

N. Raksha, PhD, O. Savchuk, Dr Hab.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,  
T. Maievska, PhD  
NGO "Ukraine's fishing industry cluster of innovations", Kyiv, Ukraine

### OBTAINING PEPTIDES FROM AQUATIC ORGANISMS OF THE ANTARCTIC REGION

The rapid growth in demand for peptide drugs is actualizing the search for new natural and economically viable sources of raw materials. The wide variety of biologically active compounds, including peptide nature, inherent in marine aquatic organisms allows us to consider their promising raw material resource. However, the use of marine objects as a source for the production of target molecules requires some optimization of existing methodological approaches to their isolation and ensure the appropriate degree of purification. The problem of optimization of the method of obtaining peptides from hydrobionts of the Antarctic region on the example of the hydrobiont *Nacellaconcinna* is solved in the work. The proposed three-step approach allows to isolate fractions of peptides of different molecular weight. The first step involved the precipitation of high molecular weight protein material first with perchloric acid and then with 80% ethyl alcohol. The result was a fraction of peptide molecules with a molecular weight of up to 6.5 kDa, which contained a small amount of high molecular weight protein impurities. Further purification of the obtained fraction was performed by ultrafiltration using membranes with a pore size of 10 kDa. Control of the protein-peptide composition of the sample at all stages of production was performed by disk electrophoresis under denaturing conditions in plates of 18% polyacrylamide gel. Analysis using 2D electrophoresis found that the isoelectric points of most peptides are in the pH range from 8.0 to 10.0. Only a small proportion of the peptides had isoelectric points at 4.0 and 5.0 pH. The final step of obtaining the peptide fraction involved fractionation of the sample by gel chromatography. As a result of chromatographic separation, four peaks were obtained, corresponding to the fractions with peptides, the molecular weight of which is about 2.3 kDa (1 peak), 1.9 kDa (2 peak), 1.4 kDa (3 peak) and 0.7 kDa (4 peak).

Keywords: hydrobionts, peptide fraction, production method.

УДК: 612.17+577.1

DOI 10.17721/1728\_2748.2021.84.43–47

Р. Федічкіна, асп., Ю. Коркач, канд. біол. наук, І. Охай, асп.,  
Ю. Гошовська, канд. біол. наук, В. Сагач, д-р мед. наук.  
Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

### ВПЛИВ МОДУЛЮВАННЯ СИНТЕЗУ СІРКОВОДНЮ ТА ГЛУТАТІОНУ НА ОКИСНО-НІТРОЗАТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МІОКАРДА В УМОВАХ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

Підтримання окисно-відновного балансу є необхідною умовою для забезпечення нормального метаболізму клітин серця. Ішемічно-реперфузійні порушення функції серця супроводжуються вибухоподібним утворенням АФК, пошкодженням мембран клітини, порушенням функцій білків, розвитком м'язової контрактури тощо. Відомо про кардіопротекторний вплив сірководню ( $H_2S$ ), який синтезується з L-цистеїну. Крім того, L-цистеїн є однією з трьох амінокислот, що утворюють антиоксидант глутатіон (GSH). Зважаючи на це, метою нашої роботи було дослідити вплив модуляції синтезу GSH та  $H_2S$  на окисно-нітрозативний метаболізм тканин серця в умовах ішемії-реперфузії. Пропаргілгліцин (PAG) та бутіонінсульфоксимін (BSO) (інгібітори синтезу  $H_2S$  та глутатіону відповідно), а також L-цистеїн вводили щуром внутрішньочеревинно. Використовуючи метод перфузії коронарних судин серця за Лангендорфом, моделювали ішемію-реперфузію. У тканинах серця до та після ішемії, визначали швидкість генерації АФК, вміст продуктів ПОЛ, активність NO-синтаз. Дослідження показали, що ефектом комбінації PAG+L-цистеїн є попередження утворення АФК, збільшення пулів низькомолекулярних нітрозотіолів, збереження активності конститутивної NO та пригнічення активності індукційної NO-синтази як у доішемійний період, так і в період реперфузії. Позитивний ефект на кардіодинаміку виражався в повному відновленні функції серця в реперфузійний період. Премедикація BSO у групі PAG+L-цистеїн значно знижувала ефективність комбінації та погіршувала відновлення функції серця під час реперфузії. Генерація  $O_2^-$  та OH збільшувалась, активність iNO-синтази зростала в 3.5 рази порівняно з групою з введенням комбінації PAG+L-цистеїн. Введення комбінації PAG+L-цистеїн в умовах моделювання ішемії-реперфузії пригнічує утворення АФК і зберігає активність sNOS, забезпечуючи таким чином стабільну продукцію NO. Попереднє введення інгібітора синтезу глутатіону BSO повністю відміняло антиоксидантний ефект введення PAG+L-цистеїну за рахунок зниження біодоступності глутатіону.

