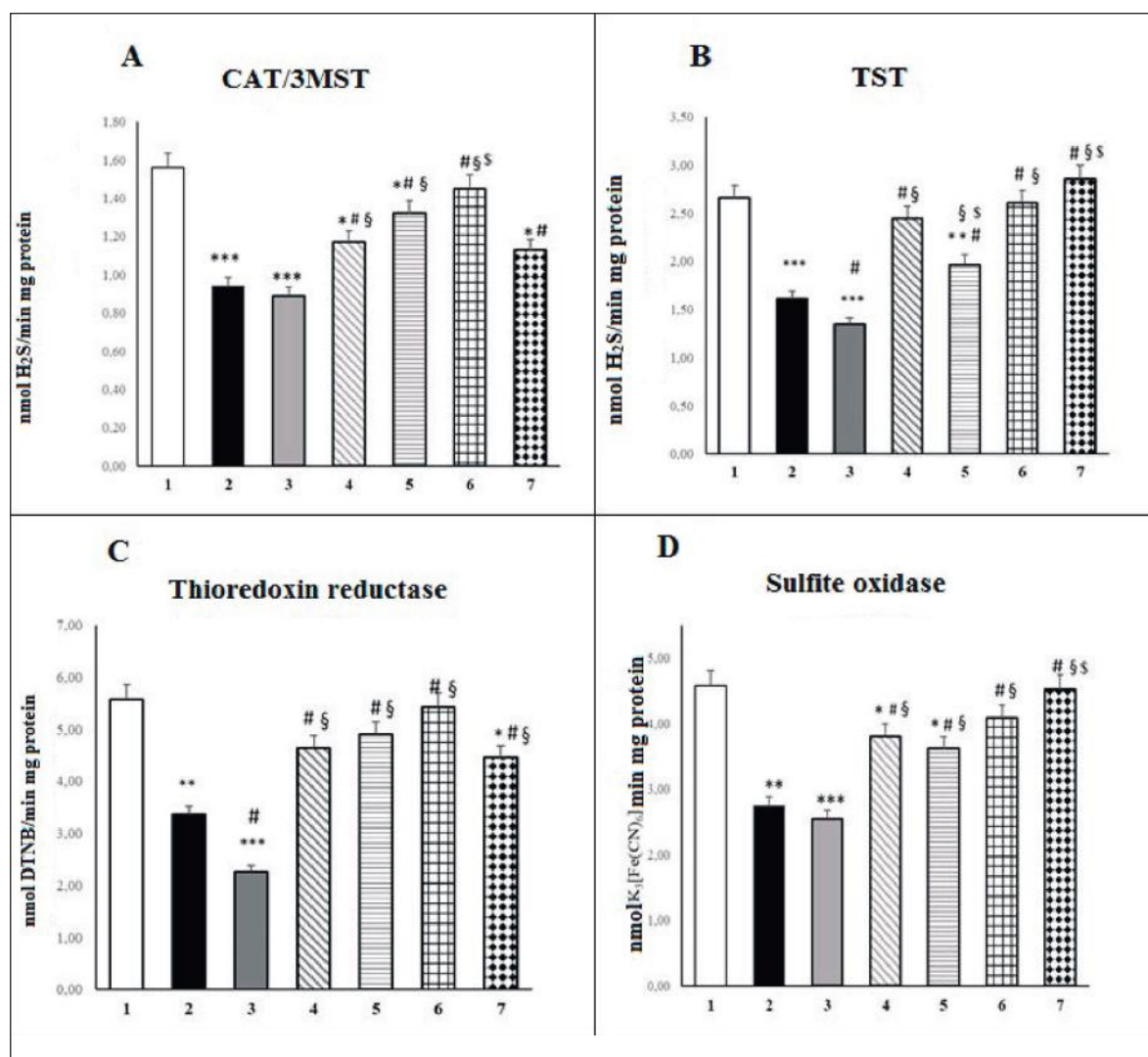


Figure 2 – Comparative evaluation of the effect of modulators of H₂S exchange on mitochondrial enzymes of sulfide exchange in the myocardium of rats with experimental obesity (M±m, n=10).

Notes: 1) groups: 1 – control; 2 – EO; 3 – EO+PGG; 4 – EO+NaHS; 5 – EO+α-LA; 6 – EO+ZnSO₄; 7 – EO + Na₂S₂O₃; 2) statistically significant differences: * – p<0.05 relative to the 1st group (** – p<0.01; *** – p<0.001); # – p<0.05 relative to the 2nd group; § – p<0.05 relative to the 3rd group; § – p<0.05 relative to the 4th group.

(α-LA, ZnSO₄) and Na₂S₂O₃ show the ability to correct the level of H₂S in the myocardium and aorta of rats with EO and also reduce the depressing effect of a high-fat diet on the processes of L-cysteine desulfurization, thio-sulfate-dependent reactions, increase the activity of H₂S formation thioredoxin reductase and sulfite oxidase.

Obesity is characterized by oxidative stress and persistent inflammation [19], which can cause changes in the conformation and native properties of redox-sensitive enzymes of H₂S metabolism and the development of deficiency of their cofactors and substrates. In particular, zinc, α-LA and thiosulfate are recognized antioxidants, and their need may increase under oxidative stress. For example, hypozincemia is often found in patients with obesity and diabetes, and taking zinc supplements reduces metabolic disorders and contributes to weight loss [20]. Taking α-LA also helps to reduce body weight in obese and overweight people and reduces the phenomena of oxidative stress, inflammation, and dyslipidemia [21].

Interest in the role of thiosulfate and thiosulfate sulfurtransferases in the pathogenesis of metabolic dis-

orders has significantly increased in recent years [8]. It was established that rhodanese (TST KF 2.8.1.1) expression in adipose tissue is positively correlated with insulin sensitivity and negatively correlated with fat mass [22]. Administration of thiosulfate (the main substrate of TST) to diabetic rats improved glucose absorption and reduced insulin resistance of 3T3-L1 adipocytes [8, 22].

The results of our studies on the effect of cofactors on the exchange of H₂S are consistent with the experimental data of Dugbartey G. J. et al. (2022), who showed the ability of α-LA to increase cardiac CSE expression and plasma H₂S levels in streptozotocin-diabetic rats, and demonstrated a reduction of this effect when PGG was administered [23]. There is evidence that α-LA can increase the expression of the thioredoxin reductase gene [24], and zinc can increase the reducing properties of thioredoxin [25]. TST affects the pool of antioxidants – it causes persulfidation of glutathione, which can reduce thioredoxin, provide sulfonation of cyanides and interconversion of sulfane sulfur [8]. It was shown that Na₂S₂O₃ in vivo and in vitro acted as an H₂S-mimetic: it inhibited the proliferation of cells in the wall of the ca-

rotid artery and segments of human veins, increased the formation of polysulfides and persulfidation of proteins, which was associated with tubulin depolymerization, cell cycle arrest, decreased migration and proliferation of smooth myocytes vessels [26].

