

THE EFFECT OF ZINC SULFATE, SODIUM THIOSULFATE, LIPOIC ACID, TAURINE ON THE EXPRESSION OF ENZYMES OF HYDROGEN SULFIDE SYNTHESIS, MEDIATORS OF INFLAMMATION, FIBROGENESIS IN THE KIDNEYS OF RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY

National Pirogov Memorial Medical University (Vinnitsya, Ukraine)

vitwik@gmail.com

The article is devoted to studying the mechanisms of kidney damage due to obesity and the search for new ways to correct renal dysfunction with modulators of hydrogen sulfide (H_2S). The problem of obesity-related kidney damage is becoming increasingly important. The pathogenesis of obesity includes a wide range of biochemical changes that initiate kidney damage, including disorders of the H_2S system. The difficulty of correcting H_2S levels in the kidneys for obesity is due to the ability of known H_2S donors to enhance lipogenesis and accelerate obesity. Therefore, the search for safe modulators of H_2S metabolism in the kidneys for obesity continues. The aim of the study was to determine the effect of zinc sulfate, sodium thiosulfate, lipoic acid, taurine on the expression of H_2S metabolic enzymes, mediators of inflammation and fibrogenesis in the kidneys of obese rats induced by high-calorie, high-fat diet. The study results showed that obesity in the kidneys of rats reduces the expression of genes of transsulfation enzymes (cystathionine- γ -lyase, cystathionine- β -synthase), increasing the production of insulin-like growth factor 1 and tumor necrosis factor α , increases serum levels. reduced biochemical signs of renal dysfunction, immunoinflammatory and profibrotic processes in the kidneys and did not increase the development of obesity. Zinc sulfate and lipoic acid have been shown to regulate renal expression of H_2S -synthesizing enzymes. Thus, establishing molecular mechanisms of influence of modulators of H_2S metabolism on the course of obesity nephropathy is a promising area of further medical and biological research

Key words: hydrogen sulfide, obesity, kidney, inflammation, fibrosis.

Relationship of publications with planned research works. The work is a fragment of the planned research of the Department of Biological and General Chemistry of National Pirogov Memorial 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 – 0119U 001142).

Introduction. The role of the hydrogen sulfide (H_2S) gas transmitter in the pathochemistry of obesity and its complications is the subject of active research in biology and medicine. H_2S is involved in regulating lipid metabolism and fat accumulation in the body [1], but depending on the conditions shows different biological effects [2].

The kidneys are one of the key target organs, whose metabolism and physiological functions suffer from obesity [3, 4]. H_2S is physiologically synthesized in the kidneys by cystathionine- γ -lyase (CSE), cystathionine- β -synthase (CBS), mitochondrial sulfurtransferases, and is involved in the regulation of all renal functions [5, 6]. Renal dysfunction is associated with decreased endogenous H_2S production [7], and H_2S donors provide a nephroprotective effect [8]. Meanwhile, information on changes in H_2S metabolism in the kidneys due to obesity and approaches to its correction remains debatable. There is evidence that introducing H_2S ($NaHS$) donor reduces the accumulation of lipids and the expression of proinflammatory cytokines in the kidneys, improves filtration function, reduces body weight under a high-fat diet [9]. According to

other data, H_2S donors and stimulators of its endogenous products inhibit lipolysis, stimulate adipogenesis and fat deposition in white adipose tissue [10, 11].

The search for correctors of H_2S metabolism, which would provide nephroprotection in obesity, and at the same time, do not activate lipogenesis and adipogenesis, adjust the production of cytokines and growth factors, remains relevant. Positive effects on lipid metabolism and body weight in obesity have been shown in zinc [12], alpha-lipoic acid [13], taurine [14], and antihypertensive and nephroprotective effects in sodium thiosulfate [15]. Finding out the effect of these correctors on the production of H_2S in the kidneys and associated processes in obesity is considered appropriate.

The aim is to establish the effect of zinc sulfate, sodium thiosulfate, lipoic acid, taurine on the expression of enzymes of hydrogen sulfide synthesis, mediators of inflammation, fibrogenesis in the kidneys of rats with diet-induced obesity.

Object and methods of research. The experiments were performed on 60 white adult laboratory male rats with an initial body weight of 150–190 g, following bioethical principles adopted by the First National Congress of Ukraine on Bioethics (Kyiv, 2001), the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes» (Strasbourg, 1986), Council of Europe Directives 86/609/EEC (1986), the Law of Ukraine «On the Protection of Animals against Cruelty» (№ 3447-IV of 21 February 2006, p. 26).

Laboratory animals were kept in standard conditions of the vivarium of National Pirogov Memorial Medical University, with a 12-hour lighting regime (day/night), at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity $55 \pm 5\%$, with free access to water and feed ad libitum. According to the principle of minimizing mass and growth differences, 5 experimental and 1 control group (10 individuals) were formed. The control group received a complete diet of granular food – standard diet (2.71 kcal / g; 22.1 % protein, 10.8 % fat, 67.1 % carbohydrate per calorie).

The experimental groups consumed a high-calorie high-fat diet (HFD) for 70 days [16], consisting of 60 % SD, 10 % eggs, 10 % pork lard (with the addition of fatty minced meat), 9 % sugar, 5 % peanuts, 5 % milk powder, 1 % sesame oil (4.33 kcal/g; 15.7 % protein, 39.5 % fat, 44.8 % calories per calorie). The development of diet-induced obesity (DIO) was determined by changes in the Lee index (the ratio of the root of the cubic body weight (g) to nasal-anal body length (cm)). Obesity was considered achieved at values of the Leeindex ≥ 0.31 . From the 57th to the 70th day, 4 experimental groups received correctors – zinc sulfate 124 mg/kg (Teva, Poland), sodium thiosulfate 300 mg/kg (Pharmstandard-Biolik, Ukraine), α -lipoic acid 100 mg/kg Berlin-Chemie, Germany), taurine 100 mg/kg (Elit-Pharm, Ukraine), intragastrally once a day on 0.1 % starch gel. The control and one experimental group received equivolume amounts of starch gel during this period. Euthanasia of rats was performed by decapitation under thiopental anesthesia (100 mg/kg i/g).

Serum was obtained by centrifugation of whole blood at 1500 g for 15 min at $18\text{--}22^\circ\text{C}$. The kidneys were washed with chilled 1.15 % KCl solution, a sample of tissue was taken to determine gene expression and stored at -70°C until studies. The remaining tissue was homogenized for 2 min in a cooled medium of 1.15 % KCl (1: 4 weight/volume ratio) at 3000 rpm. Centrifuged for 30 min at 600 g at 4°C , aliquots of the postnuclear supernatant were collected and stored at -20°C until studies. In the kidneys, mediators of inflammation and fibrogenesis were determined – the level of insulin-like growth factor 1 (IGF1, ELISA Mediagnost, Germany) and tumor necrosis factor (TNF α , ELISA Quantikine, USA). An early marker of glomerular dysfunction was determined in serum – the level of cystatin C (RayBiotech, USA). The study was performed according to the manufacturer's instructions, detection was performed on a STAT-FAX 303+ (USA) analyzer.

The level of expression of the genes CSE, CBS in the kidneys was determined by polymerase chain reaction (PCR) in real time. Total RNA was isolated from the Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, USA), and cDNA was obtained in a reverse transcription reaction from

the ProtoScript M–MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs, USA). CSE and CBS gene expression was determined in the presence of SYBR Green I dye using a CFX 96 detection amplifier (Bio Rad, USA). The reaction mixture contained 10x amplification buffer with SYBR Green I dye; 25 mM MgCl₂; 2.5 mM deoxynucleoside triphosphates; specific primers for rat genes [17] CSE (5'-GCTGAGAGCCTGGGAGGATA-3', 5'-TCACTGATCCCGAGGGTAGCT-3'); CBS (5'-CTCCGGGAGAAGGGTTTGA-3', 5'-CATGTTCCCGAGAGTCACCAT-3'), the β -actin reference gene (5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCT-3', 5'-TATCGTCATCCATGGCGA, 5 μ l of cDNA sample was added to the mixture. Amplification mode: 94°C 3 min; 40 cycles: 94°C 15 s; 64°C 40 min. For data analysis, the relative Ct method was used, calculated by the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

Statistical processing of primary material was performed in MS Excel, IBM Statistics SPSS 26 for Windows. Calculated the mean value (M), the error of the mean (m). The statistical significance of the differences was assessed in the Kruskal-Wallis test, and the relationship was measured by the Spearman correlation coefficient (rs). Differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant. The results are given as $M \pm m$.

