

Keywords: psoriasis, comorbidity, anxiety, alexithymia, depression, pathogenesis proinflammatory cytokines, melatonin.

РЕЗЮМЕ

ПСИХОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА КАК КОМОРБИДНОСТЬ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ (ОБЗОР)

Болотная Л.А., Сариян Е.И.

Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина

Псориаз является системным иммуноопосредованным заболеванием, связанным с повышенным риском возникновения коморбидных заболеваний. Психопатологические расстройства у пациентов с псориазом по сей день недостаточно изучены, несмотря на большое количество публикаций. Целью исследования является анализ психологических и психических расстройств у пациентов с псориазом и выявление возможных общих механизмов патогенеза на основании изучения научной ретроспективной и текущей литературы.

У большинства больных развитие псориаза связано с выраженными негативными эмоциями. Больные псориазом часто указывают на негативное влияние заболевания на качество жизни. К основным коморбидностям псориаза психологического и психиатрического профиля принадлежат алекситимия, тревога и депрессия, сексуальные расстройства и нарушения сна. Психические и психологические расстройства у больных могут быть первичными, но чаще они являются вторичными по отношению к псориазу.

Исследования демонстрируют участие медиаторов воспаления (провоспалительные цитокины) и мелатонина в патогенезе как псориаза, так и психопатологических расстройств, при этом ключевым звеном является иммунное воспаление. Оценка психологического и психиатрического статуса больного псориазом обеспечит своевременное выявление коморбидной патологии, что позволит оптимизировать лечебную тактику.

რეზიუმე

ფსიქოპათოლოგიური დარღვევები როგორც კომორბიდული დაავადება პაციენტებში ფსორიაზით (მიმოხილვა)

ლ.ბოლოტნაია, ე. სარიანი

ხარკოვის დიპლომის შემდგომი განათლების სამედიცინო აკადემია, უკრაინა

ფსორიაზი წარმოადგენს იმუნური პასუხით განპირობებულ სისტემურ დაავადებას, რომელსაც თანახლავს კომორბიდული პათოლოგიის განვითარების დიდი რისკი. მიუხედავად ჩატარებული კვლევების და პუბლიკაციების დიდი რაოდენობისა, ფსორიაზით პაციენტებში დღემდე არ არის შესწავლილი ფსიქოლოგიური დარღვევები.

კვლევის მიზანს წარმოადგენს ფსორიაზით დაავადებულ პაციენტებში ფსიქოლოგიური და ფსიქიკური დარღვევების განხილვა და სამეცნიერო ლიტერატურის ანალიზის საფუძველზე პათოგენეზის შესაძლო საერთო მექანიზმების იდენტიფიცირება.

ფსორიაზის განვითარება ასოცირდება გამოსატყუან ნეგატიურ ემოციებთან. ფსორიაზის დაავადების ძირითად თანმხლებ კომორბიდულ პათოლოგიას წარმოადგენს ფსიქოლოგიური და ფსიქიკური პროფილის ალექსიტიმია, შფოთვა და დეპრესია, ასევე სექსუალური დარღვევები, ინსომნია. ფსიქიკური და ფსიქოლოგიური დარღვევები პაციენტებში შეიძლება იყოს პირველადი, მაგრამ უფრო ხშირად მეორეხარისხოვანი ფსორიაზის მიმართ.

კვლევებმა აჩვენა, რომ ფსორიაზისა და ფსიქოპათოლოგიური დარღვევების პათოგენეზში აღინიშნება ანთებითი შუამავლების (ანთების ციტოკინები) და მელატონინის მონაწილეობა, რომელთა საკვანძო როლს წარმოადგენს იმუნური ანთება. ფსორიაზით დაავადებული პაციენტის ფსიქოლოგიური და ფსიქიკური სტატუსის შეფასება ხელს შეუწყობს კომორბიდული პათოლოგიის დროულ გამოვლენას და მეურნეობის ტაქტიკის ოპტიმიზაციას.

CARDIOMYOCYTE DNA CONTENT AND ITS LINK TO CSE/H₂S SYSTEM IN THE HEART OF EXPERIMENTAL DIABETIC RATS

Palamarchuk I., Zaichko N., Melnyk A., Nechiporuk V., Yurchenko P.

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

Diabetes mellitus (DM) is an important health problem because of high prevalence, rapid complications and high mortality [27]. One of the serious complications of diabetes is diabetic cardiomyopathy (DCM). Diabetic heart injury is characterized by several main mechanisms such as impaired insulin signaling, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction, sympathetic nervous system activation, oxidative stress, inflammation, impaired coronary microcirculation which lead to myocardial fibrosis, hypertrophy and heart failure [1,8,19,22].