Thus, α -LA, ZnSO_4 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ are capable of correcting the exchange of H_2S in the heart and blood vessels and can be used for this purpose in clinical conditions because, unlike the classic NaHS donor, these substances are included in ready-made dosage forms and are approved for use in practical medicine.

Conclusions.

1. During experimental obesity induced by a high-calorie diet, a deficiency of H_2S is formed in the cardiovascular system, the activity of the main H_2S -synthesizing enzymes (CSE, CAT/3-MST) and mitochondrial enzymes of sulfide metabolism (TST, thioredoxin reductase, sulfite oxidase) decreases. Obesity-associated disorders of H_2S metabolism in the myocardium and aorta are exacerbated by the administration of propargylglycine and reduced by the administration of NaHS.

2. α -LA, zinc sulfate, and sodium thiosulfate increase the level of H_2S in the myocardium and aorta, reduce the depressing effect of a high-fat diet on the processes of L-cysteine desulfurization and the thiosulfate-dependent pathway of H_2S formation, and increase the activity of thioredoxin reductase and sulfite oxidase. These modulators are not inferior to the classic NaHS donor in terms of their ability to adjust the level of H_2S in the cardiovascular system under conditions of obesity, and in terms of their effect on the mitochondrial links of sulfide exchange, they demonstrate a more pronounced effect.

Prospects for further research.

Elucidation of the role of modulators of various pathways of H_2S exchange in regulating the functional state of the cardiovascular system during obesity will allow the future to substantiate new personalized approaches to the prevention of cardiometabolic multimorbidity.

DOI 10.29254/2077-4214-2023-4-171-134-145

УДК 577.164.187:661.847.532:546.221.1:616-056.52:639.028

Бобецька О. П., Заїчко Н. В.

ВПЛИВ ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ, ЦИНКУ СУЛЬФАТУ ТА ТІОСУЛЬФАТУ НАТРІЮ НА ОБМІН H_2S В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРІННЯ

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (м. Вінниця, Україна)

olenabobetska@gmail.com

Стаття присвячена вивченню особливостей обміну гідроген сульфідом (H_2S) в серці та судинах за експериментального ожиріння, індукованого висококалорійною високожировою дієтою, обґрунтуванню підходів до корекції виявлених порушень модулятором різних шляхів сульфідного обміну. Відомо, що зниження рівня ендogenous H_2S є чинником розвитку артеріальної гіпертензії, ішемічної хвороби серця, дисфункції лівого шлуночка, фіброзування міокарду та серцевої недостатності. Головним джерелом H_2S в серці та судинах є ПАЛФ-залежні реакції десульфування L-цистеїну, альтернативним джерелом можуть виступати сульфуртрансферазні реакції обміну тіосульфату. Роль різних шляхів обміну H_2S в механізмах ушкодження серцево-судинної системи за ожиріння нез'ясована і пошуку ефективних та безпечних коректорів сульфідного обміну є актуальним. Метою роботи було з'ясувати вплив ліпоєвої кислоти, цинку сульфату та тіосульфату натрію на обмін H_2S в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння (ЕО) та порівняти його з дією еталонних модуляторів шляху H_2S / цистатіонін- γ -ліаза. За результатами наших досліджень, ЕО характеризується формуванням дефіциту H_2S в серці та судинах, зниженням активності головних H_2S -синтезуючих ферментів (цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази / 3-мер каптопіруватсульфуртрансферази), інгібуванням мітохондріальних шляхів окиснення та депонування H_2S . Пропаргілгліцин поглиблює порушення сульфідного обміну, натомість еталонний донор H_2S (NaHS) зменшує їх виразність. Ліпоєва кислота, цинк сульфат, тіосульфат натрію ефективно коригують рівень H_2S серцево-судинній системі за умов ЕО, активують процеси десульфування L-цистеїну та тіосульфат-залежні реакції утворення H_2S , підвищують активність тіоредоксинредуктази та сульфітоксидази, і за ефективністю не поступаються NaHS. Встановлення ролі модуляторів обміну H_2S в регуляції функціонального стану серцево-судинної системи за ожиріння дозволить удосконалити лікування та профілактику кардіометаболічної мультиморбідності у перспективі.

Ключові слова: гідроген сульфід, ожиріння, метаболізм, серце, судини.

Зв'язок публікацій з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом планової НДР Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Роль екзогенних та ендogenous сірковмісних сполук в механізмах ураження внутрішніх органів та цитопroteкції за різних патологічних станів» (№ державної реєстрації 0119U001142).

Вступ.

За останні роки накопичилось чимало доказів щодо вагомості ролі сірковмісних амінокислот (метіоні-

ну, гомоцистеїну, цистеїну) та їх низькомолекулярного метаболіту – гідроген сульфідом (H_2S) у патогенезі серцево-судинних захворювань [1, 2, 3]. Встановлено, що H_2S володіє широким спектром фізіологічних ефектів: регулює скоротливість гладеньких міоцитів та кардіоміоцитів, впливає на провідну систему серця, забезпечує адаптацію міокарду до гіпоксії та ішемії, справляє антиоксидантну, протизапальну, протиапоптичну дію [3, 4]. Зниження рівня ендogenous H_2S є чинником розвитку артеріальної гіпертензії, ішемічної хвороби

Таблиця – Основні ензиматичні реакції обміну H_2S в серцево-судинній системі

Ензим (кофактор)	Схема реакції
ЦГЛ / ПАЛФ	$L\text{-цистеїн} + H_2O \rightarrow \text{піруват} + H_2S + NH_3$
ЦАТ / ПАЛФ	$L\text{-цистеїн} + \alpha\text{-кетоглутарат} \rightarrow 3\text{-меркаптопіруват} + \text{глутамат}$
3-МСТ тіоредоксин, Zn^{2+} , ліпоєва кислота	$3\text{-меркаптопіруват} \rightarrow \text{піруват} + H_2S$ $S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_3^{2-} + H_2S$ $(3\text{-МСТ-SH} \xrightarrow{\text{тіоредоксин}} 3\text{-МСТ-S-SH} + R(SH)_2 \rightarrow RS-S + H_2S)$
ТСТ / глутатіон, тіоредоксин	$S_2O_3^{2-} + 2\text{ G-SH} \rightarrow SO_3^{2-} + H_2S + GS-SG$ $2HS^- + 2O_2 \rightarrow S_2O_3^{2-} + H_2O$
SQR / ФАД	$H_2S + SO_3^{2-} + \text{ФАД} \rightarrow S_2O_3^{2-} + \text{ФАДН}_2$
Сульфітоксидаза	$SO_3^{2-} + H_2O + 2Fe^{3+} (\text{cyt c}) \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 2Fe^{2+} (\text{cyt c})$

серця, дисфункції лівого шлуночка, фіброзування міокарду та серцевої недостатності [4, 5].