Research results and their discussion. The use of HFD for 10 weeks caused the development of obesity in animals of all experimental groups, which showed an increase in the Leeindex ≥ 0.31 (fig. 1). At day 70, the Leeindex in rats with DIO was 0.341 ± 0.002 versus 0.293 ± 0.002 in the control ($p < 0.001$). The two-week introduction of correctors did not deepen the changes in the Leeindex, and in the group DIO + LA the changes were less pronounced (Leeindex – 0.326 ± 0.003 , $p = 0.05$ relative to the DIO group).

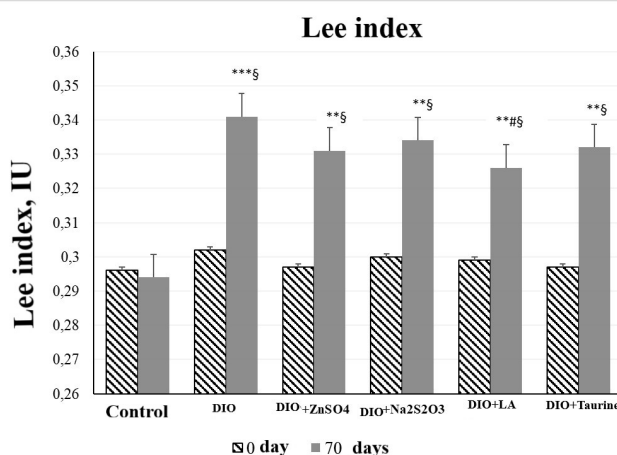


Figure 1 – Lee index in rats with obesity induced by a high-calorie diet (DIO) and under the action of H₂S metabolism modulators ($M \pm m$, $n = 10$).

Notes: 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – relative to the control group; 2. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – relative to the DIO group (without correction); 3. § – $p < 0.001$ between the initial (0 days) and the final Lee index (70 days) in the group.

The use of HFD initiated the development of renal dysfunction in experimental rats, as evidenced by an increase in serum cystatin C – an early marker of damage to the glomerular apparatus of the kidneys (fig. 2). In particular, in the DIO group, the level of cystatin C in serum was higher by 198 % ($p < 0.001$) than in control. The introduction of all metabolic correctors restrained HFD-induced deterioration of renal function: the level of cystatin C in the groups DIO + ZnSO₄, DIO + Na₂S₂O₃, DIO + LA and DIO + taurine was lower by 33.1; 41.8; 36.3 and 31.1 % ($p < 0.01$) than in the DIO group.

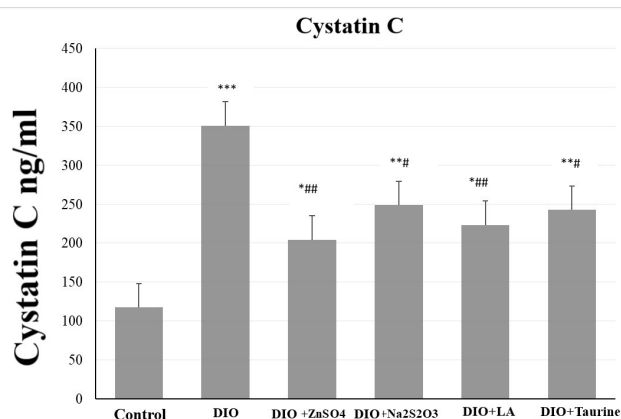


Figure 2 – Serum cystatin C levels in rats with diet-induced obesity (DIO) and under the action of H₂S metabolism modulators ($M \pm m$, $n=10$).

Notes: 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – relative to the control group; 2. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – relative to the DIO group (without correction).

The development of obesity on the background of HFD was accompanied by a decrease in the expression of H₂S-synthesizing enzymes in the kidneys of rats (fig. 3). As of day 70, the relative level of CSE / β -actin mRNA in the DIO group was 59.7 % lower ($p < 0.001$), and the CBS / β -actin mRNA was lower and 54.2 % lower ($p < 0.001$) than in the DIO control group. Zinc sulfate and lipoic acid increased the expression of CSE and CBS in the kidneys of DIO rats, while thiosulfate and taurine did not. In particular, the level of CSE / β -actin mRNA and CBS / β -actin mRNA in the DIO + ZnSO₄ group was higher by 51.9 and 68.4 % ($p < 0.05$), and in the DIO + LA group – higher by 40.7 and 50 % ($p < 0.05$) than in the DIO group, respectively.

Under the conditions of HFD in the kidneys of rats significantly increased production of pro-inflammatory and profibrogenic mediators – insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α), and metabolic correction inhibited this process (fig. 4). Thus, in the DIO group, the level of IGF-1 was higher by 156.1 % ($p < 0.001$), and the level of TNF α was higher by 129.3 % ($p < 0.001$) than in the control. In the groups DIO + ZnSO₄, DIO + Na₂S₂O₃, DIO + LA and DIO + taurine, the level of IGF-1 was lower by 48.4; 41.4; 42.6 and 33.7 % ($p < 0.01$), and the level of TNF α was lower by 41.8; 29.1; 36.3 and 30.8 % ($p < 0.01$) than in the DIO group, respectively.

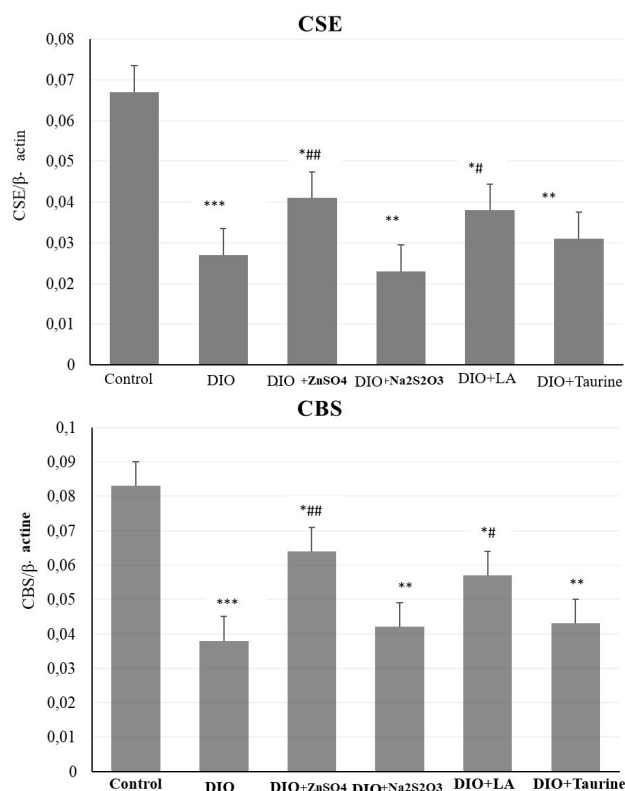


Figure 3 – Expression of CSE and CBS genes in the kidneys of rats with diet-induced obesity (DIO) and by modulators of H₂S metabolism ($M \pm m$, $n=6$).

Notes: 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – relative to the control group; 2. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – relative to the DIO group (without correction).

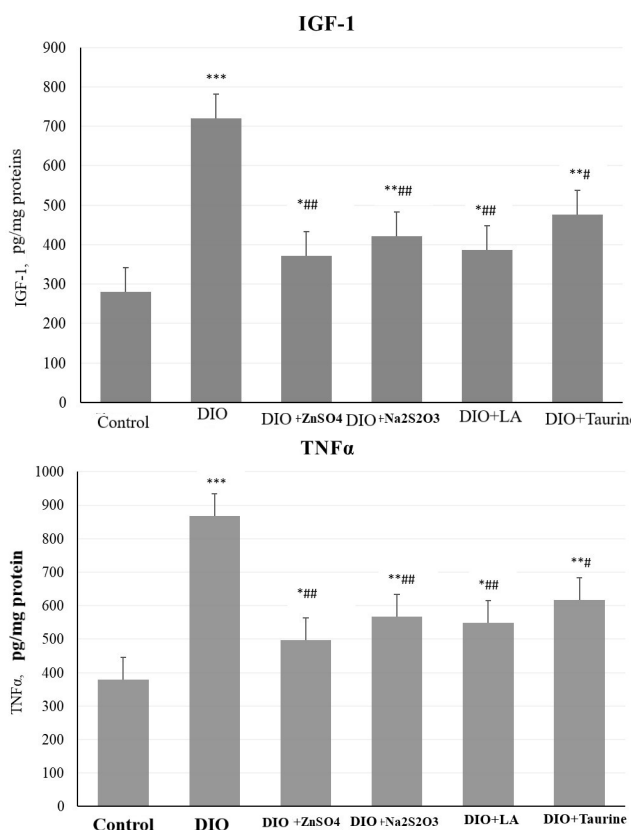


Figure 4 – Levels of IGF-1 and TNF α in the kidneys of rats with diet-induced obesity (DIO) and under the action of modulators of H₂S metabolism ($M \pm m$, $n=10$).

