

两栖动物活性多肽在促创伤愈合、抗氧化和抗光损伤的研究进展

张心平, 王思雨, 张颖暄, 罗明英

(昆明医科大学人体解剖与组织胚胎学系, 云南 昆明 650500)

[摘要] 两栖动物的皮肤是它们在地球上各种环境中生存的重要保护器官, 具有呼吸、渗透调节和体温调节等功能。近年来的研究表明, 两栖动物富含多种活性肽, 它们可保护皮肤免受环境和致病性的伤害, 并发挥许多其他生物效应。综述两栖动物活性肽在促创伤愈合、抗氧化和抗光损伤方面的重要作用, 为两栖动物活性肽在人类皮肤中的应用与研究提供新的参考和思路。

[关键词] 两栖动物; 活性肽; 创伤愈合; 氧化应激; 光损伤

[中图分类号] R322.99+1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2021) 1B-0048-05

Amphibian Active Peptides Facilitate Skin Wound Healing, Anti-oxidation and Anti-photodamage

ZHANG Xin-ping, WANG Si-yu, ZHANG Ying-xuan, LUO Ming-ying

(Dept. of Anatomy, Histology and Embryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] Amphibian skin, with functions of respiration, osmotic regulation and body temperature regulation, is an important protective organ for their survival in various environments on earth. Recent studies have shown that the skin secretions of amphibians are rich in a variety of active peptides, which can protect the skin from environmental and pathogenic damage and exert many other biological effects. This article reviews the important role of amphibian active peptides in promoting wound healing, anti-oxidation and photo-damage resistance ability, and provides new approaches and directions for the application and research of amphibian active peptides in human skin.

[Key words] Amphibian; Active peptide; Wound healing; Oxidative stress; Photodamage

皮肤是人体和外界环境之间的物理屏障, 承担着诸多重要的生理功能, 包括排汗、热感、痛觉等, 此外皮肤保护着体内各种组织和器官, 是最容易受损的器官。物理性、机械性、化学性和病原微生物性等因素均能造成皮肤破损, 其中创伤和光损伤是日常生活中较为常见的物理损伤。多肽类药物自上世纪 70 年代赖氨加压素上市以来, 到目前为

止已经取得了很大的发展, 一些多肽类药物已经成为患者的最佳选择并且已经取得商业上的成功, 如醋酸格拉替雷、艾赛那肽等, 而且进入临床的多肽类药物数量正逐年增加。目前国内外已经开展了大量的活性多肽挖掘工作, 其中许多活性多肽已经得以报道, 比如抗菌肽、镇痛肽、抗癌多肽等^[1-8]。

[收稿日期] 2020-11-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81760648)

[作者简介] 张心平 (1995~), 女, 辽宁海城人, 在读硕士研究生, 主要从事两栖动物活性多肽与皮肤光损伤的研究工作。

[通信作者] 罗明英, E-mail: luomingying0403@163.com

1 两栖动物活性肽的分类

两栖动物活性肽主要由它们的皮肤腺体分泌产生^[1]。包括粘液腺和颗粒腺, 其中, 粘液腺产生大量糖基化粘蛋白和粘多糖, 通过保持皮肤湿度来抵消水分流失^[2]。而颗粒腺则通过分泌各种有毒化合物, 来抵御捕食者。此外, 它们还产生一系列蛋白质和肽, 例如免疫球蛋白、溶菌酶、神经肽和皮肤肽等^[3-5]。

每一种两栖动物都会产生一组具有明确序列的活性肽, 目前已有超过 2 000 种两栖动物皮肤中的活性肽被鉴定出来, 它们除了具有抗菌活性外, 还具有其他生物效应, 根据其功能可分为: 肌张力肽、阿片肽、促肾上腺皮质激素释放肽、血管紧张素、蛋白酶抑制剂肽、神经肽, 抗氧化肽、凝集素、胰岛素释放肽、肥大细胞降解 / 组胺释放肽、促进伤口愈合肽、免疫调节肽、神经元型一氧化氮合酶抑制剂、抗菌肽、抗病毒肽、抗肿瘤肽、抗寄生虫肽、信息素肽、谷氨酰胺, 以及其他肽^[6-8]。