В серцево-судинній системі тварин та людини утворення H_2S переважно відбувається з L-цистеїну (табл.) за участі ПАЛФ-залежних ензимів цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) та цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) разом 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою (3-МСТ, КФ 2.8.1.2), кофакторами останньої виступають тіоредоксин та дигідроліпоєва кислота та цинк [3, 6]. Додатковим джерелом ендogenous H_2S може слугувати реакція відновлення його власного метаболіту – тіосульфат-аніону за участі тіосульфатсульфуртрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.1; 2.8.1.3; 2.8.1.5), 3-МСТ, глутатіону та тіоредоксину [7, 8]. В мітохондріях відбувається утилізація H_2S , який окиснюється до тіосульфату та сульфіту (за участі сульфідгідроксидоредуктазної системи SQR), а сульфід далі перетворюється в сульфат за участі сульфітоксидази (КФ 1.8.3.1) [3, 9, 10]. Також у мітохондріях H_2S депонується у складі полісульфідів, персульфідів та сульфанзв'язаній формі за участі сульфуртрансферази та тіоредоксину [3, 10].

Роль різних шляхів обміну H_2S в механізмах ушкодження серцево-судинної системи за ожиріння остаточно нез'ясована. Відомо, що вісцеральна та периваскулярна жирова тканина також експресує ЦГЛ і є продуцентом H_2S , який стимулює проліферацію адипоцитів in vitro [11]. З'являється все більше інформації, що окремі біологічні ефекти H_2S реалізуються через тіосульфат-аніон, що має власні антиоксидантні та вазопротекторні властивості, а тіосульфатсульфуртрансферази залучені у механізми ініціації метаболічних розладів [8, 9]. Таким чином, пошук ефективних та безпечних коректорів різних шляхів обміну H_2S в серцево-судинній системі за ожиріння залишається актуальним. Гіпотетично, такі властивості можуть мати кофактори та косубстрати сульфуртрансферази – ліпоєва кислота, тіосульфат натрію, цинк сульфат, однак їх вплив на обмін H_2S в серці та судинах за ожиріння не визначено.

Мета дослідження.

З'ясувати вплив ліпоєвої кислоти, цинку сульфату та тіосульфату натрію на обмін H_2S в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння та порівняти його дію класичних модулаторів шляху H_2S / ЦГЛ.

Об'єкт і методи дослідження.

Досліди проведені на 70 білих статевозрілих лабораторних щурах-самцях із початковою масою 150-180 г. Експериментальні дослідження заплановані та про-

ведені згідно біоетичних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», відображених у резолюціях I-VII Національних конгресів України з біоетики (Київ, 2001-2019). Тварини перебували в стандартних

умовах експериментальної біологічної клініки ВНМУ ім. М.І. Пирогова: за 12-годинного світлового режиму день/ніч, температури $22 \pm 2^\circ\text{C}$ та відносної вологості повітря $55 \pm 5\%$, з вільним доступом до води та їжі. При рандомізації тварин у дослідні групи дотримувались принципу мінімізації відмінностей за масо-ростовими параметрами.

Експериментальне ожиріння (ЕО) викликали у 6 груп щурів (по 10 особин в кожній) шляхом застосування висококалорійної високожирової дієти з енергетичною цінністю 4,33 ккал/г (15,7% білків, 39,5% жирів, 44,8% вуглеводів за калоражем) упродовж 10 тижнів як описано [12]. Тварини контрольної групи отримували стандартний раціон для лабораторних гризунів з енергетичною цінністю 2,71 ккал/г (22,1% білків, 10,8% жирів, 67,1% вуглеводів за калоражем, ТОВ «НВП Ф.У.Д.», Україна). Тваринам з ЕО з 8-го по 10-й тиждень вводили 1) еталонні модулятори обміну H_2S : інгібітор трансульфування D,L-пропаргілгліцин (ППГ, Sigma, США) у дозі 50 мг/кг та донор H_2S – NaHS (Sigma, США) у дозі 3 мг/кг вводили 1 раз на добу внутрішньоочеревинно; 2) потенційні модулятори шляху 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази та тіосульфат-залежного синтезу H_2S : цинк сульфат ($ZnSO_4$) у дозі 124 мг/кг, α-ліпоєву кислоту (α-ЛК) у дозі 100 мг/кг, натрій тіосульфат ($Na_2S_2O_3$) у дозі 300 мг/кг вводили 1 раз на добу внутрішньошлунково. Контрольні тварини отримували еквівалентні кількості розчинників. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (100 мг/кг внутрішньоочеревинно). Вилучали серце та грудну аорту, промивали охолодженим розчином 1,15% KCl, відбирали наважку тканини 200 мг для визначення вмісту H_2S , решту тканини подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (pH 7,4) у співвідношенні 1:4 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло), центрифугували 30 хвилин при 600 g при 4°C , аліквоти центрифугату відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20°C .

Вміст H_2S в міокарді та аорті визначали спектрофотометричним методом за Wiliński [13]. Активність ЦГЛ, ЦАТ / 3-МСТ в реакціях десульфуровування L-цистеїну визначали за Stipanuk [14] у модифікації [15]. Активність утворення H_2S з тіосульфат-аніону за участі ТСТ визначали як описано [15]. Активність сульфітоксидази визначали за швидкістю відновлення гексоціаноферату калію в присутності сульфід-аніону [16], активність тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9) – за швидкістю NADPH-