Notes: 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – relative to the control group; 2. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – relative to the DIO group (without correction).

Correlation analysis (**table**) showed statistically significant mean inverse relationships between CSE and CBS gene expression levels and markers of kidney damage and the Lee index. The strongest association was found between CSE expression and cystatin C levels and IGF-1 levels ($r_s=0.685$; 0.595 , $p<0.001$).

Table – Correlation coefficients between the level of expression of CBS and CSE genes and markers of kidney damage in rats with diet-induced obesity (n=35)

Indicator	CBS		CSE	
	r_s	P	r_s	P
IGF-1	-0,528	0,001	-0,595	<0,001
TNF α	-0,357	0,035	-0,518	0,001
Cystatin C	-0,574	0,001	-0,685	<0,001
Lee index	-0,559	<0,001	-0,368	0,030

Notes: r_s is the Spearman correlation coefficient.

Thus, decreased expression of H_2S synthesis enzymes is associated with activation of inflammatory and fibrotic processes in the kidneys due to obesity. Zinc sulfate, lipoic acid, thiosulfate, and taurine reduce biochemical changes in the kidneys but show different effects on the H_2S system. Changes in H_2S metabolism in the kidneys induced by obesity can disrupt overall homeostasis, immune protection, reduce the body's adaptive reserves [18]. The high-fat diet causes a complex of biochemical disorders in the kidneys – oxidative stress, inflammation, fibrogenesis [19, 20], ectopic fat accumulation [21], impaired expression of insulin

receptors [22]. Blocking the action of IGF-1 reduces glomerulomegaly, inflammatory infiltration, tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy in rats [23]. Therefore, the ability of the above metabolic correctors to adjust the level of IGF-1 and TNF α in the kidneys, along with the effect on the expression of H_2S metabolic enzymes, confirms their high nephroprotective potential in obesity.

Conclusions. 1. In obese rats induced by a high-calorie, high-fat diet, an association has been established between decreased expression of H_2S -synthesizing enzyme (CSE, CBS) genes in the kidneys and biochemical markers of renal dysfunction, inflammation and fibrogenesis.

2. Zinc sulfate, lipoic acid, sodium thiosulfate and taurine inhibit the development of nephropathy in rats under a high-calorie, high-fat diet: reduce levels of cystatin C, insulin-like growth factor 1, tumor necrosis factor-alpha, do not aggravate obesity. Zinc sulfate and lipoic acid help normalize the expression level of transsulfation enzyme genes (CSE, CBS) in the kidneys of rats with diet-induced obesity.

Prospects for further research. The establishment of molecular mechanisms through which the effect of modulators of different pathways of hydrogen sulfide metabolism on the development of obesity nephropathy is realized will allow to establish new therapeutic targets for its prevention and correction. Further study of the role of modulation of H_2S metabolism in the mechanisms of obesity is promising.

References

- Comas F, Latorre J, Ortega F, Arnoriaga Rodríguez M, Kern M, Lluch A, et al. Activation of endogenous H_2S biosynthesis or supplementation with exogenous H_2S enhances adipose tissue adipogenesis and preserves adipocyte physiology in humans. *Antioxid Redox Signal*. 2021 Aug 10;35(5):319–340. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8206>.
- Comas F, Moreno-Navarrete JM. The impact of H_2S on obesity-associated metabolic disturbances. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Apr 21;10(5):633. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10050633>.
- Wei L, LeeY, Yu Y, Xu M, Chen H, LeeL, et al. Obesity-related glomerulopathy: from mechanism to therapeutic target. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021 Oct 28;14:4371–4380. DOI: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S334199>.
- Yang S, Cao C, Deng T, Zhou Z. Obesity-related glomerulopathy: A latent change in obesity requiring more attention. *Kidney Blood Press Res*. 2020 Jun 4;45(4):510–522. DOI: <https://doi.org/10.1159/000507784>.
- Cao X, Bian JS. The role of hydrogen sulfide in renal system. *Front Pharmacol*. 2016 Oct 18;7:385. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00385>.
- Zhang H, Zhao H, Guo N. Protective effect of hydrogen sulfide on the kidney (Review). *Mol Med Rep*. 2021 Oct;24(4):696. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12335>.
- Koniukh S, Voloshchuk N, Melnyk A, Domin I. Hydrogen sulfide metabolism and its role in kidney function in a rat model of chronic kidney disease. *Health Prob Civil*. 2020 Jun 19;14(4):289–297. DOI: <https://doi.org/10.5114/hpc.2020.96571>.
- Ngowi EE, Sarfraz M, Afzal A, Khan NH, Khattak S, Zhang X, et al. Roles of hydrogen sulfide donors in common kidney diseases. *Front Pharmacol*. 2020 Nov 19;11:564281. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.564281>.
- Wu D, Gao B, LeeM, Yao L, Wang S, Chen M, et al. Hydrogen sulfide mitigates kidney injury in high fat diet-induced obese mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 Jun 19;2016:2715718. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/2715718>.
- Geng B, Cai B, Liao F, Zheng Y, Zeng Q, Fan X, et al. Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. *PLoS One*. 2013 Sep 13;8(9): e73892. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073892>.
- Yang G, Ju Y, 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 Mol Cell Biol Lipids*. 2018 Feb;1863(2):165–176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.008>.
- Khorsandi H, Nikpayam O, Yousefi R, Parandoosh M, Hosseinzadeh N, Saidpour A, et al. Zinc supplementation improves body weight management, inflammatory biomarkers and insulin resistance in individuals with obesity: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Diabetol Metab Syndr*. 2019 Dec 2;11:101. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0497-8>.
- Namazi N, Larijani B, Azadbakht L. Alpha-lipoic acid supplement in obesity treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clin Nutr*. 2018 Apr;37(2):419–428. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.06.002>.

14. Kim KS, Jang MJ, Fang S, Yoon SG, Kim IY, Seong JK, et al. Anti-obesity effect of taurine through inhibition of adipogenesis in white fat tissue but not in brown fat tissue in a high-fat diet-induced obese mouse model. *Amino Acids*. 2019 Feb;51(2):245–254. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2659-7>.
15. Hsu CN, Hou CY, Chang-Chien GP, Lin S, Yang HW, Tain YL. Sodium thiosulfate improves hypertension in rats with adenine-induced chronic kidney disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 11;11(1):147. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11010147>.
16. Konopelniuk VV, Goloborodko II, Ishchuk TV, Synelnyk TB, Ostapchenko LI, Spivak MY, et al. Efficacy of FenuGreek-based bionanocomposite on renal dysfunction and endogenous intoxication in high-calorie diet-induced obesity rat model-comparative study. *EPMA J*. 2017 Jun 16;8(4):377–390. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13167-017-0098-2>.
17. Huang P, Shen Z, Yu W, Huang Y, Tang C, Du J, et al. Hydrogen sulfide inhibits high-salt diet-induced myocardial oxidative stress and myocardial hypertrophy in Dahl rats. *Frontiers in pharmacology*. 2017 Mar 16;8:128. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00128>.
18. Sharma I, Liao Y, Zheng X, Kanwar YS. New pandemic: obesity and associated nephropathy. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jun 29;8:673556. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.673556>.
19. Niu H, LeeY, LeeH, Chi Y, Zhuang M, Zhang T, et al. Matrix metalloproteinase 12 modulates high-fat-diet induced glomerular fibrogenesis and inflammation in a mouse model of obesity. *Sci Rep*. 2016 Jan 29;6:20171. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep20171>.
20. Rangel Silveiras R, Nunes Goulart da Silva Pereira E, Eduardo Ilaquita Flores E, Lino Rodrigues K, Ribeiro Silva A, Gonçalves-de-Albuquerque CF, et al. High-fat diet-induced kidney alterations in rats with metabolic syndrome: endothelial dysfunction and decreased antioxidant defense. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019 Sep 6;12:1773–1781. DOI: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S211253>.
21. Liu S, Da J, Yu J, Dong R, Yuan J, Yu F, et al. Renal tubule ectopic lipid deposition in diabetic kidney disease rat model and in vitro mechanism of leptin intervention. *J Physiol Biochem*. 2022 Feb 22. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00874-9>.
22. Lee HJ, Mariappan MM, Norton L, Bakewell T, Feliers D, Oh SB, et al. Proximal tubular epithelial insulin receptor mediates high-fat diet-induced kidney injury. *JCI Insight*. 2021 Feb 8;6(3): e143619. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.143619>.
23. Dong R, Yu J, Yu F, Yang S, Qian Q, Zha Y. IGF-1/IGF-1R blockade ameliorates diabetic kidney disease through normalizing Snail1 expression in a mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 Oct 1;317(4): E 686–E 698. DOI: 10.1152/ajpendo.00071.2019.