One of the crucial factors in pathogenesis of DCM is disintegration of cell cycle and activation of pro-apoptotic pathways [3,13], but the molecular mechanisms behind these changes are still unknown. It has been shown recently that hydrogen sulfide (H₂S) is an important modulator of cardiomyocyte proliferation and apoptosis, and is involved in the regulation of cardiovascular functions and insulin secretion [2,7,15]. However, the role of the CSE/H₂S system and disruption in proliferation and apoptosis in diabetic heart remains unclear.

The aim of this work was to evaluate the effect of modulators of H_2S system on the level of DNA fragmentation and H_2S concentration in myocardiocytes of rats with experimental diabetes mellitus.

Material and methods. The studies were performed on 40 white non-linear male rats (180-250 g), which were obtained from the Scientific-Experimental Clinic of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya. Animals were housed in a standard facility at 22°C room temperature and a twelve-hour alternate between light and dark; water and feed were given ad libitum. The studies were conducted according to the general ethical principles of animal experimentation, approved by the First National Congress of Ukraine on Bioethics (Kyiv, 2001) and the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Experimental diabetes in rats was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, Sigma, USA) in 0.1 mol/L citrate buffer, pH 4.5 at dose of 40 mg/kg. Diabetic and age-matched non-diabetic rats were randomly assigned to three groups: controls, untreated diabetic controls (STZ-DM) and treated diabetic administrations: STZ + propargylglycine (STZ+PPG) and STZ + H_2S donor (STZ+NaHS). Rats of the control group were given equivalent volumes of 0.1 M citrate buffer (0.1 ml /100 g). Substances were administered after a previous 24-hour food deprivation. The development of STZ diabetes was confirmed on day 3 by determining glucose in peripheral blood using an Accu-Chek Active electronic glucometer (Rouche Group, Germany). Animals that had blood glucose greater than 13 mmol/l (234.0 mg/dl) as of day 3 were selected for further experiment.

Propargylglycine (an irreversible inhibitor of cystathionin- γ -lyase (CSE) - a key H_2S - synthesizing enzyme in the heart and vessels and NaHS (inorganic H_2S donor) performed the modulation of H_2S system. Modulators of H_2S system were administered i/p once a day (0.1 ml/100 g) from the 14th to the 28th day after the injection of streptozotocin. D, L-propargylglycine (Sigma, USA) was administered at a dose of 50 mg/kg, and NaHS $\cdot H_2O$ (Sigma, USA) at a dose of 3 mg/kg. Doses, routes and duration of administration of H_2S modulators were borrowed from the literature and did not cause animal death [11,12,28]. Rats of the control and STZ group received 0.15 M NaCl solution (0.1 ml/100g i/p once per day) after the induction of diabetes.

Determination of myocardial H_2S content was performed by the method of Wiliński, B., 2011. The myocardium was washed with cold 1.15% KCl solution, crushed with scissors, homogenized in 0.01M NaOH at a ratio of 1:5 (mass/volume) at 3000 rpm (Teflon glass). TCA (250 μ l of 50%) was added to 1 ml of homogenate and centrifuged at 1200 g for 15 min, the content of H_2S was determined in supernatant by spectrophotometric method by reaction with N, N-dimethyl-para-phenylenediamine in the presence of $FeCl_3$. All manipulations were performed in sterile sealed plastic tubes of the Eppendorf type (to prevent H_2S loss). The content of sulfide anion in the sample was calculated according to the calibration schedule. Aqueous $Na_2S \cdot 9H_2O$ (31.2–3120 μ M, Sigma, USA) was taken as the standard.

To determine the DNA content, we made a cut of 10-15 mm in the apex of the heart, placed it in Eppendorf microtubes with a cold 1.15% KCl solution and stored at -20°C for further analysis. DNA content was determined by flow cytometry. Nuclei suspensions of myocardiocytes were obtained using a solution for nuclear DNA research (CyStain DNA Step 1 by Partec, Germany) according to the manufacturer's protocol-instructions. This solution enables the extraction of the nuclei and labeling of nuclear DNA with diamidinophenylindole (DAPI). CellTrics 50

μ m disposable filters (Partec, FRG) were used in the manufacture of nuclear suspensions.

The flow analysis was performed using Partec PAS multifunctional flow cytometer from Partec (Germany). UV radiation was used to excite DAPI fluorescence. 10,000 events from G_0G_1 of each sample of nuclear suspension were subjected to analysis. Cell cycle analysis was performed using the software FloMax (Partec, Germany) in full digital accordance with the mathematical model to determine: G_0G_1 ($G_1\%$) - the percentage of cells of G_0G_1 phase to all cells of the cell cycle (DNA content = 2c); S ($S\%$) is the percentage of cells in the DNA synthesis phase to all cells in the cell cycle (DNA content > 2c and < 4c); G_2+M ($G_2M\%$) is the percentage of cells in the G_2+M phase to all cells in the cell cycle or cells with DNA content = 4c (polyploidy). Determination of DNA fragmentation (apoptosis) was performed by isolating the SUB- G_0G_1 region on DNA histograms – RN₂ before the G_0G_1 peak, indicating nuclei of cells with a DNA content < 2c.