2 两栖动物活性肽的促创伤愈合作用

机体创伤愈合是一个保守进化的过程, 它需要许多不同类型的细胞协调合作。一般来说, 哺乳动物的创伤愈合包括四个阶段: 止血、炎症、增殖和组织重建^[9-10]。伤口产生后首先进入机体的自我止血阶段, 血小板粘附在受损的血管壁上, 并通过激活凝血因子触发凝血, 血块形成后, 在 24 h 内, 炎症阶段开始, 吞噬中性粒细胞和巨噬细胞进入血栓。巨噬细胞分泌的趋化因子会促进血管生成、基质沉积、再上皮化和成纤维细胞迁移。其中, 成纤维细胞和内皮细胞的迁移和增殖导致肉芽组织的产生形成再上皮化。同时, 随着基质沉积, 成纤维细胞逐渐富集然后转化为肌成纤维细胞, 最后, 肉芽组织逐渐转变为瘢痕组织^[11-12]。

与哺乳动物不同的是, 两栖动物的创伤愈合速度相对较快且其不通过瘢痕的方式愈合, 在两栖动物中, 皮肤的损伤会在几秒钟内引发止血, 表皮细胞通过伪足迁移促进伤口闭合, 一般时间不超过 1 d^[12-13]。随后, 一些含有转录因子 (Prx1) 和 T 盒转录因子 5 (Tbx5) (肢体再生细胞标记物) 的高增殖单核细胞会在 4 d 内急剧增多, 这提示两栖动物皮肤非瘢痕修复的机制可能与转录因

子 (Prx1) 和 T 盒转录因子 5 (Tbx5) 的激活相关^[14-15]。

2.1 臭蛙属来源的两栖动物活性肽

臭蛙属来源的两栖动物活性肽是目前研究最广泛的促创伤愈合多肽家族。其中, 最典型的就是从无指盘臭蛙中分离出来的多肽 AH90 (ATAWDFGPHGLLPPIRIRPLCG), AH90 能促进人角质形成细胞 (human keratinocyte, HaCaT) 的体外迁移, 从而促进浅表创面愈合。即使是在 Balb/c 小鼠上局部应用 AH90, 也可通过皮肤再生和肉芽组织形成显著加速伤口愈合, 导致表皮厚度变薄。这可能是由于 AH90 可通过促成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化来诱导肉芽组织收缩 (这是伤口愈合过程和基质重塑的关键步骤)。此外, AH90 还能通过上调整合素的表达以增加细胞对纤维结合蛋白和层粘连蛋白的粘附。研究表明, AH90 治疗 7 d 后, 伤口边缘、肉芽组织和血管壁平滑肌肌动蛋白 (smooth muscle actin, SMA) 水平显著升高 (SMA 是肌成纤维细胞分化的标志物)。有报道^[16] AH90 可通过激活 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和核因子 κ B 蛋白 (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路诱导转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β , TGF- β 1) 的分泌, 从而引起 Smad3 的磷酸化促进 SMA 表达增加, 在肌成纤维细胞分化中起主要作用。此外, 有报道^[17] 从无指盘臭蛙中分离出来的另一种多肽 CW49 (APFRMGICTTN) 对糖尿病小鼠的伤口有很强的促血管生成能力 (血管生成是正常伤口愈合的关键过程), 在糖尿病伤口中, 血管生成经常受损, 因此严重限制了伤口的闭合, CW49 可显著减少伤口中浸润的巨噬细胞数量, 这种效果可能不利于正常伤口的愈合过程, 但对糖尿病小鼠的创伤愈合具有重要意义。