ВПЛИВ ЦИНК СУЛЬФАТУ, ТІОСУЛЬФАТУ НАТРІЮ, ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ, ТАУРИНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ЕНЗИМІВ СИНТЕЗУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ, МЕДІАТОРИ ЗАПАЛЕННЯ, ФІБРОГЕНЕЗУ В НИРКАХ ЩУРІВ З ДІЄТ-ІНДУКОВАНИМ ОЖИРІННЯМ

Блажченко В.В., Заїчко Н.В.

Резюме. *Вступ.* Роль гідроген сульфід (H₂S) у патохімії ожиріння та його ускладнень залишається предметом активних досліджень біології та медицини. Нирки є одним із ключових органів-мішеней, які страждають при ожирінні. H₂S фізіологічно синтезується в нирках, і бере участь в регуляції усіх ниркових функцій, ліпідного обміну та адипогенезу. Пошук коректорів обміну H₂S, які б забезпечували нефропротекцію при ожирінні, не активували ліпогенез та адипогенез, є актуальним.

Мета: встановити вплив цинк сульфату, тіосульфату натрію, ліпоєвої кислоти, таурину на експресію ензимів синтезу гідроген сульфід, медіатори запалення, фіброгенезу в нирках щурів з дієт-індукованим ожирінням.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведені на 60 білих лабораторних щурах-самцях з дотриманням принципів біоетики (Страсбург, 1986). Ожиріння викликали висококалорійною високожировою дієтою (4,33 ккал/г, 39,5 % жирів) упродовж 70 діб. Контрольні щури отримували стандартний корм (2,71 ккал/г, 10,8 % жирів). Метаболічні коректори (цинк сульфат, тіосульфат натрію, ліпоєву кислоту, таурин) вводили в/шл з 56-ої по 70-у добу. В крові визначали рівень цистатину С, в нирках – експресію генів H₂S-синтезуючих ензимів (CSE, CBS), рівні IGF1 та TNFα. Статистичну обробку проводили в пакеті IBM Statistics SPSS 26.

Результати. У щурів з ожирінням виявлялось збільшення рівня цистатину С в сироватці крові, зниження рівня експресії генів CSE, CBS, підвищення рівнів медіаторів запалення та фіброгенезу (IGF1, TNFα). Виявлені обернені асоціації між рівнем експресії генів H₂S-синтезуючих ензимів в нирках та біохімічними маркерами ураження нирок. Цинк сульфат (124 мг/кг), тіосульфат натрію (300 мг/кг), ліпоєва кислота (100 мг/кг), таурин (100 мг/кг) зменшували рівні цистатину С, IGF1 та TNFα у щурів з ожирінням. Цинк сульфат та ліпоєва кислота підвищували рівень експресії генів CSE, CBS в нирках щурів з ожирінням, тіосульфат і таурин не викликали такого ефекту. Введення жодного з коректорів не поглиблювало ознаки ожиріння.

Висновки. Зниження експресії ензимів синтезу H₂S асоціюється з активацією запальних та фібротичних процесів в нирках за ожиріння. Цинк сульфат, ліпоєва кислота, тіосульфат, таурин зменшують біохімічні зміни у нирках, але виявляють різну активність щодо впливу на експресію ензимів обміну H₂S.

Ключові слова: гідроген сульфід, ожиріння, нирки, запалення, фіброз.

THE EFFECT OF ZINC SULFATE, SODIUM THIOSULFATE, LIPOIC ACID, TAURINE ON THE EXPRESSION OF ENZYMES OF HYDROGEN SULFIDE SYNTHESIS, MEDIATORS OF INFLAMMATION, FIBROGENESIS IN THE KIDNEYS OF RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY

Blazhchenko V.V., Zaichko N.V.

Abstract. *Introduction.* The role of hydrogen sulfide (H₂S) in the pathochemistry of obesity and its complications remains the subject of active research in biology and medicine. The kidneys are one of the key target organs that suffer from obesity. Physiologically, H₂S is synthesized in the kidneys, and is involved in the regulation of all renal functions, lipid metabolism and adipogenesis. The search for correctors of H₂S metabolism, which would provide nephroprotection in obesity, would not activate lipogenesis and adipogenesis, is relevant.

The aim of study: to establish the effect of zinc sulfate, sodium thiosulfate, lipoic acid, taurine on the expression of enzymes of hydrogen sulfide synthesis, mediators of inflammation, fibrogenesis in the kidneys of rats with diet-induced obesity.

Object and methods of research. The experiments were performed on 60 white male laboratory rats in accordance with the principles of bioethics (Strasbourg, 1986). Obesity was simulated by a high-calorie high-fat diet (4.33 kcal/g, 39.5 % fat) for 70 days. Control rats received standard feed (2.71 kcal/g, 10.8 % fat). Metabolic correctors (zinc sulfate, sodium thiosulfate, lipoic acid, taurine) were administered intravenously from the 56th to the 70th day. The level of cystatin C in the blood was determined, the expression of H₂S-synthesizing enzyme genes (CSE, CBS), IGF1 and TNFα levels were determined in the kidneys. Statistical processing was performed in the package IBM Statistics SPSS 26.

Results. In obese rats, increased serum cystatin C levels, decreased levels of CSE and CBS gene expression, increased levels of inflammatory and fibrogenesis mediators (IGF1, TNFα) were found. Inverse associations between the level of gene expression of H₂S-synthesizing enzymes in the kidneys and biochemical markers of kidney damage have been identified. Zinc sulfate (124 mg/kg), sodium thiosulfate (300 mg/kg), lipoic acid (100 mg/kg), and taurine (100 mg/kg) decreased cystatin C, IGF1, and TNFα levels in obese rats. Zinc sulfate and lipoic acid increased the expression of CSE, CBS genes in the kidneys of obese rats, thiosulfate and taurine did not cause this effect. The introduction of any of the correctors did not aggravate the signs of obesity.

Conclusions: Decreased expression of H₂S synthesis enzymes is associated with activation of inflammatory and fibrotic processes in the kidneys under obesity. Zinc sulfate, lipoic acid, thiosulfate, taurine reduce biochemical changes in the kidneys, but show different activity in influencing the expression of H₂S metabolic enzymes.

Key words: hydrogen sulfide, obesity, kidney, inflammation, fibrosis.

ORCID and contributionship:

Blazhchenko V.V.: 0000-0001-5448-124X ^{ABCD}

Zaichko N.V.: 0000-0003-1889-6151 ^{EF}

Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

Corresponding author

Blazhchenko Vitaliy Viktorovich

National Pirogov Memorial Medical University

Ukraine, 21018, Vinnytsya, 56 Pirogov str.

Tel.: +380967242328

E-mail: vitwik@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.

Received 16.01.2021

Accepted 02.05.2022

DOI 10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-114-125

УДК 546.221.1:616.61-056.52:612.08

Блажченко В.В., Заїчко Н.В.