Ключові слова: серце, активні форми кисню, ішемія-реперфузія, глутатіон, сірководень.

**Вступ.** Серцево-судинні захворювання, що десятиліттями не поступаються чільними місцями у причинах смертності людей, часто мають у своїй основі пошкодження мембран клітин активними формами кисню (АФК). Особливо чітко ці процеси спостерігаються при ішемічно-реперфузійному порушенні функції серця. Припинення кровопостачання призводить до нестачі кисню у тканинах. Метаболізм клітин переходить з аеробного на анаеробний гліколіз, унаслідок чого накопичується лактат і знижується внутрішньоклітинний рН [7], викликаючи збільшення концентрації натрію [1]. У свою чергу, перевантаження натрієм запускає  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  обмінник у зворотний бік, що є причиною збільшення концентрації кальцію у клітині [13]. Відновлення кровотоку та надходження кисню в ішемізовану тканину призводить до вибухоподібного утворення АФК, зокрема супероксиданіон радикала та пероксиду водню [3], які вступають у взаємодію з молекулами сірководню ( $H_2S$ ) й оксиду азоту (NO), утворюючи їх високоактивні радикали, що є надпотужними пошкоджуючими агентами [9]. Усі ці процеси спричиняють пошкодження білків і ліпідів клітини,

відкриття мітохондріальних пор транзиторної провідності (MPTP), порушення функції мітохондрій, пошкодження ДНК, м'язової контрактури тощо [4, 7].

Відомо, що кардіопротекторний вплив проявляє сірководень, який є третьою сигнальною молекулою з родини газоподібних вторинних посередників [17]. Попередником його синтезу є амінокислота L-цистеїн, що також входить до складу вагомий для антиоксидантного захисту молекули – глутатіону, який важливий у антиоксидантному захисті за рахунок своєї дії як скавенджера вільних радикалів і кофактора ряду антиоксидантних ферментів [11]. Тому від внутрішньоклітинних рівнів глутатіону, виснаження або підвищення його пулів, значно залежить окисно-відновна регуляція клітин [6].

Раніше нами показано, що попереднє введення пропаргілгліцину (PAG), інгібітора цитоплазматичного ферменту синтезу сірководню цистатіон- $\gamma$ -ліази (CSE), та попередника синтезу сірководню та глутатіону – амінокислоти L-цистеїну мало виражений кардіопротекторний вплив в умовах ішемії-реперфузії ізольованого серця щура та діабету [5, 15]. Тому метою нашої роботи було

дослідити зміни оксидативно-нітрозативного метаболізму в умовах ішемії-реперфузії під час моделювання синтезу H<sub>2</sub>S та глутатіону в тканинах міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.

**Методи та матеріали.** Досліди проводились на ставозрілих щурах самців лінії Wistar, які утримувались на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології імені О. О. Богомольца відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей (22.09.2010) та Закону України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" (редакція від 13.02.20).

Тварин було розділено на групи, в яких моделювали ішемічно-реперфузійне пошкодження серця (I/R) та без моделювання ішемії-реперфузії. Препарати вводились внутрішньочеревинно в чотирьох комбінаціях: 1 – L-цистеїн (121 мг/кг, за 30 хв перед декапітацією), 2 – пропаргілгліцин (PAG, 11,3 мг/кг, 40 хв перед декапітацією), 3 – PAG (10 хв) + L-цистеїн (30 хв), 4 – бутіонін сульфоксимін (BSO, 22,2 мг/кг) +PAG (10 хв)+L-цистеїн (30 хв). За 100 % брали контрольну групу без введення препаратів і без моделювання ішемії-реперфузії. Зразки тканин серця збирались на 10-й хв реперфузії, коли показники роботи серця були максимальними та на 15-й хв перфузії у безішемічних груп. Кількість тварин у групах така: контроль n=8, I/R n=10, PAG+L-цистеїн n=5, PAG+L-цистеїн+I/R n=7, BSO+ PAG+L-цистеїн n=8, BSO+ PAG+L-цистеїн+I/R n=6.