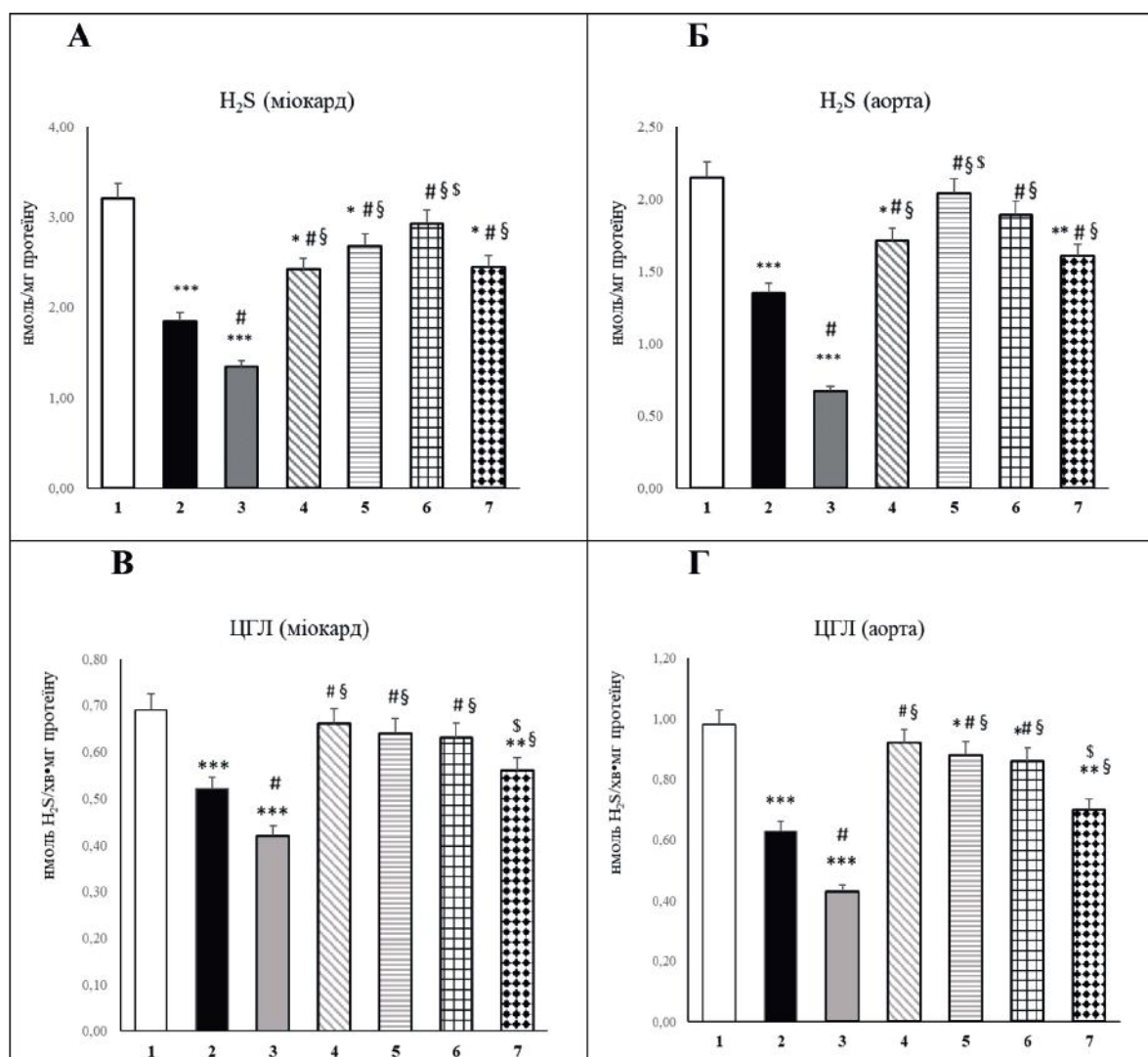


Рисунок 1 – Порівняльна оцінка впливу модуляторів обміну H₂S на стан системи H₂S / цистатіонін-γ-ліаза (ЦГЛ) в міокарді та аорті щурів з експериментальним ожирінням (M±m, n=10).

Примітки: 1) групи: 1 – контроль; 2 – EO; 3 – EO+ППГ; 4 – EO+NaHS; 5 – EO+α-ЛК; 6 – EO+ZnSO₄; 7 – EO + Na₂S₂O₃; 2) статистично значущі відмінності: * – p<0,05 відносно 1-ої групи (** – p<0,01; *** – p<0,001); # – p<0,05 відносно 2-ої групи; § – p<0,05 відносно 3-ої групи; \$ – p<0,05 відносно 4-ої групи.

залежного відновлення 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату) [17]. Вміст протеїну в пробах визначали за Lowry [18].

Статистичну обробку результатів проводили в пакеті MS Excel та IBM Statistics SPSS 26 for Windows. Розраховували середнє значення (M), похибку середнього (m). Достовірність відмінностей оцінювали за U критерієм Манна-Уїтні, зв'язок показників визначали за коефіцієнтом кореляції Спірмана (r_s). Статистично значущими вважали відмінності при p<0,05. Результати наведено як M±m.

Результати дослідження та їх обговорення.

Встановлено, що 10-тижневе застосування висококалорійної дієти викликало формування дефіциту ендogenous H₂S в серцево-судинній системі щурів (рис. 1 А, Б). Так, в групі контролю вміст H₂S в міокарді та аорті становив 3,21±0,18 та 2,15±0,11 нмоль/мг протеїну, а в групі EO – 1,85±0,11 та 1,35±0,06 нмоль/мг протеїну, що було, відповідно, нижчим на 42,4% та 37,2% (p<0,001). Введення ППГ (необоротного інгібітору ЦГЛ) поглиблювало дефіцит H₂S в міокарді та аорті щурів з EO: в групі 3 цей показник був на 58,2 та 68,8% (p<0,001) нижчим, ніж в контролі, та на 27,6 та

50,3% (p<0,05) нижчим, ніж у щурів групи 2. Введення NaHS (класичного донору H₂S) підвищувало рівень H₂S в міокарді та аорті щурів з EO; цей показник в групі 4 був вищим на 30,8 та 26,7% (p<0,05), ніж в групі 2. Виявилось, що усі застосовані метаболічні коректори забезпечили статистично значуще підвищення рівня H₂S в міокарді та аорті щурів з EO: α-ЛК (група 5) – на 44,8 та 51,1% (p<0,01), ZnSO₄ (група 6) – на 58,4 та 40% (p<0,01), Na₂S₂O₃ (група 7) – 32,4 та 19,3% (p<0,05), відповідно. За здатністю зменшувати дефіцит H₂S в серці та судинах, індукований висококалорійною дієтою, вказані модулятори не поступались еталонному донору NaHS, а α-ЛК та ZnSO₄ навіть дещо перевершували його ефект.

Висококалорійна дієта викликала статистично значуще зниження активності ПАЛФ-залежного десульфуровання L-цистеїну в серцево-судинній системі щурів (рис. 1 В, Г): в групі контролю активність ЦГЛ в міокарді та аорті становила 0,69±0,02 та 0,98±0,03 нмоль H₂S/хв·мг протеїну, а в групі 2 (EO) – 0,52±0,02 та 0,63±0,04 нмоль H₂S/хв·мг протеїну, що відповідно, було нижчим на 24,6 та 35,7% (p<0,001). Введен-