The results were statistically processed using standard methods MS Excel and Statistica SPSS 10.0 application packages for Windows. The results are presented as arithmetic mean and mean error ($M \pm m$). The likelihood of difference between the indicators was evaluated by the parametric Student's t-test (with normal distribution) and non-parametric Mann-Whitney U-test (with non-normal distribution). Pearson correlation analysis was performed to evaluate the relationship between the indicators. The data at $p < 0.05$ were considered as plausible.

Results and discussion. Firstly, we analyzed the content of H_2S in myocardium after induction of streptozotocin-induced diabetes. The development of DM was associated with a decrease in the level of H_2S in myocardium 4 weeks after the administration of streptozotocin (2.21 ± 0.17 nmol/mg protein) and was significantly lower by 36.6% compared to the control (Fig. 1).

The study indicated that administration of propargylglycine and NaHS influenced oppositely on H_2S content in myocardium of STZ-DM rats (Fig. 1). After 2 weeks of propargylglycine administration, the level of H_2S was 1.56 ± 0.13 nmol/mg protein that was lower than that of STZ-DM and control by 29.4%, and 55.3% relatively. On the other hand, the level of H_2S showed a significant increase in myocardium of rats treated with NaHS (2.73 ± 0.16 nmol/mg protein) compared to STZ-DM by 23.5% and significant decrease compared to control by 21.8%.

Thus, the development of DM was accompanied by the deficiency of H_2S in myocardium that was severe in the group administered with propargylglycine. Whereas, treatment with NaHS corrected changes of H_2S level induced by the diabetes development.

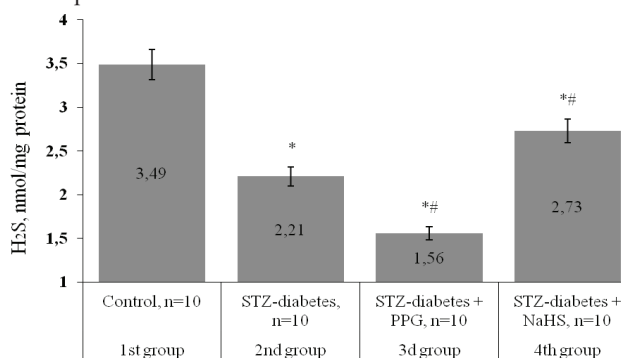
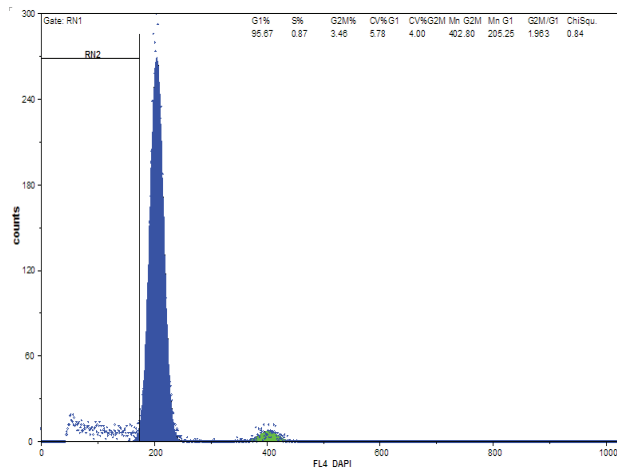
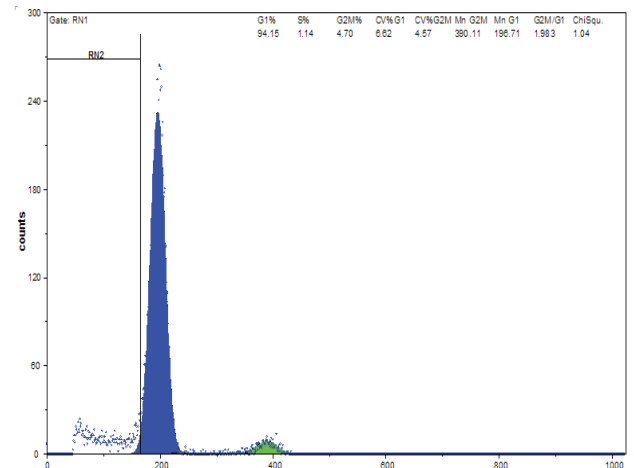


Fig. 1. Effect of PPG and NaHS on level of H_2S in myocardium of STZ-induced diabetic rats ($M \pm m$; Notes: * – significantly different: $p < 0.05$ vs. control; # – significantly different: $p < 0.05$ vs. STZ-DM)