ВПЛИВ ЦИНК СУЛЬФАТУ, ТІОСУЛЬФАТУ НАТРІЮ, ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ, ТАУРИНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ЕНЗИМІВ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ, МЕДІАТОРИ ЗАПАЛЕННЯ ТА ФІБРОГЕНЕЗУ В НИРКАХ ЩУРІВ З ДІЕТ-ІНДУКОВАНИМ ОЖИРІННЯМ

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

vitwik@gmail.com

Стаття присвячена дослідженню механізмів ураження нирок за ожиріння та пошуку нових можливостей корекції ренальної дисфункції модуляторами рівня гідроген сульфід (H₂S). Проблема асоційованого з ожирінням ушкодження нирок набуває все більшої актуальності. Патогенез ожиріння включає широкий спектр біохімічних змін, які ініціюють ураження нирок, зокрема порушення стану системи H₂S. Складність корекції рівня H₂S в нирках за ожиріння зумовлена здатністю відомих донорів H₂S посилювати ліпогенез і акселерувати ожиріння. Тому пошук безпечних модуляторів обміну H₂S в нирках за ожиріння триває. Метою роботи було встановлення впливу цинк сульфату, тіосульфату натрію, ліпоєвої кислоти, таурину на експресію ензимів обміну H₂S, медіатори запалення та

фіброгенезу в нирках щурів з ожирінням, індукованим висококалорійною високожировою дієтою. Результати дослідження показали, що за ожиріння в нирках щурів знижується експресія генів ензимів транссульфування (цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази), зростає продукція інсуліноподібного фактору росту 1 та фактору некрозу пухлини альфа, підвищується сироватковий рівень цистатину С. Усі метаболічні коректори зменшували біохімічні ознаки ренальної дисфункції, імунотропних та профібротичних процесів в нирках і при цьому не посилювали розвиток ожиріння. Здатність регулювати ниркову експресію H_2S -синтезуючих ензимів виявили цинк сульфат та ліпоєва кислота. Таким чином, встановлення молекулярних механізмів впливу модуляторів обміну H_2S на перебіг нефропатії ожиріння є перспективним напрямком подальших медико-біологічних досліджень.

Ключові слова: гідроген сульфід, ожиріння, нирки, запалення, фіброз.

Зв'язок публікацій з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом планової НДР кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Роль екзогенних та ендогенних сірководневих сполук в механізмах ураження внутрішніх органів та цитопротекції за різних патологічних станів» (№ державної реєстрації – 0119U 001142).

Вступ. Роль газотрансміттеру гідроген сульфід (H_2S) у патології ожиріння та його ускладнень є предметом активних наукових досліджень у галузях біології та медицини. H_2S залучений до регуляції ліпідного обміну та акумуляції жирів в організмі [1], однак залежно від умов демонструє різноспрямовані біологічні ефекти [2].

Нирки є одним із ключових органів-мішеней, метаболізм та фізіологічні функції яких страждають при ожирінні [3, 4]. H_2S фізіологічно синтезується в нирках за участі цистатіонін-γ-ліази (CSE), цистатіонін-β-синтази (CBS), мітохондріальних сульфуртрансфераз, і бере участь в регуляції усіх ниркових функцій [5, 6]. Ренальна дисфункція асоціюється зі зниженням ендогенної продукції H_2S [7], а донори H_2S забезпечують нефропротекторний ефект [8]. Між тим, інформація щодо змін обміну H_2S в нирках за ожиріння та підходів до його корекції залишається дискусійною. Існують дані, що введення донору H_2S ($NaHS$) знижує акумуляцію ліпідів та експресію прозапальних цитокінів в нирках, покращує фільтраційну функцію, зменшує масу тіла за умов високожирової дієти [9]. За іншими даними, донори H_2S та стимулятори його ендогенної продукції інгібують ліполіз, стимулюють адипогенез та депонування жиру в білій жировій тканині [10, 11].

Пошук коректорів обміну H_2S , які б забезпечували нефропротекцію при ожирінні, і водночас не активували ліпогенез та адипогенез, коригували продукцію цитокінів та ростових факторів, залишається актуальним. Позитивний вплив на обмін ліпідів та масу тіла при ожирінні доведений у препаратів цинку [12], альфа-ліпоєвої кислоти [13], таурину [14], а у тіосульфату натрію виявлений антигіпертензивний та нефропротекторний ефекти [15]. З'ясування впливу вказаних коректорів на продукцію H_2S в нирках та асоційовані процеси в умовах ожиріння вбачається доцільним.

Мета – встановити вплив цинк сульфату, тіосульфату натрію, ліпоєвої кислоти, таурину на експресію ензимів синтезу гідроген сульфід, медіатори запалення, фіброгенезу в нирках щурів з дієт-індукованим ожирінням.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведені на 60 білих статевозрілих лабораторних щурах-самцях з початковою масою тіла 150–190 г з дотриманням біоетичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень «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). Лабораторні тварини утримувались в стандартних умовах віварію Вінницького національного університету ім. М.І. Пирогова, з 12-годинним режимом освітлення (день/ніч), при температурі $22 \pm 2^\circ C$, відносній вологості повітря $55 \pm 5\%$, з вільним доступом до води та корму *ad libitum*. За принципом мінімізації масо-ростових відмінностей було сформовано 5 дослідних і 1 контрольна групи (по 10 особин). Група контролю отримувала повнораціонний гранульований корм – стандартну дієту (2,71 ккал/г; 22,1 % білків, 10,8 % жирів, 67,1 % вуглеводів за калоражем). Дослідні групи упродовж 70 діб споживали висококалорійну високожирову дієту (ВКД) [16], що складалась з 60 % СД, 10 % яйця, 10 % свинячого ляду (з додаванням жирного м'ясного фаршу), 9 % цукру, 5 % очищеного арахісу, 5 % сухого молока, 1 % кунжутної олії (4,33 ккал/г; 15,7 % білків, 39,5 % жирів, 44,8 % вуглеводів за калоражем). Розвиток дієт-індукованого ожиріння (ДІО) визначали за зміною індексу Лі (відношення кореня кубічного маси тіла (г) до назально-анальної довжини тіла (см)) Стан ожиріння вважали досягнутим при значеннях індексу Лі $\geq 0,31$. З 57-ої по 70-у добу 4 дослідні групи отримували коректори – цинк сульфат 124 мг/кг (Teva, Польща), тіосульфат натрію 300 мг/кг (Фармстандарт-Біолік, Україна), α-ліпоєву кислоту 100 мг/кг (Berlin-Chemie, Німеччина), таурин 100 мг/кг (Еліт-фарм, Україна), інтрагастрально 1 раз на добу на 0,1 % крохмальному гелі. Контрольна та одна дослідна група у цей період отримували еквівалентні кількості крохмального гелю. Евтаназію щурів проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (100 мг/кг в/оч).

Сироватку крові отримували центрифугуванням цільної крові при 1500 g 15 хв при 18–22°C. Нирки промивали охолодженим розчином 1,15 % KCl, відбирали наважку тканини для визначення експресії генів і до проведення досліджень зберігали при –70°C. Решту тканини гомогенізували 2 хв в охолоджену середовищі 1,15 % KCl (відношення маса/об'єм 1:4) при 3000 об/хв. Центрифугували 30 хв при 600 g при 4 °C, відбирали аліквоти постядерного супернатанту і до проведення досліджень зберігали при –20°C. В нирках визначали медіатори запалення та фіброгенезу – рівень інсуліно-подібного фактору росту 1 (IGF1, ELISA Mediagnost, Germany) та фактору некрозу пухлини (TNF α , ELISA Quantikine, USA). В сироватці крові визначали ранній маркер гломерулярної дисфункції – рівень цистатину С (RayBiotech, USA). Дослідження проводили згідно інструкції виробників, детекцію здійснювали на аналізаторі STAT-FAX 303+(США).

Рівень експресії генів *CSE*, *CBS* в нирках визначали методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу. Загальну РНК виділяли за набором Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, USA), кДНК отримували в реакції оберненої транскрипції за набором ProtoScript M–MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs, USA). Експресію генів *CSE*, *CBS* визначали в присутності барвника SYBR Green I за допомогою детектувального ампліфікатора CFX 96 (Bio Rad, USA). Реакційна суміш містила 10x буфер для ампліфікації з барвником SYBR Green I; 25 мМ MgCl₂; 2,5 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів; специфічні праймери для генів щурів [17] *CSE* (5'-GCTGAGAGCCTGGGAGGATA-3', 5'-TCACTGATCCCAGGGTAGCT-3'); *CBS* (5'-CTCCGGGAGAAGGGTTTTGA-3', 5'-CATGTTCCCGAGAGTCACCAT-3'), референтного гену β -актину (5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3', 5'-TATCGTCATCCATGGCGAACT-3'), 5 Од/мкл SynTaq ДНК-полімерази, до суміші додавали 5 мкл зразку кДНК. Режим ампліфікації: 94°C 3 хв; 40 циклів: 94°C 15 с; 64°C 40 хв. Для аналізу даних застосовували відносний Ct метод з розрахунком за формулою $2^{-\Delta Ct}$.