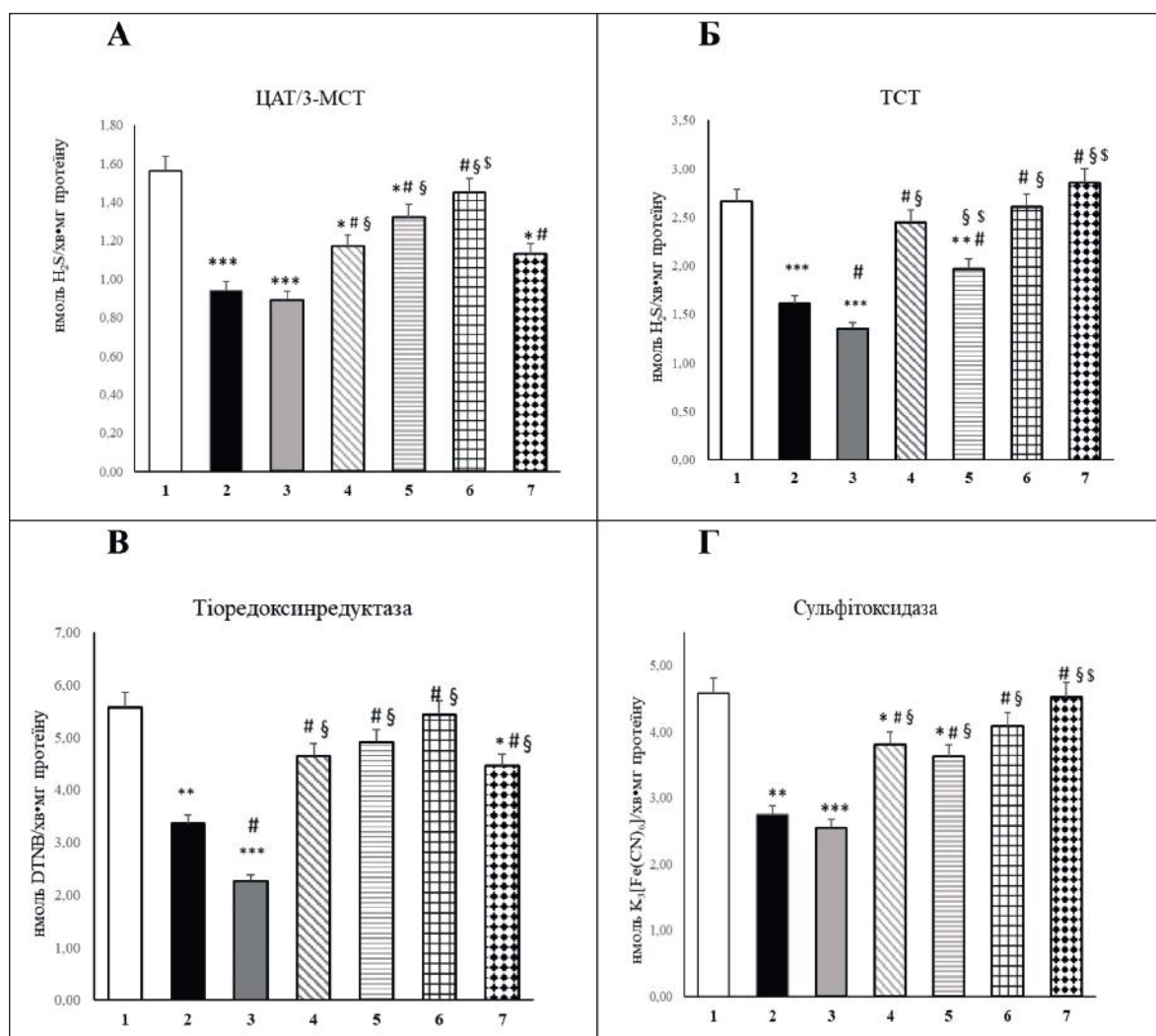


Рисунок 2 – Порівняльна оцінка впливу модуляторів обміну H₂S на мітохондріальні ферменти сульфідного обміну в міокарді щурів з експериментальним ожирінням (M±m, n=10).

Примітки: 1) групи: 1 – контроль; 2 – EO; 3 – EO+ППГ; 4 – EO+α-ЛК; 5 – EO+α-ЛК; 6 – EO+ZnSO₄; 7 – EO + Na₂S₂O₃; 2) статистично значущі відмінності: * – p<0,05 відносно 1-ої групи (** – p<0,01; *** – p<0,001); # – p<0,05 відносно 2-ої групи; § – p<0,05 відносно 3-ої групи; \$ – p<0,05 відносно 4-ої групи.

ня ППГ викликало більш виразне пригнічення ПАЛФ-залежного десульфування L-цистеїну: активність ЦГЛ в міокарді та аорті в групі 3 була на 39,1 та 56,1% нижчою, ніж в контролі (p<0,001) та на 19,2 та 31,7%, нижчою, ніж в групі 2 (p<0,05). Введення NaHS коригувало зміни активності ЦГЛ в міокарді та аорті за умов EO: цей показник в групі 4 (EO + NaHS) був вищим на 26,9 та 46% (p<0,01), ніж в групі 2. У щурів з EO, які отримували α-ЛК та ZnSO₄, також виявлялась вища активність ЦГЛ в міокарді (на 23,1 та 21,1%, p<0,01) та аорті (на 39,6 та 36,5%, p<0,01) порівняно з групою 2, що практично відповідало коригуючому ефекту NaHS. Введення Na₂S₂O₃ не викликало суттєвих змін активності ЦГЛ в міокарді та аорті у щурів з EO, і цей показник виявився статистично значуще нижчим (на 15,2 та 23,9%, p<0,05), ніж у щурів з EO, які отримували NaHS.

Вищезазначені модулятори обміну H₂S викликали практично співставні за величиною та спрямованістю зміни в системі H₂S/ЦГЛ в міокарді та аорті. В подальшому вплив модуляторів на мітохондріальні шляхи сульфідного обміну був досліджений лише в міокарді, де експресія сульфуртрансфераз є більш активною. Встановлено, що 10-тижнева висококалорійна дієта

викликала статистично значуще зниження активності мітохондріального синтезу H₂S в міокарді щурів (рис. 2 А, Б). В групі контролю активність ЦАТ/3-МСТ та ТСТ становила 1,56±0,06 та 2,66±0,16 нмоль H₂S/хв·мг протеїну, а в групі 2 (EO) – 0,94±0,04 та 1,59±0,07 нмоль H₂S/хв·мг протеїну, що було нижчим на 39,7 та 40,2% (p<0,001), відповідно. Введення ППГ викликало більш виразне пригнічення активності ЦАТ/3-МСТ та ТСТ в міокарді: в групі 3 ці показники були на 43,0 та 49,2% нижчими, ніж в контролі (p<0,001), але відмінності по відношенню до групи 2 не були статистично значущими. Введення NaHS викликало підвищення активності ЦАТ/3-МСТ та ТСТ в міокарді за умов EO: групі 4 ці показники були вищими на 24,5 та 54,1% (p<0,05), ніж в групі 2. У щурів з EO введення α-ЛК викликало підвищення активності ЦАТ/3-МСТ на 40,4 та 23,9% (p<0,05), а введення ZnSO₄ – на 54,2 та 66% (p<0,01), відповідно, порівняно з групою 2. При застосуванні Na₂S₂O₃ реєструвалось помірне підвищення активності ЦАТ/3-МСТ (на 20,2%, p<0,05) та значне зростання активності ТСТ (на 79,8%, p<0,05), порівняно з групою 2.