Pic. 1. DNA flow cytometry of myocardial cell nuclei. Non-diabetic control



Pic. 2. DNA flow cytometry of myocardial cell nuclei. STZ-induced diabetes group

Table. Effects of modulators of H_2S system on cell cycle parameters in myocardium of rats with STZ-DM ($M \pm m$, $n=10$)

Animal group	Cell cycle parameters, %			
	G_0G_1	S	G_2/M	SUB- G_0G_1
Control	95,6 \pm 0,19	0,97 \pm 0,04	3,43 \pm 0,16	13,1 \pm 0,34
DM	94,2 \pm 0,11*	1,26 \pm 0,07*	4,53 \pm 0,09*	14,6 \pm 0,46*
DM + PPG	93,8 \pm 0,40*	1,83 \pm 0,31*	4,38 \pm 0,21*	16,7 \pm 0,51*
DM + NaHS	95,3 \pm 0,25#	0,93 \pm 0,08#	3,74 \pm 0,26#	12,8 \pm 0,53*

notes: * – significantly different: $P < 0.05$ vs. Non-diabetic control; # – significantly different: $P < 0.05$ vs. DM

According to cell cycle analyzes by flow cytometry, the number of cells in DNA synthesis (S phase) and in polyploidization phase (G_2+M , DNA=4c) was increased by 29.9 and 32% ($p < 0.05$) in hearts of diabetic rats, compared to control. Moreover, the number of cells with fragmented DNA (SUB- G_0G_1) was increased by 11.4% ($p < 0.05$).

Thus, the development of DM was associated with increased activity of apoptosis (increased number of cells in SUB- G_0G_1), polyploidization (increased number of cells in G_2+M phase) and proliferation (increased number of cells in S phase) in comparison to non-diabetic control (Pic. 1 and 2).

The introduction of modulators of H_2S /CSE system had oppositely directed effects on cell cycle parameters. Thus, the usage of propargylglycine caused an increase cardiac cell apoptosis, which indicates a 14.4% decrease in the relative number of cells in the SUB- G_0G_1 phase relative to the control group. At the same time, NaHS administration decreased the activity of apoptosis: the number of cells in the SUB- G_0G_1 interval decreased by 12.3% ($p < 0.05$) relative to the STZ-DM.

The introduction of NaHS also reduced the number of cells in S, G_2+M phases by 26.2 and 14.4% ($p < 0.05$) relative to the STZ-DM, indicating a decrease in proliferation and polyploidization activity in myocardium.

According to correlation analysis, modulation of H_2S level in the myocardium can be one of the factors in the regulation of myocardial cell cycle in diabetic rats. A reliable negative relationship ($r = -0.69 - 0.83$, $p < 0.01$) was found between H_2S levels and markers of apoptosis, proliferation and polyploidization.

Thus, rats with experimental DM had a higher activity of apoptosis, because of decrease in functionally active myocardiocytes, polyploidization, and an increase in the number of cells in

the synthetic phase, which is the basis for the development of hypertrophy and myocardial fibrosis.

The question arises as to the cause and effect relationship between changes in the cell cycle parameters and H_2S system in the myocardium of diabetic animals. Among the main mechanisms of DCM pathogenesis are oxidative stress, insulin resistance, myocardial inflammation, and ER stress [6, 25]. Our findings regarding the effect of H_2S on cell cycle parameters are in accordance with those of other studies. In a case of decreased H_2S concentration in myocardium, oxidative stress can be activated, which results in increased oxidative modification of numerous proteins (enzymes, components of cytoskeleton, receptors, transcription factors, etc.), mitochondrial pore dysfunction with subsequent activation of receptor-independent apoptosis [17]. It is known that H_2S can stabilize mitochondria in a case of ischemic-reperfusion disorders [4]; decreases the number of apoptotic myocardiocytes; increases the mRNA transcription of the anti-apoptotic factor Bcl-2. H_2S inhibits transcription of mRNA of pro-apoptotic Bax, caspase 3, and cytochrome C release from mitochondria through sulfhydration of NF- κ B [17,21]. H_2S participates in the stabilization of Nrf2 via the CSE/Akt pathway, thus suppressing myocardiocyte apoptosis [25], and can also remove Bach1 from the nucleus via the ERK1/2-dependent pathway leading to the restoration of Nrf2 signaling [16]. It was also shown, that H_2S decreases apoptotic activity via the IGF1R/pAkt signaling pathway, the AMPK/mTOR signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, and NADPH/JNK/NF- κ B signaling pathway [20]. The ability of H_2S to decrease the activity of myocardiocyte polyploidization may be related to its anti-fibrotic activity, since the introduction of exogenous H_2S donors to diabetic rats is accompanied by a decrease in the activity of NF-

κ B, TGF- β 1, MMP-2, procollagen-1 [5]. In addition, the anti-fibrotic action of H₂S can be realized by inactivating collagen synthesis via the TGF- β 1/Smad signaling pathway [18].