У гомогенатах серцевої тканини щурів визначали біохімічні показники, що характеризують оксидативний і нітрозативний стреси, зміни синтезу оксиду азоту та сірководню. Показники окисного стресу визначали так: швидкість генерації супероксид-аніону (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) за окисненням цитохрому С; швидкість генерації ·ОН-радикала за методом окиснення дезоксирибози; вміст пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) спектрофотометрично при довжині хвилі 353 нм, з використанням розчину йодиду калію з надлишком лактопероксидази [10]. Маркери перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ): вміст дієнових кон'югатів (DK) визначали спектрофотометрично при 232 нм гептанових екстрактів

проб [8], вміст малонового діальдегіду (MDA) – по реакції з тіобарбітуровою кислотою [4]. Показники нітрозативного стресу: активність сумарної NOS (ендотеліальної (eNOS) і нейрональної (nNOS)) визначали за вмістом утвореного L-цитруліну, розраховуючи кальцій-залежну активність cNOS за різницею між активністю сумарної NOS та активністю кальцій-незалежної індукційної NOS (iNOS) [16]; нітратредуктазну активність (Red) – в умовах насичення субстрату NO<sub>3</sub> та надлишку NADH; аргіназну активність (Arg) визначали за вмістом продукту її реакції – сечовини [5]. Пули стабільних метаболітів оксиду азоту: вміст нітрит-аніону (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) в безбілкових пробах за методом Гріна, нітрат-аніону (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – у модифікації з бруцином [5]. Вміст низькомолекулярних (LMNT) S-нітрозотолів визначали за методом Saville, використовуючи реагент Гріса, що містить катіони Hg<sub>2</sub><sup>+</sup> [14]. Визначали ендогенні стаціонарні пули сірководню (H<sub>2</sub>S) [19] і зміни активності ферментів його синтезу. Кількість білка у пробах визначали за Лоурі.

Усі дані виражалися у вигляді середнього ± стандартна похибка. Для статистичної обробки результатів використовували критерій Манна – Уїтні. Достовірними вважали зміни при P<0,05.

**Результати та обговорення.** У нашому попередньому дослідженні ми показали, що вже з раннього періоду реперфузії була виражена кардіопротекторна дія спільного введення препаратів PAG та L-цистеїну [15]. Попереднє введення комбінації PAG та L-цистеїну сприяло відновленню функції серця на 95 % упродовж усього реперфузійного періоду. Це проявлялося у збереженні сили скорочення та розслаблення лівого шлуночка, а також в сталій кисневій вартості роботи міокарда. Ці ефекти відмінялись уведенням інгібітора синтезу глутатіону BSO разом із PAG та L-цистеїном. Тому виникає питання про можливі біохімічні механізми такого ефекту, а саме: залучення процесів окисного метаболізму, різних шляхів синтезу оксиду азоту, зміни синтезу сірководню та глутатіону за сумісної дії препаратів.