除了无指盘臭蛙, 在云南臭蛙中发现了多肽 Cathelicidin-OA1 (IGRDPTWSHLAASCLKICFDDL PKTHN), 它是从两栖动物中鉴定出的第一个在体内外都显示出强大创伤愈合能力的活性肽。在体外培养中发现这种肽可促进 HaCaT 细胞增殖和人皮肤成纤维细胞 (human skin fibroblast, HSF) 细胞迁移。在深部皮肤创伤的小鼠模型中, Cathelicidin-OA1 通过增强巨噬细胞在伤口部位的募集来加速再上皮化和肉芽组织的形成, 其效果可与表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 的作用相当^[18]。在绿臭蛙中发现的多肽 OM-LV20, 可显著加速小鼠皮肤伤口愈合, 其作用机制主要通过

细胞迁移、细胞粘附和成纤维细胞到肌成纤维细胞的转变从而刺激人类皮肤成纤维细胞 (HSF) 的创伤愈合^[19]。

2.2 林蛙属来源的两栖动物活性肽

Temporins A 和 B (FLPLIGRVLGIL; LLPIVGNLLKSL) 是从欧洲林蛙中分离得到的两种促进创伤愈合的多肽。Temporins A 和 B 都能直接或间接地刺激细胞表面表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 并激活下游信号通路, 从而诱导 HaCaT 细胞迁移。此外, 这些肽在对抗皮肤感染方面也很有效, 比如金黄色葡萄球菌引起的皮肤感染^[20]。而从中国林蛙也分离得到的酸溶性和胃蛋白酶溶性肽混合物 (ARP 和 ERP), 其可通过减少细胞内 Caspase-3 蛋白的表达显著抑制 HaCat 凋亡, 且在相同浓度下 ERP 比 ARP 具有更大的生物活性^[21]。

2.3 其它蛙属来源的两栖动物活性肽

从南美树蛙中提取的皮肤降钙素基因相关肽 pbCGRP (SCDTSTCATQRLADFLSRSGGIGSPDFVP TDVSANSF) 与人皮肤降钙素基因相关肽 (hCGRP) 同源。hCGRP 的 C 端片段 h α CGRP8-37 在 CGRP-1 受体处起竞争性拮抗作用, 作为 CGRP-1 受体的拮抗剂是一种有效的神经肽。在人类, hCGRP 可以影响多种皮肤细胞的增殖, 如内皮细胞、施旺细胞和上皮细胞等, 与 hCGRP 相比, pbCGRP 与 CGRP-1 受体具有更高的拮抗效力和亲和力, 因此, pbCGRP 可以通过与 CGRP-1 受体结合来发挥创伤愈合的特性^[22]。另外, 从大蹼铃蟾发现了一种新的双结构域蛋白 Bm-TFF2 (GFPIYEIDNRPG-CYVDPAERVACAGAGVTAKAECKAKGCCFISARRN TIWCFKLKESADAWKCAVPMNTRVACAGAVTPA ECKGKGGCCFNSSYYGTVWCFKPQE), 可通过诱导整合素 α IIb 和 β 3 以剂量依赖的方式激活血小板聚集, 同时其在蟾蜍体内可以刺激蟾蜍细胞在体内的迁移, 从而加快创伤愈合过程^[23]。

3 两栖动物活性肽的抗氧化作用

由于两栖动物皮肤功能的复杂性、在水生和陆地环境中保持皮肤完整性的需要以及角质层的脆弱性, 两栖动物比其他脊椎动物更需要有效地保护皮肤免受氧化应激。因此, 两栖动物已经发展出一个多方面、有效的抗氧化系统^[24]。在非酶抗氧化剂中, 皮肤肽是最具代表性的, 它们的抗氧化活性与其氨基酸组成、排列和二级结构有关。

一级结构中还原性半胱氨酸的存在有力地支持了它们的抗氧化活性, 因为半胱氨酸中的还原巯基 (-SH) 相对于其他氨基酸 (如酪氨酸、色氨酸、蛋氨酸或脯氨酸) 具有更强的抗氧化活性^[25]。值得注意的是, 两栖动物皮肤源性肽的活性通常是重叠的, 因此, 具有强大创伤愈合能力的肽也具有较弱的抗氧化活性, 例如 OM-LV20 和 Cathelicidin-OA1。