Thus, the regulation of H₂S system can be a promising strategy in prevention and correction of pathogenic changes in myocardium associated with chronic hyperglycemia and DM. Stimulation the activity of CSE/ H₂S pathway, as well as by exogenous donors such as NaHS, can reduce the severity of pro-apoptotic and pro-fibrotic changes in heart associated with DM.

Conclusions. The development of STZ-DM is associated with the decrease in H₂S concentration and changes in cell cycle parameters (increase the number of myocardiocytes in SUB-G₀G₁, G₂M, S phases) in rat's heart.

The decreased activity of CSE/H₂S pathway induced by propargylglycine results in stimulation of apoptotic activity, while H₂S donor reversed the changes in cell cycle parameters caused by the development of STZ-induced DM in rats' myocardium.

REFERENCES

1. Bugger H. and Abel E.D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014; 57: P.660–671.
2. Chai, Q., Lu, T., Wang, X.L., Lee, H.C. Hydrogen sulfide impairs shear stress-induced vasodilation in mouse coronary arteries. *Pflugers. Arch.*, 2015; 467(2): P.329–340.
3. Ding B., Abe J.I., Wei H., Huang Q.H., Walsh R.A., Molina C.A. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis – implication in heart failure, *Circulation* 2005; 111: P.2469–2476.
4. Elrod J.W., Calvert J.W., Morrison J., Doeller J.E., Kraus D.W., Tao L., Jiao X., Scalia R., Kiss L., Szabo C. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: P.15560–15565.
5. El-Sewedy M.M., Sadik N.A., Shaker O.G. Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011; 506(1): P.48–57.
6. Jia G., DeMarco V.G. and Sowers J.R.: Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol.* 2016; 12: P.144–153.
7. Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20: P.783–793.
8. Kumar S, Prasad S and Sitasawad SL: Multiple antioxidants improve cardiac complications and inhibit cardiac cell death in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One.* 8:e67009 2013.
9. Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts, *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: P.1015–1024.
10. Lavu M., Bhushan S. and Lefer D.J.: Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* 2011; 120: P.219–229.
11. Lee A.T., Shah J.J., Li L., Cheng Y., Moore P.K., Khanna S. A nociceptive-intensity-dependent role for hydrogen sulphide in the formalin model of persistent inflammatory pain // *Neuroscience*. 2008; 152(1): P. 89–96.
12. Liu H., Bai X.B., Shi S., Cao Y.X. Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats // *J. Pharm. Pharmacol.* 2009; 61(2): P. 207–212.
13. M.L. Circu, T.Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 48: P.749–762.
14. Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F. D., Dec, G. W. et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96: P.8144–8149.
15. Okamoto, M.; Ishizaki, T.; Kimura, T. Protective effect of hydrogen sulfide on pancreatic beta-cells. *Nitric. Oxide*, 2015; 46: P.32–36.
16. Peake, B.F.; Nicholson, C.K.; Lambert, J.P.; Hood, R.L.; Amin, H.; Amin, S.; Calvert, J.W. Hydrogen sulfide preconditions the db/db diabetic mouse heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2 signaling in an Erk-dependent manner. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2013; 304(9): P.1215–1224.
17. Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R.. Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol Cell*, 2012; 45(1): 13–24.
18. Sun L., Jin H., Sun L., Chen S., Huang Y., Liu J., Li Z., Zhao M., Sun Y., Tang C., Zhao B., Du J. Hydrogen sulfide alleviates myocardial collagen remodeling in association with inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med.* 2015 Jan 20; 20: P.503–515.
19. Thandavarayan R.A., Giridharan VV, Watanabe K and Konishi T: Diabetic cardiomyopathy and oxidative stress: role of antioxidants. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2011; 9: P.225–230.
20. Tsai, C.Y.; Wen, S.Y.; Shibu, M.A.; Yang, Y.C.; Peng, H.; Wang, B.; Wei, Y.M.; Chang, H.Y.; Lee, C.Y. Diallyl trisulfide protects against high glucose-induced cardiac apoptosis by stimulating the production of cystathionine gamma-lyase-derived hydrogen sulfide. *Int. J. Cardiol.*, 2015; 195: P.300–310.
21. Varfolomeev, E., Goncharov, T., Vucic, D. Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF- κ B signaling. *Methods Mol Biol*, 2015; 1280: P.269–282.
22. Varga Z.V., Giricz Z., Liaudet L., Haskó G., Ferdinandy P. and Pacher P.: Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852: P.232–242.
23. Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S. M., Shirani, J., Armstrong, R. C. and Kitsis, R. N. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: P.1497–1504.
24. Wiliński, B., Somogyi, E., Piotrowska, J., Góralska, M., & Matura, B. Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs. *Folia Biol (Kra-kow)*, 2011; 59(3–4): P.151–155. doi: 10.3409/fb59_3-4.151-155.
25. Yang L., Zhao D., Ren J. and Yang J.: Endoplasmic reticulum stress and protein quality control in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852: 209–218.
26. Yang W., Lu J., Weng J., Jia W., Ji L., Xiao J., Shan Z., Liu J., Tian H., Ji Q, et al China National Diabetes and Metabolic Disorders Study Group: Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med.* 2010; 362: 1090–1101.
27. Yang, H., Mao, Y., Tan, B., Luo, S., Zhu, Y. The protective effects of endogenous hydrogen sulfide modulator, S-propargylcysteine, on high glucose-induced apoptosis in cardiomyocytes: A novel mechanism mediated by the activation of Nrf2. *Eur. J. Pharmacol.*, 2015; 761: 135–143.
28. Zhu Y.Z., Wang Z.J., Ho P., Loke Y.Y., Zhu Y.C., Huang S.H., Tan C.S., Whiteman M., Lu J., Moore P.K. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats // *J Appl Physiol.* 2007; 102(1): P. 261–268.