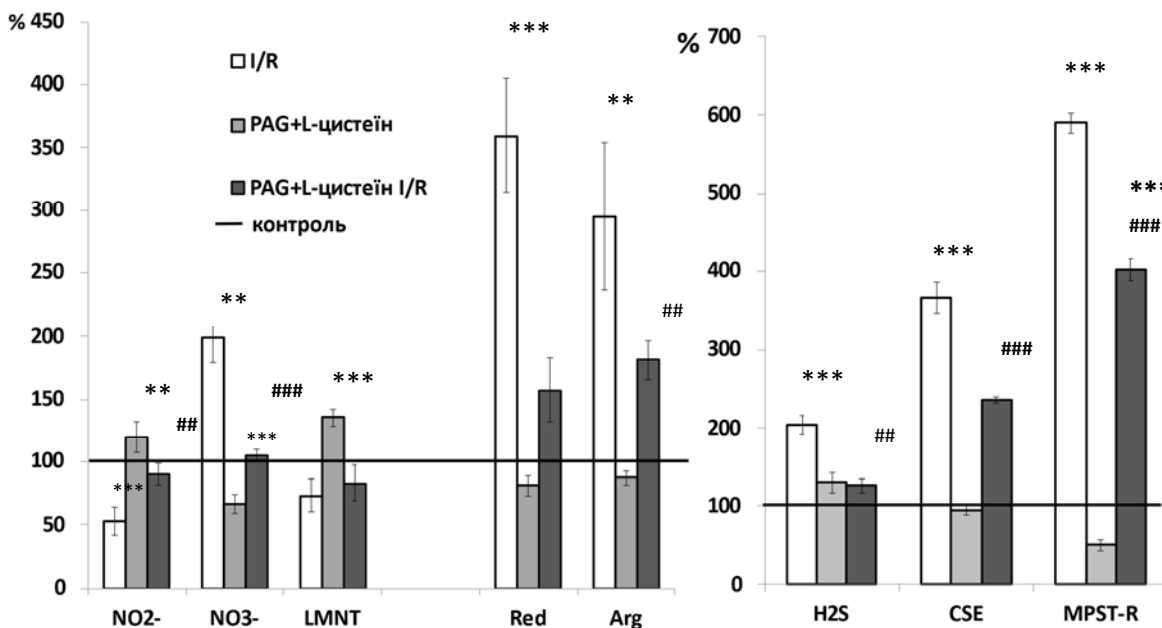
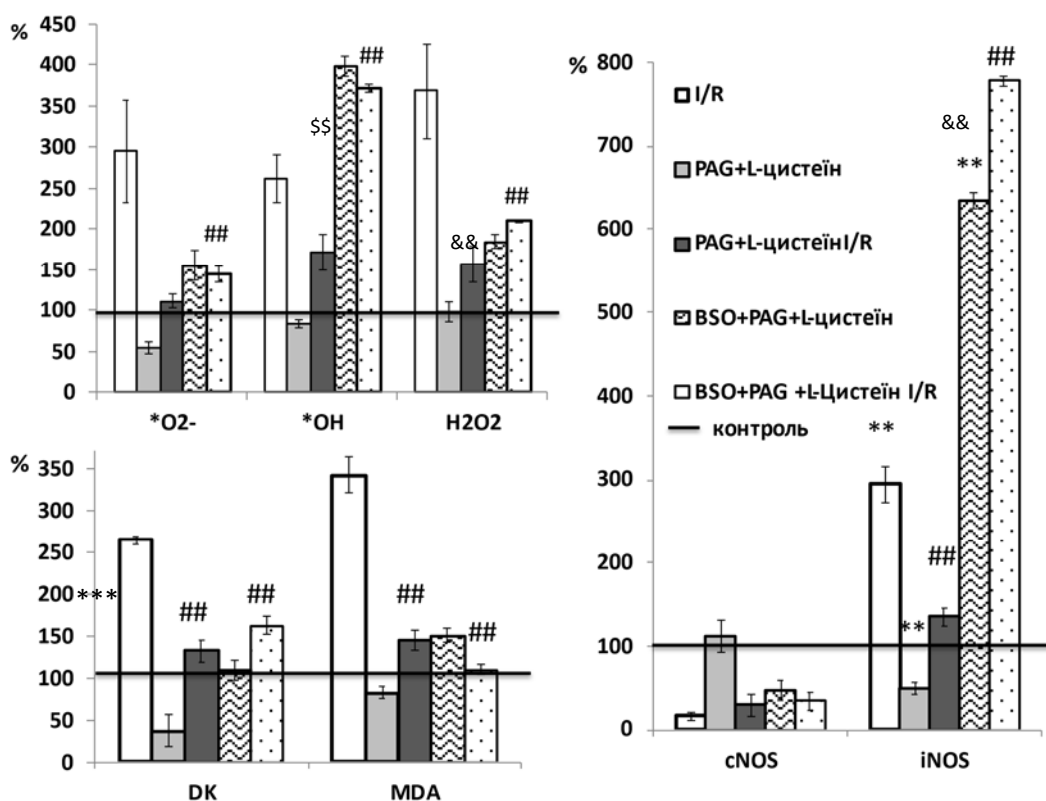


Рис. 1. Вплив інгібування синтезу H<sub>2</sub>S та GSH на показники нітрозативного метаболізму та рівень H<sub>2</sub>S у тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії (I/R). Дані переведено у відсотки відносно показників контрольної групи (\* – достовірність відносно значень у контрольній групі, # – достовірність відносно значень у групі з моделюванням ішемії-реперфузії)