Статистичну обробку первинного матеріалу проводили в пакеті MS Excel, IBM Statistics SPSS 26 for Windows. Розраховували середнє значення (M), похибку середнього (m). Статистичну значущість відмінностей оцінювали в тесті Краскала-Уолліса, зв'язок показників – за коефіцієнтом кореляції Спірмана (r_s). Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$. Результати наведено як $M \pm m$.

Результати дослідження та їх обговорення. Застосування ВКД упродовж 10 тижнів викликало розвиток ожиріння у тварин всіх дослідних груп, що засвідчувало зростання індексу Лі $\geq 0,31$ (рис. 1). На

70 добу індекс Лі у щурів з ДІО становив $0,341 \pm 0,002$ проти $0,293 \pm 0,002$ в контролі ($p < 0,001$). Двотижневе введення коректорів не поглиблювало змін індексу Лі, а в групі ДІО+ЛК зміни виявились менш виразними (індекс Лі – $0,326 \pm 0,003$, $p = 0,05$ відносно групи ДІО).

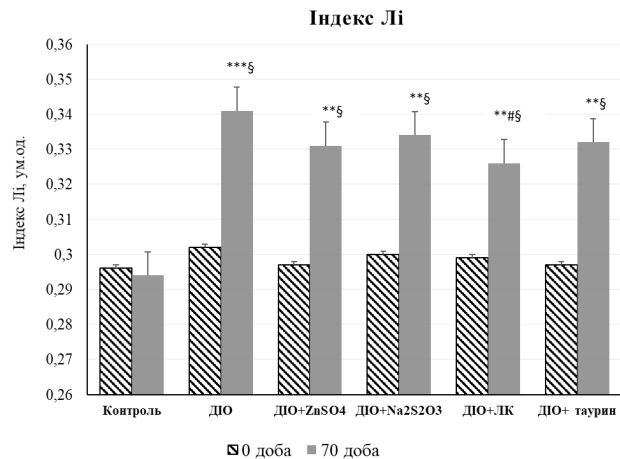


Рисунок 1 – Індекс Лі у щурів з ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою (ДІО), та за дії модулаторів обміну Н₂S ($M \pm m$, $n=10$).

Примітки: 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – відносно групи контролю; 2. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ – відносно групи ДІО (без корекції); 3. § – $p < 0,001$ між початковим (0 доба) та фінальним індексом Лі (70 доба) в групі.

Застосування ВКД ініціювало розвиток ренальної дисфункції у дослідних щурів, про що свідчить підвищення в сироватці крові цистатину С – раннього маркера ураження клубочкового апарату нирок (рис. 2). Зокрема, в групі ДІО рівень цистатину С в сироватці крові був вищим на 198 % ($p < 0,001$), ніж в контролі. Введення усіх метаболічних коректорів стримувало індуковане ВКД погіршення функціонального стану нирок: рівень цистатину С в групах ДІО+ZnSO₄, ДІО+Na₂S₂O₃, ДІО+ЛК та ДІО+таурин був нижчим на 33,1; 41,8; 36,3 та 31,1 % ($p < 0,01$), ніж в групі ДІО.

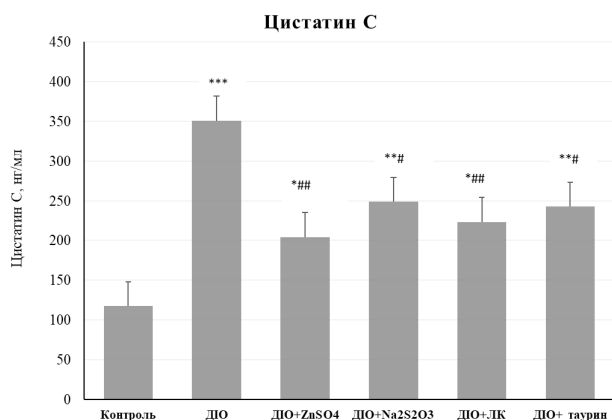


Рисунок 2 – Рівень цистатину С в сироватці крові у щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) та за дії модулаторів обміну Н₂S ($M \pm m$, $n=10$).

Примітки: 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – відносно групи контролю; 2. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ – відносно групи ДІО (без корекції).

Розвиток ожиріння на тлі ВКД супроводжувався зниженням експресії H_2S -синтезуючих ензимів в нирках щурів (рис. 3). Станом на 70 добу в групі ДІО відносний рівень мРНК *CSE* / β -актин був нижчим на 59,7 % ($p<0,001$), а мРНК *CBS* / β -актин нижчим на 54,2 % ($p<0,001$), ніж в групі контролю. Цинк сульфат та ліпоєва кислота підвищували експресію *CSE* та *CBS* в нирках щурів з ДІО, в у той час як тіосульфат і таурин такого ефекту не викликали. Зокрема, рівень мРНК *CSE* / β -актин та мРНК *CBS* / β -актин в групі ДІО+ $ZnSO_4$ був вищим на 51,9 та 68,4 % ($p<0,05$), а в групі ДІО+ЛК – вищим на 40,7 та 50 % ($p<0,05$), ніж в групі ДІО, відповідно.

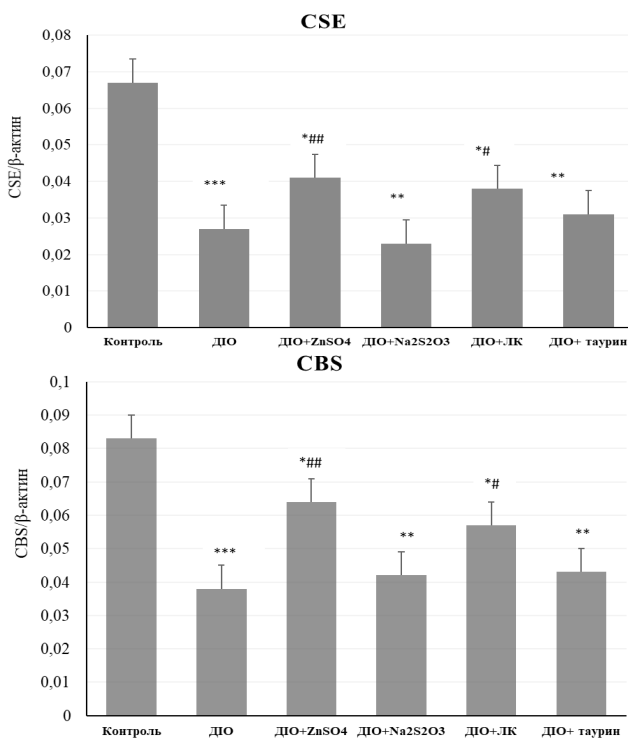


Рисунок 3 – Експресія генів *CSE* та *CBS* в нирках щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) та за дії модулаторів обміну H_2S ($M \pm m$; $n=6$).

Примітки: 1. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ – відносно групи контролю; 2. # $p<0,05$, ## $p<0,01$ – відносно групи ДІО (без корекції).

За умов ВКД в нирках щурів істотно підвищувалась продукція прозапальних і профіброгенних медіаторів – інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF-1) та фактору некрозу пухлин альфа ($TNF\alpha$), а метаболічна корекція стримувала цей процес (рис. 4). Так, в групі ДІО рівень IGF-1 був вищим на 156,1 % ($p<0,001$), а рівень $TNF\alpha$ – вищим 129,3 % ($p<0,001$), ніж в контролі. В групах ДІО+ $ZnSO_4$, ДІО+ $Na_2S_2O_3$, ДІО+ЛК та ДІО+таурин рівень IGF-1 був нижчим на 48,4; 41,4; 42,6 та 33,7 % ($p<0,01$), а рівень $TNF\alpha$ – нижчим на 41,8; 29,1; 36,3 та 30,8 % ($p<0,01$), ніж в групі ДІО, відповідно.

Кореляційний аналіз (табл.) засвідчив статистично значущі обернені зв'язки середньої сили між рівнем експресії генів *CSE* та *CBS* та маркерами ураження нирок, а також індексом Лі. Найбільш силь-

ний зв'язок виявлявся між рівнем експресії *CSE* та рівнем цистатину С і рівнем IGF-1 ($r_s = -0,685$; $-0,595$, $p<0,001$).