研究表明, 从滇蛙中提取的十种蛋白 (Pleurain-A1、D1、E1、G1、J1、K1、M1、N1、P1、R1) 都具有抗氧化活性, 其中一些还具有抗菌和抗炎特性^[26]。有趣的是, 所有这些蛋白都有相似的前体结构, 此外, 它们的前体与两栖动物的皮肤肽前体相似, 且具有相似的整体结构, 由一个 N 端肽、一个酸性间隔肽和一个 C 端成熟肽组成。这些抗氧化肽含有脯氨酸残基, 提示脯氨酸也可能具有重要的抗氧化活性。此外, 在这些蛋白中, Pleurain-E1、Pleurain-N1 和 Pleurain-R1 还具有较强的自由基清除能力。此外, 由滇蛙分泌的 Antioxidin-RP1 (AMRLTYNKPCLYGT) 和 Antioxidin-RP2 (SMRLTYNKPCLYGT) 也具有一定的抗氧化作用, 这两者都含有脯氨酸残基, 但 Antioxidin-RP1 含有更多的抗氧化氨基酸, 因此它是滇蛙体内分泌的最有效的抗氧化肽, 此外, Antioxidin-RP1 还具有两个不同抗氧化能力的酪氨酸残基 (Tyr6 和 Tyr12), 这表明, 不仅残基的化学性质, 而且它们的位置赋予肽不同的抗氧化能力^[26-27]。

另一方面, 抗氧化肽的产生可能与长期暴露的强紫外线以及与天气有关^[8, 26]。对三种蛙种: 戴云湍蛙、湖北侧褶蛙和倭蛙的比较表明, 从生活在最高环境 (海拔 3 800 m 处) 倭蛙中分离出的肽 Pleskein-2 (FLLPIPNDVKCKVLGICKS) 抗氧化能力最弱, 而生活在海拔 50 m 处的戴云湍蛙中分离出来的肽 Ranacyclin-HB1 (GAPKGCWTKSYP-PQPCFGKK) 具有最强的抗氧化活性。这可能是由于与环境因素造成的, 考虑到其栖息地的极端海拔高度, 倭蛙在夏季只会短时间暴露在阳光下, 而在戴云湍蛙全年都能活动, 阳光照射时间更长^[28]。

4 两栖动物活性肽的抗光损伤作用

紫外线有三种类型: UVA (315 ~ 400 nm)、UVB (280 ~ 315 nm) 和 UVC (200 ~ 280 nm)。UVA 辐射占到达地球表面的总紫外线辐射的 95% 以

上。UVA 辐射可导致活性氧的产生, 从而引发皮肤和其他组织损伤^[29]。在过去的几十年中, 由于平流层臭氧层的损耗, UVB 辐射增加了。UVB 辐射可以杀死两栖动物的胚胎或引起亚致死效应, 从而伤害两栖动物的晚年生活^[30]。对抗紫外线辐射副作用的方法包括行为、生理和分子防御。因此, 即使在同一属的物种中也能观察到皮肤肽成分和复杂性的显著差异, 这可能反映出它们对不同紫外线辐射环境的适应能力。

先前研究报道: 云南臭蛙与务川臭蛙的比较, 云南臭蛙生活在海拔 2 500 m 的环境中, 暴露在强烈的紫外线辐射下, 而务川臭蛙分布在少数洞穴中 (海拔 800 m), 在整个生命周期中不暴露在阳光下。把两种蛙暴露在紫外线照射下, 务川臭蛙皮肤出现组织损伤, 这说明两者皮肤分泌物的数量和氨基酸组成存在差异。与务川臭蛙相比, 云南臭蛙的皮肤分泌物具有更强的抗氧化能力: 从两个物种中分别分离出 42 个和 5 个具有抗氧化特性的肽, 其中, Andersonin-AOP1 (FLPGLECV) 和 wuchanin-AOP5 (TVWGFPSKPPSGYR) 分别是两者分泌最强的抗氧化剂, 但 Andersonin-AOP1 的抗氧化能力更是 wuchanin-AOP5 的 20 倍。因此, 在高紫外线辐射下的蛙类可能会分泌更多更有效的抗光损伤的多肽类物质。