За умов висококалорійної дієти спостерігалось зниження активності шляхів депонування та утилізації

сульфідів в міокарді щурів (рис. 2В, Г). Так, у щурів з ЕО активність тіоредоксинредуктази та сульфітоксидази була на 39,7 та 40,2% нижчою, ніж в групі контролю. У щурів з ЕО, які отримували ППГ, активність тіоредоксинредуктази та сульфітоксидази знижувалась більш виразно (на 59,3 та 44,3%, $p < 0,001$) порівняно з контролем, але відмінності по відношенню до групи 2 не були статистично значущими. Натомість, введення NaHS щурам з ЕО забезпечило статистично значуще підвищення активності тіоредоксинредуктази та сульфітоксидази (на 38,4 та 39,0%, $p < 0,01$) порівняно з групою 2.

Введення α -ЛК, ZnSO_4 та $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ викликало підвищення активності тіоредоксинредуктази (на 46,1; 61,9 та 32,7%, $p < 0,01$) та сульфітоксидази (на 32,1; 48,9 та 65%, $p < 0,01$) порівняно з групою 2. За здатністю коригувати зміни активності мітохондріальних ензимів сульфідного обміну, індуковані висококалорійною дієтою, α -ЛК та ZnSO_4 не поступались еталонному донору NaHS, а $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ навіть перевершував його вплив на ТСТ та сульфітоксидазу (на 16,7 та 18,6%, $p < 0,05$).

Таким чином, за ЕО відбувається формування дефіциту H_2S в серцево-судинній системі щурів, що асоціюється зі зниженням активності ключових H_2S -синтезуючих ензимів (ЦГЛ, ЦАТ/3-МСТ) та пригніченням активності мітохондріальних ензимів, залучених у процеси окиснення та депонування H_2S . NaHS, кофактори сульфідного обміну (α -ЛК, ZnSO_4) та $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ виявляють здатність коригувати рівень H_2S в міокарді та аорті щурів з ЕО, а також зменшують депримуєчий вплив високожирової дієти на процеси десульфуровання L-цистеїну, тіосульфат-залежні реакції утворення H_2S , підвищують активність тіоредоксинредуктази та сульфітоксидази.

Ожиріння характеризується оксидативним стресом та персистуючим запаленням [19], що може викликати зміни конформації та нативних властивостей редокс-чутливих ензимів обміну H_2S , розвиток дефіциту їх кофакторів та субстратів. Зокрема, цинк, α -ЛК та тіосульфат є визнаними антиоксидантами і за оксидативного стресу потреба в них може зростати. Так, у пацієнтів з ожирінням та цукровим діабетом часто виявляється гіпоцинкемія, а прийом препаратів цинку зменшує метаболічні розлади та сприяє зниженню маси тіла [20]. Прийом α -ЛК також сприяє зниженню маси тіла у осіб з ожирінням та надлишковою вагою, зменшує явища оксидативного стресу, запалення, дисадипокінемії [21].

Інтерес до ролі тіосульфату та тіосульфатсульфуротрансфераз у патогенезі метаболічних розладів суттєво посилюється в останні роки [8]. Встановлено, що експресія роданези (ТСТ КФ 2.8.1.1) в жировій тканині позитивно корелює з чутливістю до інсуліну і негативно корелює з жировою масою [22]. Введення щурам з цукровим діабетом тіосульфату (основного субстрату ТСТ) покращувало засвоєння глюкози і зменшувало інсулінорезистентність адипоцитів 3T3-L1 [8, 22].

Результати наших досліджень щодо впливу кофакторів на обмін H_2S узгоджуються з експериментальними даними Dugbartey G. J. et al. (2022), які показали здатність α -ЛК підвищувати експресію ЦГЛ в серці та рівень H_2S в плазмі крові у щурів з стрептозотоциновим діабетом, і засвідчили зменшення цього ефекту при введенні ППГ [23]. Існують докази, що α -ЛК може підвищувати експресію гена тіоредоксинредуктази [24], а цинк – збільшувати відновлювальні властивості тіоредоксину [25]. ТСТ впливає на пул антиоксидантів – викликає персульфідацію глутатіону, який може відновлювати тіоредоксин, забезпечувати сульфонування ціанідів та інтерконверсію сульфана сульфур [8]. Показано, що $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in vivo та in vitro діяв як H_2S -міметик: пригнічував проліферацію клітин у стінці сонної артерії та сегментах вен людини, підвищував утворення полісульфідів та персульфідацію білків, що асоціювалось з деполімеризацією тубуліна, зупинкою клітинного циклу, зниженням міграції та проліферації гладеньких міоцитів судин [26].

Таким чином, α -ЛК, ZnSO_4 та $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ здатні коригувати обмін H_2S в серці та судинах і можуть бути застосовані з цією метою в клінічних умовах, адже, на відміну від класичного донору NaHS, ці речовини входять до складу готових лікарських форм і дозволені до застосування в практичній медицині.

Висновки.

За експериментального ожиріння, індукованого висококалорійною дієтою, в серцево-судинній системі формується дефіцит H_2S , знижується активність основних H_2S -синтезуючих ензимів (ЦГЛ, ЦАТ/3-МСТ) та мітохондріальних ензимів сульфідного обміну (ТСТ, тіоредоксинредуктази, сульфітоксидази). Асоційовані з ожирінням порушення обміну H_2S в міокарді та аорті поглиблюються при введенні пропаргілгілцину і зменшуються при введенні NaHS.

α -Ліпоева кислота, цинк сульфат та тіосульфат натрію підвищують рівень H_2S в міокарді та аорті, зменшують депримуєчий вплив високожирової дієти на процеси десульфуровання L-цистеїну та тіосульфат-залежний шлях утворення H_2S , підвищують активність тіоредоксинредуктази та сульфітоксидази. Вказані модулятори за здатністю коригувати рівень H_2S в серцево-судинній системі за умов ожиріння не поступаються класичному донору NaHS, а за впливом на мітохондріальні ланки сульфідного обміну демонструють більш виразний ефект.

Перспективи подальших досліджень.

З'ясування ролі модуляторів різних шляхів обміну H_2S в регуляції функціонального стану серцево-судинної системи за ожиріння дозволить у перспективі обґрунтувати нові персоналізовані підходи до профілактики кардіометаболічної мультиморбідності.