SUMMARY

CARDIOMYOCYTE DNA CONTENT AND ITS LINK TO CSE/ H₂S SYSTEM IN THE HEART OF EXPERIMENTAL DIABETIC RATS

Palamarchuk I., Zaichko N. Melnyk A., Nechiporuk V., Yurchenko P.

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

One of the most common complication of diabetes mellitus (DM) is diabetic cardiomyopathy, which is associated with the development of inflammation, fibrosis and the induction of

apoptosis. Hydrogen sulfide (H_2S) has recently been shown to play an important role in the regulation of cardiac and vascular function. The role of the H_2S system in the mechanisms of diabetic heart development remains uncertain.

The aim of this work was to evaluate the effect of modulators of H_2S system on the level of DNA fragmentation and H_2S concentration in heart of rats with experimental diabetes mellitus.

The experiment was performed on 40 white laboratory male rats (180-250 g), randomly divided into 4 groups ($n=10$): healthy (control), diabetes mellitus induced by streptozotocin (STZ), diabetes mellitus + propargylglycine, inhibitor of cystathionine gamma lyase (STZ + PPG), diabetes mellitus + NaHS, exogenous H_2S donor (STZ + NaHS). The experimental DM was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (40 mg/kg). The animals from two groups (3rd and 4th groups) starting from 14th to 28th day after the injection of STZ were administered modulators of H_2S system i/p once per day. D, L-propargylglycine was dosed at 50 mg/kg body weight, while NaHS · H_2O - at 3 mg/kg body weight. H_2S content in hearts was evaluated by spectrophotometry (Wilinski, 2011). DNA content was determined by flow cytometry (Partec PAS, Germany). The development of DM in rats was accompanied by a significant decrease in myocardial H_2S concentration by 36.6% ($p<0.05$) compared with control. The administration of propargylglycine led to an increase in H_2S deficiency (29.4%, $p<0.05$) compared

to the STZ group. The administration of NaHS resulted in a decrease in H_2S deficiency (by 23.5%, $p<0.05$) compared to the STZ group. Flow cytometry showed that DM was accompanied by an increased apoptotic activity (increased number of myocardiocytes in the SUB- G_0G_1 phase by 11.4%, $p<0.05$), polyploidization (increased proportion of cells in the G_2M phase by 32.1%, $p<0.05$) and proliferation (29.8% increase in S-phase cells, $p<0.05$) of heart cells compared with controls. The introduction of propargylglycine led to an increase in apoptosis (14.4%, $p<0.05$) compared with the STZ group. Whereas NaHS administration decreased the degree of apoptosis (12.3%, $p<0.05$), polyploidization (14.4%, $p<0.05$) and proliferation compared (26.2%, $p<0.05$) with untreated diabetes. Correlation analysis showed that impaired H_2S metabolism is an important factor of disregulation of cell cycle in diabetic heart: a reliable inverse relationship was registered ($r=-(0,69-83)$, $p<0.01$) between H_2S level and the indicators of apoptosis activity, proliferation and polyploidization.

Disintegration of the H_2S /CSE system is associated with an increase in apoptosis activity, polyploidization, and proliferation of myocardiocytes in experimental DM. Modulation of H_2S metabolism is a potential direction for the prevention of the development of cardiovascular complications of diabetes.

Keywords: cell cycle, DNA, heart, cystathionine- γ -lyase, hydrogen sulfide, diabetes mellitus.