5 小结

皮肤作为两栖动物在环境挑战中生存的第一道防线, 起着与呼吸、渗透调节和体温调节有关的多种功能。两栖动物的皮肤肽在维持皮肤完整性和功能性方面起着重要作用, 这对于这些动物抵抗持续不断的物理、化学和生物威胁非常重要。虽然皮肤肽的保护作用的机制还远未阐明, 但值得注意的是, 大多数这些分子都表现出抗氧化特性, 特别是含有半胱氨酸还原巯基 (-SH) 的一级结构的多肽。

众所周知, 氧化应激与炎症有关, 因为线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的过度生成促进促炎性细胞因子的合成。因此, 精确的半胱氨酸位置也可以触发其他细胞事件, 而不仅仅是氧化应激保护, 这体现在部分抗氧化同时具有抗炎作用。因此, 皮肤肽的抗氧化和抗炎作用是保护生活在强紫外线环境中的两栖类动物皮肤的主要防御机制。此外, 抗氧化的皮肤肽还可以加速创伤愈合的过程, 这在两栖动物中是重叠高效

的。除了基因组编码的肽, 其他分子也能对两栖动物的皮肤产生有益的影响。在有机化合物中, 三甲胺 N-氧化物 (trimethylamine N-oxide, TMAO) 存在于两栖动物的皮肤中, 与其他无机渗透剂一起充当渗透剂^[31]。TMAO 也可作为抗氧化剂, 与抗氧化肽一起有助于维持氧化内稳态^[32]。另一方面, 无机化合物硫化氢存在于两栖动物的血流中, 它可以通过促进血管生成对心血管系统产生有益影响, 从而最终有利于创伤愈合的过程, 这些可以考虑作为皮肤创伤愈合多肽的协同剂一起使用^[33]。

总而言之, 来自两栖动物活性肽的多样性可能与其生存环境的温度、紫外线强度、海拔高度、和多肽的类型等多种因素息息相关, 且目前对于这类多肽发挥作用的具体机制还尚不完全清楚, 不过两栖动物活性肽在促进创伤愈合、抗氧化、以及抗光损伤方面的重要意义, 为其以后在人类皮肤的探索和应用方向提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Inger R F, Szarski H, Kollros J J, et al. Biology of amphibians[J]. Science (New York, NY), 1986, 232(2):271.
- [2] Schumacher U, Adam E, Hauser F, et al. Molecular anatomy of a skin gland: Histochemical and biochemical investigations on the mucous glands of *Xenopus laevis*[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry Official Journal of the Histochemistry Society, 1994, 42(1):57.
- [3] Ramsey J P, Reinert L K, Harper L K, et al. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the south african clawed frog, *xenopus laevis* [J]. Infection & Immunity, 2010, 78(9):3981-3992.
- [4] Rollins-Smith L A, Conlon J M. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2005, 29(7):589-598.
- [5] Rollins-Smith L A, Ramsey J P, Pask J D, et al. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: Impacts of changing environments [J]. Integrative & Comparative Biology, 2011, 51(4):552-562.
- [6] Bevins C L, Zasloff M. Peptides from frog skin[J]. Ann Rev Biochem, 1990, 59(1):395.
- [7] Laux-Biehlmann A, Mouheiche J, V é r i è p e J, et al. Endogenous morphine and its metabolites in mammals: History, synthesis, localization and perspectives[J]. Neuroence, 2013, 233:95-117.