Моделювання ішемії-реперфузії призводить до розвитку окисного стресу та порушення метаболізму оксиду азоту у тканинах серця дорослих щурів. Значно зростає активність нітратредуктази, а це означає інтенсифікацію нітратредуктазного шляху утворення NO (рис. 1). Про реутилізаційний шлях надмірного синтезу NO свідчить також достовірне підвищення концентрації його стабільного метаболіту – нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ), що говорить про утворення та розлад пероксинітриту з утворенням  $\cdot\text{OH}$ -радикала NO-залежним шляхом. Причому більш ніж удвічі, відносно контрольних дорослих тварин, зростає активність індукційної аргінази II, що є ключовим ферментом неокисного шляху деградації аргініну з утворенням продуктів реакції сечовини й орнітину, що призводить до зниження біодоступності L-аргініну для роботи cNOS. Про зниження синтезу NO de novo свідчить також зменшення стабільного метаболіту оксиду азоту  $\text{NO}_2^-$ . Як результат, зниження de novo синтезу NO конститутивними cNOS супроводжувалося порушенням релаксації міокарда й помітним підвищенням кінцево-діастолічного тиску під час ішемії. Вміст LMNT знижується за умов ішемії-реперфузії, але зростає при введенні PAG+L-цистеїну, як до ішемії так і в реперфузійний період. Це опосередковано вказує на збільшення рівнів глутатіону у тканинах, оскільки GSH також належить до LMNT [15]. Крім того, низькомолекулярні нітрозотіоли, до яких належить і нітрозоглутатіон, є донорами NO. Окремо зазначимо, що за ішемії-реперфузії ендogenous пули  $\text{H}_2\text{S}$  були значно

підвищені, імовірно, за рахунок активності ферментів його синтезу, а саме збільшення активності цитоплазматичної  $\text{H}_2\text{S}$ -синтази CSE більше ніж утричі. За умов введення PAG+L-цистеїну у групі з моделюванням ішемії-реперфузії знижується активність як CSE, так і мітохондріальної синтази  $\text{H}_2\text{S}$  (меркаптопіруватсульфуртрансферази, MPST), проте її активність усе одно лишалась на третину більшою ніж у CSE. Це свідчить про компенсаторний внесок MPST в забезпечення синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  в умовах ішемії-реперфузії та пригнічення активності CSE (рис. 1).

Порівняно з контрольною групою, показники якої на рис. 2 представлено як 100 %, після моделювання ішемії-реперфузії спостерігалось значне підвищення швидкості утворення гідроксильних ( $\cdot\text{OH}$ ) радикалів та супероксидних аніонів ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), підвищення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$ , який утворюється при ферментативній дисмутації  $\text{O}_2^{\cdot-}$  супероксиддисмутазою, та інтенсифікація процесу ПОЛ, на що вказувало зростання вмісту ДК в 2,4 рази та МДА більш ніж в 3 рази відповідно. Відбувається збільшення активності синтезу NO індукційною NO-синтазою, що на фоні підвищення вмісту нітрат-аніону говорить про розвиток нітрозативного стресу на фоні окисного. Також за дії ішемії-реперфузії значно (у 5,5 рази) відбувається зниження активності конститутивного синтезу NO, що свідчить про зменшення генерації NO шляхом de novo при окисній деградації L-аргініну.



**Рис. 2.** Вплив інгібування синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  та GSH на показники окисного стресу та рівень  $\text{H}_2\text{S}$  у тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії. Дані переведено у відсотки відносно показників контрольної групи (\* – достовірність щодо значень у контрольній групі, # – достовірність відносно значень у групі з моделюванням ішемії-реперфузії (I/R), \$ – достовірність відносно значень у групі PAG+L-цистеїну I/R)

Наші результати свідчать про розвиток індукованого ішемією-реперфузією окисного та нітрозативного стресу внаслідок підвищення генерації утворення  $\cdot\text{OH}$ - і  $\cdot\text{O}_2^-$  радикалів, підвищення індукційного і реутилізаційного синтезу NO та синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  на тлі значного зменшення конститутивного синтезу NO.

В умовах інгібування синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  екзогенний та/або ендogenous L-цистеїн може стати доступнішим для синтезу глутатіону. Завдяки цьому процесу співвідношення між окисненою та відновленою формами глутатіону повинно змінюватися, збільшуючи рівні відновленого глутатіону. Це може активувати антиоксидантний захист і

сприяти відновленню конститутивного синтезу NO та спряженню cNOS [2]. Активність cNOS була підвищена у групі з попереднім введенням PAG+L-цистеїну, що, імовірно, сприяло підтримці рівня NO навіть у реперфузійний період (рис. 2). У ході цього процесу не відбувається збільшення активності iNOS, значно знижується активність нітратредуктази й аргінази II, а також спостерігається нормалізація рівнів метаболітів оксиду азоту – підвищення NO<sub>2</sub>- та зниження пулів NO<sub>3</sub>-. Важливо зазначити, що NO, який виробляється cNOS, інгібує відкриття МРТР [18], що надзвичайно важливо в умовах ішемії-реперфузії. Таким чином, механізми кардіопротекції, опосередкованої PAG+L-цистеїном полягали в ефективному зниженні генерації АФК і збереженні синтезу NO шляхом пригнічення нітрозативного стресу й інгібування роз'єднання cNOS, індукованого ішемією-реперфузією. Водночас, попереднє введення інгібітора синтезу глутатіону BSO повністю відміняло антиоксидантний ефект комбінації PAG+L-цистеїн (рис. 2).