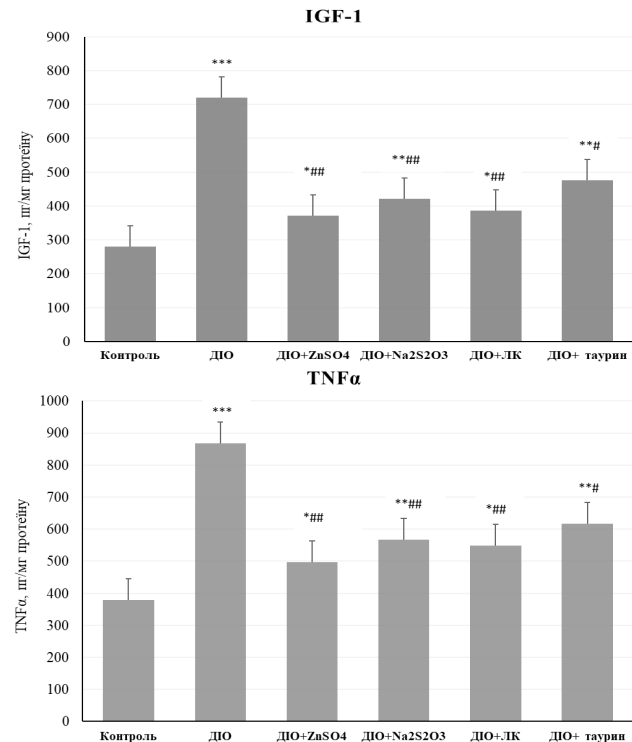


Рисунок 4 – Рівні IGF-1 та $TNF\alpha$ в нирках щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) та за дії модулаторів обміну H_2S ($M \pm m$; $n=10$).

Примітки: 1. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ – відносно групи контролю; 2. # $p<0,05$, ## $p<0,01$ – відносно групи ДІО (без корекції).

Таблиця – Коефіцієнти кореляції між рівнем експресії генів *CBS* та *CSE* та маркерами ураження нирок у щурів з дієт-індукованим ожирінням ($n=35$)

Показник	<i>CBS</i>		<i>CSE</i>	
	r_s	p	r_s	p
IGF-1	-0,528	0,001	-0,595	<0,001
$TNF\alpha$	-0,357	0,035	-0,518	0,001
Цистатин С	-0,574	0,001	-0,685	<0,001
Індекс Лі	-0,559	<0,001	-0,368	0,030

Примітки: r_s – коефіцієнт кореляції Спірмана.

Таким чином, зниження експресії ензимів синтезу H_2S асоціюється з активацією запальних та фібротичних процесів в нирках за ожиріння. Цинк сульфат, ліпоєва кислота, тіосульфат, таурин зменшують біохімічні зміни у нирках, але виявляють різну активність щодо впливу на систему H_2S . Зміни обміну H_2S в нирках, індуковані ожирінням, можуть порушувати загальний гомеостаз, імунний захист, знижувати адаптивні резерви організму [18]. Високожирова дієта індукує в нирках складний комплекс біохімічних порушень – оксидативний стрес, запалення, фіброгенез [19, 20], ектопічну акумуляцію жирів [21], порушення експресії інсулінових рецепторів [22]. Блокування дії IGF-1 зменшує гломеруломегалію, запальну інфільтрацію, тубулоінтерстиціальний фіброз за діабетичний нефропатії у щурів [23]. Тому,

здатність вищевказаних метаболічних коректорів коригувати рівень IGF-1 та TNF α в нирках, поряд із впливом на експресію ензимів обміну H₂S, підтверджує їх високий нефропротекторний потенціал при ожирінні.

Висновки. 1. У щурів з ожирінням, індукованим висококалорійною високожировою дієтою, встановлена асоціація між зниженням експресії генів H₂S-синтезуючих ензимів (CSE, CBS) в нирках та біохімічними маркерами ренальної дисфункції, запалення та фіброгенезу.

2. Цинк сульфат, ліпоева кислота, тіосульфат натрію і таурин стримують розвиток нефропатії у щурів за умов висококалорійної висо-

кожирової дієти: зменшують рівні цистатину С, інсуліноподібного фактору росту 1, фактору некрозу пухлини альфа, не поглиблюють ознак ожиріння. Цинк сульфат та ліпоева кислота сприяють нормалізації рівня експресії генів ензимів транссульфування (CSE, CBS) в нирках щурів з дієт-індукованим ожирінням.

Перспективи подальших досліджень.

Встановлення молекулярних механізмів, через які реалізується вплив модуляторів різних шляхів обміну гідроген сульфід на розвиток нефропатії ожиріння, дозволить встановити нові терапевтичні мішені її профілактики та корекції. Подальше вивчення ролі модуляції обміну H₂S механізмах розвитку ожиріння є перспективним.

Література

- Comas F, Latorre J, Ortega F, Arnoriaga Rodríguez M, Kern M, Lluch A, et al. Activation of endogenous h₂s biosynthesis or supplementation with exogenous H₂S enhances adipose tissue adipogenesis and preserves adipocyte physiology in humans. *Antioxid Redox Signal*. 2021 Aug 10;35(5):319–340. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8206>.
- Comas F, Moreno-Navarrete JM. The impact of H₂S on obesity-associated metabolic disturbances. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Apr 21;10(5):633. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10050633>.
- Wei L, Li Y, Yu Y, Xu M, Chen H, Li L, et al. Obesity-related glomerulopathy: from mechanism to therapeutic target. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021 Oct 28;14:4371–4380. DOI: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S334199>.
- Yang S, Cao C, Deng T, Zhou Z. Obesity-related glomerulopathy: A latent change in obesity requiring more attention. *Kidney Blood Press Res*. 2020 Jun 4;45(4):510–522. DOI: <https://doi.org/10.1159/000507784>.
- Cao X, Bian JS. The role of hydrogen sulfide in renal system. *Front Pharmacol*. 2016 Oct 18;7:385. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00385>.
- Zhang H, Zhao H, Guo N. Protective effect of hydrogen sulfide on the kidney (Review). *Mol Med Rep*. 2021 Oct;24(4):696. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12335>.
- Koniukh S, Voloshchuk N, Melnyk A, Domin I. Hydrogen sulfide metabolism and its role in kidney function in a rat model of chronic kidney disease. *Health Prob Civil*. 2020 Jun 19;14(4):289–297. DOI: <https://doi.org/10.5114/hpc.2020.96571>.
- Ngowi EE, Sarfraz M, Afzal A, Khan NH, Khatkhat S, Zhang X, et al. Roles of hydrogen sulfide donors in common kidney diseases. *Front Pharmacol*. 2020 Nov 19;11:564281. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.564281>.
- Wu D, Gao B, Li M, Yao L, Wang S, Chen M, et al. Hydrogen sulfide mitigates kidney injury in high fat diet-induced obese mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 Jun 19;2016:2715718. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/2715718>.
- Geng B, Cai B, Liao F, Zheng Y, Zeng Q, Fan X, et al. Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. *PLoS One*. 2013 Sep 13;8(9):e73892. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073892>.
- Yang G, Ju Y, 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 Mol Cell Biol Lipids*. 2018 Feb;1863(2):165–176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.008>.
- Khorsandi H, Nikpayam O, Yousefi R, Parandoosh M, Hosseinzadeh N, Saidpour A, et al. Zinc supplementation improves body weight management, inflammatory biomarkers and insulin resistance in individuals with obesity: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Diabetol Metab Syndr*. 2019 Dec 2;11:101. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0497-8>.
- Namazi N, Larijani B, Azadbakht L. Alpha-lipoic acid supplement in obesity treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clin Nutr*. 2018 Apr;37(2):419–428. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.06.002>.
- Kim KS, Jang MJ, Fang S, Yoon SG, Kim IY, Seong JK, et al. Anti-obesity effect of taurine through inhibition of adipogenesis in white fat tissue but not in brown fat tissue in a high-fat diet-induced obese mouse model. *Amino Acids*. 2019 Feb;51(2):245–254. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2659-7>.
- Hsu CN, Hou CY, Chang-Chien GP, Lin S, Yang HW, Tain YL. Sodium thiosulfate improves hypertension in rats with adenine-induced chronic kidney disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 11;11(1):147. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11010147>.
- Konopelniuk VV, Goloborodko II, Ishchuk TV, Synelnyk TB, Ostapchenko LI, Spivak MY, et al. Efficacy of Fenugreek-based bionanocomposite on renal dysfunction and endogenous intoxication in high-calorie diet-induced obesity rat model-comparative study. *EPMA J*. 2017 Jun 16;8(4):377–390. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13167-017-0098-2>.
- Huang P, Shen Z, Yu W, Huang Y, Tang C, Du J, et al. Hydrogen sulfide inhibits high-salt diet-induced myocardial oxidative stress and myocardial hypertrophy in Dahl rats. *Frontiers in pharmacology*. 2017 Mar 16;8:128. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00128>.
- Sharma I, Liao Y, Zheng X, Kanwar YS. New pandemic: obesity and associated nephropathy. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jun 29;8:673556. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.673556>.
- Niu H, Li Y, Li H, Chi Y, Zhuang M, Zhang T, et al. Matrix metalloproteinase 12 modulates high-fat-diet induced glomerular fibrogenesis and inflammation in a mouse model of obesity. *Sci Rep*. 2016 Jan 29;6:20171. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep20171>.
- Rangel Silveiras R, Nunes Goulart da Silva Pereira E, Eduardo Ilaquita Flores E, Lino Rodrigues K, Ribeiro Silva A, Gonçalves-de-Albuquerque CF, et al. High-fat diet-induced kidney alterations in rats with metabolic syndrome: endothelial dysfunction and decreased antioxidant defense. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019 Sep 6;12:1773–1781. DOI: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S211253>.
- Liu S, Da J, Yu J, Dong R, Yuan J, Yu F, et al. Renal tubule ectopic lipid deposition in diabetic kidney disease rat model and in vitro mechanism of leptin intervention. *J Physiol Biochem*. 2022 Feb 22. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00874-9>.