РЕЗЮМЕ

СОДЕРЖАНИЕ ДНК В КАРДИОМИОЦИТАХ И ЕГО СВЯЗЬ С СИСТЕМОЙ ЦГЛ/ H_2S В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Паламарчук И.В., Заичко Н.В., Мельник А.В., Нечипорук В.М., Юрченко П.А.

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Украина

Одним из осложнений сахарного диабета (СД) является диабетическая кардиомиопатия, которая сопровождается развитием воспаления, фиброза и индукцией апоптоза. В последнее время показано, что значимую роль в регуляции функции сердца и сосудов играет гидроген сульфид (H_2S). Однако, по сей день остается неопределенной роль системы H_2S в механизмах поражения сердца при СД.

Цель исследования - оценить влияние модуляторов обмена гидроген сульфида на уровень ДНК и метаболизм H_2S в кардиомиоцитах при экспериментальном сахарном диабете.

Исследования проведены на 40 белых нелинейных крысах-самцах (180-250 г), которые были рандомизированно распределены на 4 группы ($n=10$): здоровые (контрольная группа), сахарный диабет (STZ), сахарный диабет+пропаргилглицин, ингибитор цистатионин-гамма-лиазы (STZ+PPG), сахарный диабет+NaHS, экзогенный донор H_2S (STZ+NaHS). Экспериментальный СД индуцировали однократным внутривенным введением стрептозотцина (40 мг/кг массы). Двум группам животных (III и IV группы) с четырнадцатых суток по 28-е сутки после индукции диабета вводили модуляторы обмена H_2S в/б 1 раз в сутки. D, L-пропаргилглицин вводили в дозе 50 мг/кг массы, а NaHS · H_2O - в дозе 3 мг/кг массы тела. Через четыре недели эксперимента, сердца крыс были взяты для исследования. Уровень H_2S в миокарде определяли по методике Wilinski (2011). Содержание ДНК определяли методом проточной цитометрии («Partec PAS», Германия).

Развитие СД у крыс сопровождалось достоверным снижением уровня H_2S в миокарде на 36,6% ($p<0,05$) в

сравнении с контролем. Введение пропаргилглицина приводило к усугублению дефицита H_2S (на 29,4%, $p<0,05$) в сравнении с нелечеными диабетическими крысами. Однако введение NaHS уменьшало дефицит H_2S на 23,5%, ($p<0,05$) в сравнении с группой STZ. По результатам проточной цитометрии, развитие СД сопровождалось усилением апоптоза (увеличивалось количество кардиомиоцитов в фазе SUB- G_0G_1 на 11,4%, $p<0,05$), полиплоидизации (рост доли клеток в фазе G_2M на 32,1%, $p<0,05$) и пролиферации (увеличение доли клеток в фазе S на 29,8%, $p<0,05$) в сравнении с контрольной группой. Введение пропаргилглицина приводило к усилению апоптоза (14,4%, $p<0,05$) в сравнении с STZ группой, тогда как назначение NaHS снижало степень проявления апоптоза (12,3%, $p<0,05$), полиплоидизации (14,4%, $p<0,05$) и пролиферации (26,2%, $p<0,05$) в сравнении с нелеченым диабетом. Корреляционный анализ показал, что дисбаланс метаболизма H_2S в миокарде является значимым фактором нарушения клеточного цикла кардиомиоцитов при СД: между уровнем H_2S в миокарде и показателями активности апоптоза, пролиферации и полиплоидизации регистрировалась достоверная обратная связь ($r=-(0,69-0,83)$, $p<0,01$)

Нарушения в системе H_2S /ЦГЛ ассоциируются с увеличением активности апоптоза, полиплоидизации и пролиферации кардиомиоцитов в условиях экспериментального СД. Модуляция обмена H_2S является перспективным направлением профилактики развития сердечно-сосудистых осложнений СД.

რეზიუმე

დნმ-ის შემცველობა კარდიომიოციტებში და მისი კავშირი ცვლ/ H_2S სისტემასთან ვირთაგვების გულში ექსპერიმენტული შაქრიანი დიაბეტის დროს

ი.პალმარჩუკი, ნ.ზაიკო, ა.მელნიკი, ვ.ნეჩიპორუკი, პ.იურჩენკო

ვინიცას ნ.პიროგოვის სახ. ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, უკრაინა

შაქრიანი დიაბეტის ერთ-ერთ გართულებას წარმოადგენს დიაბეტური კარდიომიოპათია, რასაც თან ახლავს ანთების, ფიბროზისა და აპოპტოზის განვითარება. ბოლო პერიოდში ნაჩვენებია, რომ გულისა და სისხლძარღვების ფუნქციათა რეგულაციაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს პიდროგენსულფიდი (H_2S). H_2S -სისტემის როლი გულის დაზიანების მექანიზმებში შაქრიანი დიაბეტის დროს დღემდე არის დასაზუსტებელი.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა H_2S -ის ცვლის მოდულატორების გავლენის შეფასება დნმ-ის დონესა და H_2S -ის მეტაბოლიზმზე მიოკარდიოციტებში ექსპერიმენტული შაქრიანი დიაბეტის დროს.