Ішемія-реперфузійний слід час введення L-цистеїну на фоні інгібування обох шляхів його метаболізму супроводжувалася розвитком окисного стресу на рівні з показниками контрольної ішемії-реперфузії міокарда. Дещо меншою була лише кількість пероксиду водню, на рівні із групою з уведенням лише PAG+L-цистеїну (рис. 2). Вміст пероксиду водню й активність супероксид-аніон радикала, на фоні введення BSO+PAG+L-цистеїн, досягли значень реперфузійного періоду групи без застосування хімічних речовин. При цьому значно зростає активність гідроксильного \*ОН-радикала, який значною мірою утворюється NO-залежним (через утворення і розпад пероксинітритної кислоти) шляхом. У цьому процесі активність cNOS стала близькою до значень, зареєстрованих під час реперфузії сердець тварин, яким не робили жодних уведень, а рівень активності iNOS зріс у 2,5 і 3 рази до і після ішемії відповідно. Це свідчить про порушення de novo синтезу NO конститутивними NOS і може бути причиною розвитку реперфузійної контрактури міокарда. Цікаво, що достовірно зросли рівні H<sub>2</sub>S у тканинах серця і до, і після ішемії. Вірогідно, це пов'язано з тим, що присутність доданого екзогенного L-цистеїну стимулювала синтез H<sub>2</sub>S мітохондріальними ферментами, але ця кількість була недостатньою для забезпечення кардіопротекторного ефекту.

#### Висновки.

1) Кардіопротекторний ефект введення L-цистеїну на тлі блокади синтезу H<sub>2</sub>S характеризувався активним попередженням розвитку окисного стресу і ПОЛ, стимуляцією активності cNOS та інгібуванням надлишкового індукційного і реутилізаційного синтезу NO в реперфузійний період.

2) Зростає присутність LMNT, що опосередковано свідчить про зростання кількості глутатіону та біодоступності NO. Отже, L-цистеїн, що не метаболізується в H<sub>2</sub>S, перетворюється на глутатіон.

3) Попереднє введення BSO відміняє антиоксидантний ефект введення PAG+L-цистеїну, нівелює ефект останнього як скавенджера АФК, регулятора МРТР і стимулятора активності синтезу NO конститутивними NOS.

#### Список використаної літератури

1. Avkiran M. Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects / M. Avkiran, M. S. Marber // *J Am Coll Cardiol.* – 2002. – Vol. 39. – № 5. – P. 747–53.
2. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function / C.-A. Chen, T.-Y. Wang, S. Varadharaj et al. // *Nature.* – 2010. – Vol. 468. – № 7327. – P. 1115–8.

3. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress / H. Y. Chung, B. S. Baek, S. H. Song et al. // *Age (Omaha).* – 1997. – Vol. 20. – № 3. – P. 127–40.

4. Conte D. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage / D. Conte, S. Narindrasorasak, B. Sarkar // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271. – № 9. – P. 5125–30.

5. Modulation of hydrogen sulfide synthesis improve heart function and endothelium-dependent vasorelaxation in diabetes / N. Dorofeyeva, Iu. Korkach, O. Kutsyk, V. Sagach // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2020? doi: 10.1139/cjpp-2020-0302. Online ahead of print.

6. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / W. Dröge // *Physiological Reviews.* – 2002. – Vol. 82. – № 1. – P. 47–95.

7. Myocardial ischemia reperfusion injury – from basic science to clinical bedside / A. Frank, M. Bonney, S. Bonney et al. // *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* – 2012. – Vol. 16. – № 3. – P. 123–32.

8. Gavrilo V. B. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts / V. B. Gavrilo, A. R. Gavrilo, N. F. Khmara // *Lab Delo.* – 1988. – 1. 2. – P. 60–4.

9. Granger D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury / D. N. Granger // *Am J Physiol.* – 1988. – Vol. 255. – № 6. – P. 1269–1275.

10. Huwiler M. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system / M. Huwiler, H. Kohler // *Eur J Biochem.* – 1984. – Vol. 141. – № 1. – P. 69–74.

11. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies / L. Kennedy, J. K. Sandhu, M. E. Harper, M. Cuperlovic-Culic // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 1429.

12. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension / U. Landmesser, S. Dikalov, S. R. Price et al. // *J Clin Invest.* – 2003. – Vol. 111. – № 8. – P. 1201–9.