22. Lee HJ, Mariappan MM, Norton L, Bakewell T, Feliars D, Oh SB, et al. Proximal tubular epithelial insulin receptor mediates high-fat diet-induced kidney injury. *JCI Insight*. 2021 Feb 8;6(3): e143619. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.143619>.
23. Dong R, Yu J, Yu F, Yang S, Qian Q, Zha Y. IGF-1/IGF-1R blockade ameliorates diabetic kidney disease through normalizing Snail1 expression in a mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 Oct 1;317(4): E 686-E 698. DOI: 10.1152/ajpendo.00071.2019.

ВПЛИВ ЦИНК СУЛЬФАТУ, ТІОСУЛЬФАТУ НАТРІЮ, ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ, ТАУРИНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ЕНЗИМІВ СИНТЕЗУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ, МЕДІАТОРИ ЗАПАЛЕННЯ, ФІБРОГЕНЕЗУ В НИРКАХ ЩУРІВ З ДІЄТ-ІНДУКОВАНИМ ОЖИРІННЯМ

Блажченко В.В., Заїчко Н.В.

Резюме. *Вступ.* Роль гідроген сульфід (H_2S) у патохімії ожиріння та його ускладнень залишається предметом активних досліджень біології та медицини. Нирки є одним із ключових органів-мішеней, які страждають при ожирінні. H_2S фізіологічно синтезується в нирках, і бере участь в регуляції усіх ниркових функцій, ліпідного обміну та адипогенезу. Пошук коректорів обміну H_2S , які б забезпечували нефропротекцію при ожирінні, не активували ліпогенез та адипогенез, є актуальним.

Мета: встановити вплив цинк сульфату, тіосульфату натрію, ліпоєвої кислоти, таурину на експресію ензимів синтезу гідроген сульфід, медіатори запалення, фіброгенезу в нирках щурів з дієт-індукованим ожирінням.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведені на 60 білих лабораторних щурах-самцях з дотриманням принципів біоетики (Страсбург, 1986). Ожиріння викликали висококалорійною високожировою дієтою (4,33 ккал/г, 39,5 % жирів) упродовж 70 днів. Контрольні щури отримували стандартний корм (2,71 ккал/г, 10,8 % жирів). Метаболічні коректори (цинк сульфат, тіосульфат натрію, ліпоєву кислоту, таурин) вводили в/шл з 56-ої по 70-у добу. В крові визначали рівень цистатину С, в нирках – експресію генів H_2S -синтезуючих ензимів (CSE, CBS), рівні IGF1 та TNF α . Статистичну обробку проводили в пакеті IBM Statistics SPSS 26.

Результати. У щурів з ожирінням виявлялось збільшення рівня цистатину С в сироватці крові, зниження рівня експресії генів CSE, CBS, підвищення рівнів медіаторів запалення та фіброгенезу (IGF1, TNF α). Виявлені обернені асоціації між рівнем експресії генів H_2S -синтезуючих ензимів в нирках та біохімічними маркерами ураження нирок. Цинк сульфат (124 мг/кг), тіосульфат натрію (300 мг/кг), ліпоєва кислота (100 мг/кг), таурин (100 мг/кг) зменшували рівні цистатину С, IGF1 та TNF α у щурів з ожирінням. Цинк сульфат та ліпоєва кислота підвищували рівень експресії генів CSE, CBS в нирках щурів з ожирінням, тіосульфат і таурин не викликали такого ефекту. Введення жодного з коректорів не поглиблювало ознаки ожиріння.

Висновки. Зниження експресії ензимів синтезу H_2S асоціюється з активацією запальних та фібротичних процесів в нирках за ожиріння. Цинк сульфат, ліпоєва кислота, тіосульфат, таурин зменшують біохімічні зміни у нирках, але виявляють різну активність щодо впливу на експресію ензимів обміну H_2S .

Ключові слова: гідроген сульфід, ожиріння, нирки, запалення, фіброз.

THE EFFECT OF ZINC SULFATE, SODIUM THIOSULFATE, LIPOIC ACID, TAURINE ON THE EXPRESSION OF ENZYMES OF HYDROGEN SULFIDE SYNTHESIS, MEDIATORS OF INFLAMMATION, FIBROGENESIS IN THE KIDNEYS OF RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY

Blazhchenko V.V., Zaichko N.V.

Abstract. *Introduction.* The role of hydrogen sulfide (H_2S) in the pathochemistry of obesity and its complications remains the subject of active research in biology and medicine. The kidneys are one of the key target organs that suffer from obesity. Physiologically, H_2S is synthesized in the kidneys, and is involved in the regulation of all renal functions, lipid metabolism and adipogenesis. The search for correctors of H_2S metabolism, which would provide nephroprotection in obesity, would not activate lipogenesis and adipogenesis, is relevant.

The aim of study: to establish the effect of zinc sulfate, sodium thiosulfate, lipoic acid, taurine on the expression of enzymes of hydrogen sulfide synthesis, mediators of inflammation, fibrogenesis in the kidneys of rats with diet-induced obesity.

Object and methods of research. The experiments were performed on 60 white male laboratory rats in accordance with the principles of bioethics (Strasbourg, 1986). Obesity was simulated by a high-calorie high-fat diet (4.33 kcal/g, 39.5 % fat) for 70 days. Control rats received standard feed (2.71 kcal/g, 10.8 % fat). Metabolic correctors (zinc sulfate, sodium thiosulfate, lipoic acid, taurine) were administered intravenously from the 56th to the 70th day. The level of cystatin C in the blood was determined, the expression of H_2S -synthesizing enzyme genes (CSE, CBS), IGF1 and TNF α levels were determined in the kidneys. Statistical processing was performed in the package IBM Statistics SPSS 26.

Results. In obese rats, increased serum cystatin C levels, decreased levels of CSE and CBS gene expression, increased levels of inflammatory and fibrogenesis mediators (IGF1, TNF α) were found. Inverse associations between the level of gene expression of H_2S -synthesizing enzymes in the kidneys and biochemical markers of kidney damage have been identified. Zinc sulfate (124 mg/kg), sodium thiosulfate (300 mg/kg), lipoic acid (100 mg / kg), and taurine (100 mg/g) decreased cystatin C, IGF1, and TNF α levels in obese rats. Zinc sulfate and lipoic acid increased the expression of CSE, CBS genes in the kidneys of obese rats, thiosulfate and taurine did not cause this effect. The introduction of any of the correctors did not aggravate the signs of obesity.

Conclusions: Decreased expression of H₂S synthesis enzymes is associated with activation of inflammatory and fibrotic processes in the kidneys under obesity. Zinc sulfate, lipoic acid, thiosulfate, taurine reduce biochemical changes in the kidneys, but show different activity in influencing the expression of H₂S metabolic enzymes.

Key words: hydrogen sulfide, obesity, kidney, inflammation, fibrosis.

ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Blazhchenko V.V.: 0000–0001–5448–124X ^{ABCD}

Zaichko N.V.: 0000–0003–1889–6151 ^{EF}

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів

Адреса для кореспонденції

Блажченко Віталій Вікторович

Вінницький національний університет ім. М.І. Пирогова

Адреса: Україна, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова 56

Тел.: +380967242328

E-mail: vitwik@gmail.com

A – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Стаття надійшла 16.11.2021 року
Стаття прийнята до друку 02.05.2022 року