References / Література

1. Lima A, Ferin R, Bourbon M, Baptista J, Pavão ML. Hypercysteinemia, a potential risk factor for central obesity and related disorders in Azores, Portugal. J Nutr Metab. 2019 Jun 20;2019:1–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/1826780>.
2. Paganelli F, Mottola G, Fromonot J, Marlinge M, Deharo P, Guieu R, et al. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease: is the adenosinergic system the missing link? Int J Mol Sci. 2021 Feb 8;22(4):1690. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041690>.
3. Kolluru GK, Shackelford RE, Shen X, Dominic P, Kevil CG. Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. Nat Rev Cardiol. 2023 Feb;20(2):109–125. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>.

4. Shen Y, Shen Z, Luo S, Guo W, Zhu YZ. The cardioprotective effects of hydrogen sulfide in heart diseases: from molecular mechanisms to therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:1–13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/925167>.
5. Kang SC, Sohn EH, Lee SR. Hydrogen sulfide as a potential alternative for the treatment of myocardial fibrosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jan 23;2020:1–14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4105382>.
6. Hipólito A, Nunes SC, Vicente JB, Serpa J. Cysteine Aminotransferase (CAT): a pivotal sponsor in metabolic remodeling and an ally of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST) in cancer. *Molecules*. 2020 Sep 1;25(17):3984. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25173984>.
7. Libiad M, Mottl N, Akey DL, Sakamoto N, Fearon ER, Smith JL, et al. Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin. *J Biol Chem*. 2018 Feb 29;293(8):2675–2686. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.ra117.000826>.
8. Kruithof PD, Lunev S, Aguilar Lozano SP, de Assis Batista F, Al-dahmani ZM, Joles JA, et al. Unraveling the role of thiosulfate sulfurtransferase in metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Jun;1866(6):165716. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165716>.
9. Zhang MY, Dugbartey GJ, Juriasingani S, Sener A. Hydrogen sulfide metabolite, sodium thiosulfate: clinical applications and underlying molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 16;22(12):6452. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22126452>.
10. Kolluru GK, Shen X, Kevil CG. Reactive sulfur species: a new redox player in cardiovascular pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Apr;40(4):874–884. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.120.314084>.
11. Yang G, JuY, Fu M, Zhang Y, Pei Y, Racine M, et al. Cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide system is essential for adipogenesis and fat mass accumulation in mice. *Biochim Biophys Acta Molec Cell Biol Lip*. 2018 Feb;1863(2):165–176. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.008>.
12. Blazhchenko VV, Zaichko NV. Vplyv zinc sulfatu, tiotsulfatu natriu, lipoewoi kysloty, taurynu na ekspresiu enzymiv syntezu hidrohen sul'fidu, mediatory zapalennia, fibrohenezu v nyrkakh shchuriv z diet-indukovanyim ozhyrinniam Visnyk problem biologii i medycyny. 2022;1(2):114–125. DOI: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-114-125>. [in Ukrainian]
13. Wiliński B, Wiliński J, Somogyi E, Piotrowska J, Opoka W. Metformin raises hydrogen sulfide tissue concentrations in various mouse organs. *Pharm Report*. 2013 May;65(3):737–742. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71053-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71053-3).
14. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982 Aug 15;206(2):267–277. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/bj2060267>.
15. Zaichko NV, Pentiuk NO, Melnik AV, Shtat'ko OL. Utvorennia hidrohen sul'fidu v orhanakh shchuriv. *Medychna khimiya*. 2009;11(4):7–13. [in Ukrainian].
16. Cohen H, Fridovich I. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. *Biol Chem*. 1971 Jan 25;246(2):359–366.
17. Jung HI, Lim HW, Kim BC, Park EH, Lim CJ. Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines. *YMJ*. 2004;45(2):263. DOI: <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2004.45.2.263>.
18. Lowry OH, Rosebrough N J, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265–275.
19. Man AWC, Zhou Y, Xia N, Li H. Perivascular adipose tissue oxidative stress in obesity. *Antioxid*. 2023 Aug 10;12(8):1595. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox12081595>.
20. Abdollahi S, Toupchian O, Jayedi A, Meyre D, Tam V, Soltani S. Zinc supplementation and body weight: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Adv Nutr*. 2020 Mar;11(2):398–411. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/advances/nmz084>.
21. El Amrousy D, El-Affify D. Effects of alpha lipoic acid as a supplement in obese children and adolescents. *Cyt*. 2020 Jun;130:155084. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155084>.
22. Morton NM, Beltram J, Carter RN, Michailidou Z, Gorjanc G, McFadden C, et al. Genetic identification of thiosulfate sulfurtransferase as an adipocyte-expressed antidiabetic target in mice selected for leanness. *Nat Med*. 2016 Jun 6;22(7):771–779. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4115>.
23. Dugbartey GJ, Wonje QL, Alorinyo KK, Adams I, Diaba DE. Alpha-lipoic acid treatment improves adverse cardiac remodelling in the diabetic heart – The role of cardiac hydrogen sulfide-synthesizing enzymes. *Biochem Pharmacol*. 2022 Sep;203:115179. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115179>.
24. Larghero P, Vene R, Minghelli S, Travaini G, Morini M, Ferrari N, et al. Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression. *Carcinogenesis*. 2006 Nov 27;28(5):1008–20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgl233>.
25. Hajjaji HE, Dumoulin M, Matagne A, Colau D, Roos G, Messens J, et al. The Zinc center influences the redox and thermodynamic properties of Escherichia coli thioredoxin 2. *J Mol Biol*. 2009 Feb;386(1):60–71. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.046>.
26. Macabrey D, Longchamp A, MacArthur MR, Lambelet M, Urfer S, Deglise S, et al. Sodium thiosulfate acts as a hydrogen sulfide mimetic to prevent intimal hyperplasia via inhibition of tubulin polymerisation. *eBioMed*. 2022 Apr;78:103954. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103954>.

ВПЛИВ ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ, ЦИНКУ СУЛЬФАТУ ТА ТІОСУЛЬФАТУ НАТРІЮ НА ОБМІН H₂S В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРІННЯ

Бобецька О. П., Заїчко Н. В.

Резюме. Вступ. Сірковмісні амінокислоти та їх метаболіт гідроген сульфід (H₂S) відіграють вагомую роль у патогенезі серцево-судинних захворювань та метаболічних розладів. Зниження рівня ендогенного H₂S є чинником артеріальної гіпертензії, дисфункції лівого шлуночка, фіброзу міокарду, серцевої недостатності. Роль різних шляхів обміну H₂S в механізмах ушкодження серця та судин остаточно не з'ясована, не визначені підходи до корекції сульфідного обміну за ожиріння.

Мета: з'ясувати вплив ліпоєвої кислоти, цинку сульфату та тіосульфату натрію на обмін H₂S в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння (ЕО) та порівняти його з дією класичних модуляторів шляху H₂S / цистатіонін-γ-ліаза (ЦГЛ).