13. The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability / N. S. Luongo, J. P. Lambert, P. Gross et al. // *NATURE.* – 2017. – Vol. 545. – № 7652. – P. 93–7.

14. Padgett C. M. Cellular responses to nitric oxide. Role of protein S-thiolation/de thiolation / C. M. Padgett, A. R. Whorton // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 358. – № 2. – P. 232–242.

15. Effects of Stimulation and Blockade of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis in Myocardial Ischemia-Reperfusion / V. F. Sagach, T. V. Shimanskaya, Y. V. Goshovska, R. A. Dobrovol'ska // *IJPP.* <http://www.dl.begellhouse.com/journals/6ec4ba27650016b1,7628674d286b73a0,18d18afe1258f5d1.html>

16. Salter M. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases / M. Salter, R. G. Knowles, S. Moncada // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 291. – № 1. – P. 145–9.

17. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential / Y. Shen, Z. Shen, Z. S. Luo et al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2015. – Article ID: 925167.

18. No-dependent modulation of the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening under ischemia-reperfusion of the isolated heart / T. V. Shimanskaia, F. V. Dobrovol'skii, G. L. Vavilova et al. // *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.* – 2009. – Vol. 95. – № 1. – P. 28–37.

19. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide / A. Svenson // *Analytical Biochemistry.* – 1980. – Vol. 107. – № 1. – P. 51–5.

#### References (Scopus)

1. Avkiran M, Marber MS. Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(5):747–53. PMID: 11869836.

2. Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, Reyes LA, Hermann C, Hassan Talukder MA, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* 2010;468(7327):1115–8. doi: 10.1038/nature09599

3. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, et al. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age.* 1997;20(3):127–40.

4. Conte D, Narindrasorasak S, Sarkar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. *J Biol Chem.* 1996;271(9):5125–30. PMID: 8617792

5. Dorofeyeva N. Modulation of hydrogen sulfide synthesis improve heart function and endothelium-dependent vasorelaxation in diabetes / Dorofeyeva N, Korkach Iu, Kutsyk O, Sagach V. // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2020. doi: 10.1139/cjpp-2020-0302. Online ahead of print.

6. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews.* 2002;82(1):47–95. PMID: 11773609.

7. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury – from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;16(3):123–32. PMID: 22368166

8. Gavrilo V B, Gavrilo A R, Khmara N F. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo.* 1988;(2):60–4.

9. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):H1269-1275.

10. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system. *Eur J Biochem.* 1984;141(1):69–74.

11. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules.* 2020;10(10):1429. PMID: PMC7600400.

12. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 15, Квітень 2003;111(8):1201–9. PMID: 12697739

13. Luongo TS, Lambert JP, Gross P, Nwokedi M, Lombardi AA, Shanmughapriya S, et al. The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability. *NATURE.* 2017;545(7652):93–7.

14. Padgett C. M. Cellular responses to nitric oxide. Role of protein S-thiolation/de thiolation / C. M. Padgett, A. R. Whorton // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;358(2):232–242.

15. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV, Dobrovol'ska RA. Effects of Stimulation and Blockade of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis in Myocardial Ischemia-Reperfusion. *IJPP.* 2014;5(3). PMID: 24175471

16. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1991;291(1):145–9.

17. 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;2015:925167. PMID: 26078822

18. Shimanskaia TV, Dobrovol'skiĭ FV, vavilova GL, Strutinskaiia NA, Rudyk EV, Sagach VF. [No-dependent modulation of the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening under ischemia-reperfusion of the isolated heart]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2009;95(1):28–37.

19. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Analytical Biochemistry.* 1980;107(1):51–5.

Надійшла до редколегії 06.01.2021  
Отримано виправлений варіант 03.01.2021  
Підписано до друку 03.01.2021

Received in the editorial 06.01.2021  
Received a revised version on 03.01.2021  
Signed in the press on 03.01.2021

R. Федичкина, асп., Ю. Коркач, канд. биол. наук, И. Охай, асп.,  
Ю. Гошовская, канд. биол. наук., В. Сагач, д-р мед. наук  
Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

### ВПЛИВНИЙ МОДЕЛЮВАННЯ СИНТЕЗА СЕРОВОДОРОДА І ГЛУТАТІОНА НА ОКСИДАТИВНО-НІТРОЗАТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МІОКАРДА В УМОВАХ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUZІЇ

Підтримання окислювально-відновительного балансу є необхідним умовою для забезпечення нормального метаболізму кліток серця. Реперфузійні порушення функції серця супроводжуються вибухоподібним утворенням АФК, пошкодженням структури ДНК і клітинних мембран, порушенням функцій білків, розвитком м'язової контрактури і т. д. Показано кардіопротекторне вплив сервоводорода (H<sub>2</sub>S), предшественником синтезу якого є амінокислота L-цистеїн. Крім того, L-цистеїн – одна з трьох амінокислот, що утворюють антиоксидант глутатіон (GSH). Цілью нашої роботи було дослідити вплив моделювання синтезу GSH і H<sub>2</sub>S на окислювально-нітрозативний метаболізм тканин серця в умовах ішемії-реперфузії (I/R). Інгибітор синтезу H<sub>2</sub>S пропаргілгліцин (PAG), інгибітор синтезу GSH бутіонінсульфоксимін (BSO) і L-цистеїн вводили кривим внутрішньошлунково. Використовували метод ретроградної перфузії коронарних судів ізольованого серця, моделювали I/R. В тканинах серця крив до і після ішемії визначали швидкість генерації АФК, вміст продуктів перекисного окислення ліпідів, активність NO синтезуючих ферментів. Результати показали, що ефектом комбінації PAG+L-цистеїн було збереження функції серця в реперфузійний період без погіршення скоротальної активності, попередження утворення АФК як перед ішемією, так і в період реперфузії, збереження sNOS і придушення iNOS активності. Додавання BSO к PAG + L-цистеїну значно знижало ефективність комбінації і відміняло кардіопротекторний ефект. Генерація O<sub>2</sub> і OH збільшувалась, активність індукційної NO-синтази зростала в 3,5 рази порівняно з групою з введенням комбінації PAG + L-цистеїн. Введення комбінації PAG + L-цистеїн в умовах моделювання ішемії-реперфузії придушало утворення АФК і зберігало активність конститутивної NOS, забезпечуючи стабільну продукцію оксиду азоту. Передварильне введення BSO повністю відміняло антиоксидантний ефект введення PAG + L-цистеїну за рахунок зниження біодоступності глутатіону.

Ключові слова: серце, активні форми кисню, ішемія-реперфузія, глутатіон, сервоводород.

R. Fedichkina, PhD Student, Yu. Korkach, PhD, I. Okhai, PhD Student,  
Yu. Goshovska, PhD, V. Sagach, Dr Hab.  
Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, Ukraine

### EFFECT OF MODULATION OF HYDROGEN SULFUR AND GLUTATHIONE SYNTHESIS ON OXIDATIVE AND NITROSATIVE METABOLISM UNDER MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION

Redox balance maintaining is a prerequisite for normal cardiomyocytes metabolism. Reperfusion injury of the heart is characterized by an explosive increase in ROS generation, cell membranes damage, dysfunction of proteins, the development of muscle contracture etc. It was shown that the hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and the precursor of its synthesis the amino acid L-cysteine provided cardioprotective effect against ischemia-reperfusion. In addition, L-cysteine is one of amino acids that form an antioxidant glutathione (GSH). The aim of our work was to investigate the effect of GSH and H<sub>2</sub>S synthesis modulation on the oxidative and nitrosative stress in cardiac tissues under conditions of ischemia-reperfusion. The H<sub>2</sub>S synthesis inhibitor propargylglycine (PAG), the GSH synthesis inhibitor butionine sulfoxime (BSO) and L-cysteine were administered intraperitoneally. Next, ischemia-reperfusion of the Langendorff isolated rat heart was performed. In the tissues of rat's hearts, before and after ischemia, we determined the rate of ROS generation, content of POL products, the activity of NO synthesizing enzymes. Results of our study showed that pretreatment with PAG + L-cysteine combination prevented heart function disturbances, ROS formation, increased low molecular weight nitrosothiols content, preserved the activity of constitutive NOS and inhibited the activity of inducible NOS in the pre-ischemic period as well as in the period of reperfusion. Pretreatment with BSO in PAG + L-cysteine group significantly reduced the effectiveness of the combination and abolished cardioprotective effect. Generation of superoxide and hydroxyl anions was increased, activity of inducible NO-synthase was 3.5-fold increased comparing with PAG + L-cysteine pretreated group. Pretreatment with PAG + L-cysteine combination inhibited the formation of ROS and preserved the activity of constitutive NOS, thus providing stable production of NO. Pretreatment with BSO completely abolished an antioxidant effect of PAG + L-cysteine decreasing bioavailability of glutathione.

Keywords: heart, reactive oxygen species, ischemia-reperfusion, glutathione, H<sub>2</sub>S.