კვლევა ჩატარდა 40 თეთრ არახაზოვან, 180-250 გრ წონის მამრ ვირთაგვებზე, რომლებიც რანდომულად განაწილდა 4 ჯგუფად ($n=10$): ჯანმრთელები (საკონტროლო ჯგუფი), შაქრიანი დიაბეტი (STZ), შაქრიანი დიაბეტი+პროპარგილგლიცინი, ცისტინინ-გამა-ლიაზას ინჰიბიტორი (STZ+PPG), შაქრიანი დიაბეტი+NaHS, ეგზოგენური დონორი (STZ+NaHS). ექსპერიმენტული შაქრიანი დიაბეტი ინდუცირებული იყო სტრეპტოზოტოცინის ერთჯერადი ინტრაპერიტონეული შეყვანით (40 მგ/კგ). ცხოველების ორ ჯგუფისთვის (III და IV) დიაბეტის ინდუქციიდან მე-14-დან 28-ე დღის ჩათვლით, დღეში ერთხელ ინტრაპერიტონეულად შეჰყავდათ H_2S -ის ცვლის მოდულატორები. D, L- პროპარგილგლიცინი შეჰყავდათ დოზით 50 მგ/კგ, ხოლო NaHS- H_2O - დოზით 3 მგ/კგ.

ექსპერიმენტის ოთხი კვირის შემდეგ ჩატარდა ვირთაგვების გულის გამოკვლევა. H_2S -ის დონე მიოკარდიუმში განისაზღვრა Wilinski-ის მეთოდით (2011), დნმ-ის შემცველობა - გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით («Partec PAS», გერმანია).

შაქრიანი დიაბეტის განვითარებას თან ახლდა მიოკარდიუმში H_2S -ის სარწმუნო შემცირება 36.6%-ით

($p<0,05$), საკონტროლოსთან შედარებით. პროპარგილგლიცინის შეყვანამ გამოიწვია H_2S -ის დეფიციტის გადრმავება (29.4%-ით, $p<0,05$), არანამკურნალებ დიაბეტიან ვირთაგვებთან შედარებით. თუმცა, NaHS-ის შეყვანამ შეამცირა H_2S -ის დეფიციტი STZ-ჯგუფთან შედარებით.

გამდინარე ციტომეტრიის შედეგების მიხედვით, შაქრიანი დიაბეტის განვითარებას თან ახლდა აპოპტოზის (11.4%-ით იზრდებოდა მიოკარდიოციტების რაოდენობა ფაზაში SUB-G₀G₁), პოლიპლოიდიზაციის (G₂M ფაზის უჯრედების წილის ზრდა 32.1%-ით, $p<0,05$) და პროლიფერაციის (S ფაზის უჯრედების წილის ზრდა 29.8%-ით, $p<0,05$) გაძლიერება, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით. პროპარგილგლიცინის შეყვანამ გამოიწვია აპოპტოზის გაძლიერება 14.4%-ით STZ-ჯგუფთან შედარებით, $p<0,05$. NaHS-ის დანიშვნამ განაპირობა აპოპტოზის შემცირება 12.3%-ით ($p<0,05$) პოლიპლოიდიზაციის - 14.4%-ით ($p<0,05$) და პროლიფერაციის 26.2%-ით ($p<0,05$) გამოვლინების ხარისხის შემცირება არანამკურნალებ დიაბეტთან შედარებით.

კორელაციურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ H_2S -ის მეტაბოლიზმის დისბალანსი მიოკარდიუმში წარმოადგენს მნიშვნელოვან ფაქტორს მიოკარდიოციტების უჯრედული ციკლის დარღვევისათვის შაქრიანი დიაბეტის დროს: მიოკარდიუმში H_2S -ის დონესა და აპოპტოზის, პროლიფერაციის და პოლიპლოიდიზაციის აქტივობის მაჩვენებლებს შორის დაფიქსირდა სარწმუნო უკუკავშირი ($r = (-0,69-0,83)$, $p<0,01$). დარღვევები ცვლ/ H_2S სისტემაში ასოცირდება აპოპტოზის, პროლიფერაციის და პოლიპლოიდიზაციის აქტივობის ზრდასთან ექსპერიმენტული შაქრიანი დიაბეტის პირობებში. H_2S -ის ცვლის მოდულაცია პერსპექტულ მიმართულებას წარმოადგენს შაქრიანი დიაბეტის გულ-სისხლძარღვოვანი გართულებების პროფილაქტიკის თვალსაზრისით.