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведено на 70 білих нелінійних щурах-самцях із дотриманням біоетичних норм та принципів (Страсбург, 1986; Київ, 2001). ЕО викликали застосуванням висококалорійної дієти (4,33 ккал/г, 39,5% жирів) упродовж 10 тижнів. Група контролю отримувала стандартний раціон (2,71 ккал/г, 10,8% жирів). Модулятори обміну H₂S – пропаргілліцин, NaHS, α-ліпоєву кислоту (α-ЛК), цинк сульфат, тіосульфат натрію вводили упродовж останніх 2-х тижнів щурам з ЕО. В міокарді та грудній аорті визначали вміст H₂S та активність ферментів обміну H₂S. Статистичну обробку результатів проводили в пакеті IBM Statistics SPSS 26. Достовірність відмінностей оцінювали за U критерієм Манна-Уїтні при p < 0,05.

Результати. У щурів з ЕО виявлялось зниження вмісту H₂S в міокарді та аорті (на 42,4 та 37,2 %, p < 0,001) порівняно з контролем. Введення пропаргілліцину (50 мг/кг) поглиблювало дефіцит H₂S, у той час як введення NaHS (3 мг/кг) та модуляторів сульфідного обміну – α-ЛК (100 мг/кг), цинк сульфату (124 мг/кг), тіосульфату натрію (300 мг/кг) підвищувало рівень H₂S в міокарді та аорті щурів з ЕО. За ЕО в серцево-судинній

системі щурів реєструвалось зниження активності десульфування L-цистеїну (за участі цистатіонін-γ-ліази та цистеїнамінотрансферази/ 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази) та тіосульфат-залежного утворення H_2S (за участі тіосульфатсульфуртрансферази), знижувалась активність тіоредоксинредуктази та сульфітоксидази. Введення пропаргіліцину поглиблювало виявлені порушення, а введення NaHS, α-ЛК, цинк сульфату та тіосульфату натрію сприяло нормалізації активності ензимів обміну H_2S . Найкращий коригуючий ефект щодо різних шляхів обміну H_2S справляли α-ЛК та цинк сульфат, а тіосульфат натрію найбільш ефективно підвищував активність тіосульфатсульфуртрансферази.

Висновки. За ожиріння формується дефіцит H_2S в серцево-судинній системі, що асоціюється зі зниженням активності H_2S -синтезуючих ензимів та мітохондріальних ензимів сульфідного обміну. Кофактори сульфуртрансфераз (ліпоєва кислота, цинк, тіосульфат) ефективно коригують рівень ендogenous H_2S в серці та судинах за ожиріння, і за цим ефектом не поступаються NaHS.

Ключові слова: гідроген сульфід, ожиріння, метаболізм, серце, судини.

THE EFFECT OF LIPOIC ACID, ZINC SULFATE AND SODIUM THIOSULFATE ON H_2S METABOLISM IN CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS IN EXPERIMENTAL OBESITY

Bobetska O. P., Zaichko N. V.

Abstract. *Introduction.* Sulfur-containing amino acids and their metabolite hydrogen sulfide (H_2S) play a pivotal role in the pathogenesis of cardiovascular diseases and metabolic disorders. Decrease of endogenous H_2S level is considered to be a unifying mechanism for the arterial hypertension, left ventricular systolic dysfunction, myocardial fibrosis, heart failure. Little is known about the role of different H_2S metabolic pathways in heart and vessels impairment. Strategies for sulfide metabolism correction in obesity outline areas for the future study.

The aim of study: to establish the effect of lipoic acid, zinc sulfate and sodium thiosulfate on H_2S metabolism in cardiovascular system of rats in experimental obesity (EO) and further comparison with influence of the conventional modulators of H_2S /cystathionine-γ-lyase (CSE) metabolic pathways.

Object and methods of research. The experiments were performed on 70 white non-linear male rats in accordance with general principles of bioethics (Strasbourg, 1986, Kyiv, 2001). EO was simulated by a high-calorie diet (4,33 kcal/g, 39,5% fat) for 10 weeks. Control rats group received a standard feed (2,71 kcal/g, 10,8% fat). Rats with EO were administered H_2S metabolism modulators – propargylglycine, NaHS, α-lipoic acid (α-LA), zinc sulfate, sodium thiosulfate during the last 2 weeks of the experiment. The level of H_2S and activity of H_2S metabolism enzymes in myocardium and thoracic aorta were determined. Statistical processing was performed in the package IBM Statistics SPSS 26. The significance of the differences was assessed by the Mann-Whitney U test at $p < 0.05$.

Results. Rats with EO exhibited a decreased level of H_2S myocardium and aorta (42,4 and 37,2%, $p < 0,001$) compared to those from the control group. Propargylglycine (50 mg/kg) supplementation caused aggravation of H_2S deficiency, while NaHS (3 mg/kg) and sulfide metabolism modulators – α-LA (100 mg/kg), zinc sulfate (124 mg/kg), sodium thiosulfate (300 mg/kg) promoted elevation of H_2S level in myocardium and aorta of rats with EO. Activity of L-cysteine desulfurization (by cystathionine-γ-lyase and cysteine aminotransferase/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase) and thiosulfate-mediated synthesis of H_2S (by thiosulfate sulfurtransferases) was decreased, diminishing of thioredoxin reductase and sulfite oxidase activity in cardiovascular system of rats with EO have been identified as well. Propargylglycine exacerbated violations, mentioned above. NaHS, α-LA, zinc sulfate, sodium thiosulfate supplementation represented a promising approach for adjusting H_2S metabolism enzymes activity. In summary, α-LA and zinc sulfate held the strongest potential to correct different H_2S metabolic pathways. Sodium thiosulfate was the most resultant in the enhancement of thiosulfate sulfurtransferase activity.

Conclusions. H_2S deficiency in cardiovascular system accompanying obesity is associated with decreased activity of H_2S -synthesizing enzymes and mitochondrial enzymes of sulfide metabolism. Cofactors of sulfurtransferases (lipoic acid, zinc, sodium thiosulfate) are good at correction of endogenous H_2S content in heart and vessels in obesity. Moreover, their corrective effect is the same as than NaHS demonstrates.

Key words: hydrogen sulfide, obesity, metabolism, heart, vessels.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Bobetska O. P.: <https://orcid.org/0009-0009-5762-2875> ^{ABCD}

Zaichko N. V.: <https://orcid.org/0000-0003-1889-6151> ^{EF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The Authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Bobetska Olena Pylypivna / Бобецька Олена Пилипівна

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya / Вінницький національний університет ім. М.І. Пирогова

Ukraine, 21018, Vinnytsia, 56 Pyrohov str. / Адреса: Україна, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова 56

Tel.: +380977211012 / Тел.: +380977211012

E-mail: olenabobetska@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 24.05.2023 / Стаття надійшла 24.05.2023 року

Accepted 09.11.2023 / Стаття прийнята до друку 09.11.2023 року