- [8] You D, Hong J, Rong M, et al. The first gene-encoded amphibian neurotoxin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(33):22079–22086.
- [9] Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko M S, et al. Growth factors and cytokines in wound healing [J]. *Wound Repair & Regeneration*, 2010, 16(5):585–601.
- [10] Sabine W, Richard G. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines [J]. *Physiological Reviews*, 2003, 83(3):835–870.
- [11] Kawasumi A, Sagawa N, Hayashi S, et al. Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals [J]. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 2013, 367:33–49.
- [12] Murawala P, Tanaka E M, Currie J D. Regeneration: The ultimate example of wound healing [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2012, 23(9):954–962.
- [13] L é vesque M, Villiard é , Roy S. Skin wound healing in axolotls: a scarless process [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2010, 314B(8):684–697.
- [14] Satoh A, Graham G M C, Bryant S V, et al. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) [J]. *Developmental Biology*, 2008, 319 (2): 321–335.
- [15] Yokoyama H, Maruoka T, Aruga A, et al. Prx-1 expression in *Xenopus laevis* scarless skin-wound healing and its resemblance to epimorphic regeneration [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2011, 131(12):2477–2485.
- [16] La H E, Ma L E, Ta J E, et al. A potential wound healing-promoting peptide from frog skin [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 49 (1): 32–41.
- [17] Han L, Zilei D, Jing T, et al. A short peptide from frog skin accelerates diabetic wound healing [J]. *Febs Journal*, 2015, 281(281):4633–4643.
- [18] Bian W, Meng B, Li X, et al. OA-GL21, A novel bioactive peptide from *Odorrana andersonii*, accelerated the healing of skin wounds [J]. *Bioence Reports*, 2018, 38 (3): 20180215.
- [19] Li X, Wang Y, Zou Z, et al. OM-LV20, a novel peptide from odorous frog skin, accelerates wound healing in vitro and in vivo [J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2018, 91 (1): 126–136.
- [20] Di Grazia A, Luca V, Segev-Zarko LAT, et al. Temporins A and B stimulate migration of HaCaT keratinocytes and kill intracellular *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(5):2520–2527.
- [21] Xin, Zhang, Yunyun, et al. Polypeptides from the skin of *Rana chensinensis* exert the antioxidant and antiapoptotic activities on HaCaT cells [J]. *Animal Biotechnology*, 2016, 28(1):1–10.
- [22] Ladram A, Besn é I, Breton L, et al. Pharmacologic study of C-terminal fragments of frog skin calcitonin gene-related peptide [J]. *Peptides*, 2008, 29(7):1150–1156.
- [23] Zhang Y, Yu G, Xiang Y, et al. Bm-TFF2, a toad trefoil factor, promotes cell migration, survival and wound healing [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2010, 398(3):559–564.
- [24] Baek J, Lee M G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology [J]. *Redox Report*, 2016, 21(4):164–169.
- [25] Naijin X, Guanqun C, Hui L. Antioxidative categorization of twenty amino acids based on experimental evaluation [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22(12):2066.
- [26] Yang H, Wang X, Liu X, et al. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, 8(3):571–583.
- [27] Keely S H, Frank P, Maarten D, et al. Skin mucosome activity as an indicator of *Batrachochytrium salamandrivorans* susceptibility in salamanders [J]. *PloS One*, 2018, 13(7): 0199295.
- [28] Wang X, Wang H, Ren S, et al. Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four east asian frog species [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2017, 49(6):550–559.
- [29] Lopez-Torres M, Shindo Y, Packer L. Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1994, 102(4):476.
- [30] Blaustein A R, Belden L K. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation [J]. *Evolution & Development*, 2010, 5 (6):89–97.
- [31] Withers P C, Guppy M. Do Australian desert frogs co-accumulate counteracting solutes with urea during aestivation [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1996, 199(8):1809.
- [32] Ufnal M, Zadło A, Ostaszewski R. TMAO: A small molecule of great expectations [J]. *Nutrition*, 2015, 31 (11–12): 1317–1323.
- [33] Tomasova L, Konopelski P, Ufnal M. Gut bacteria and hydrogen sulfide: the new old players in circulatory system homeostasis [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2016, 21 (11):1558.