

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М. І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОНЮХ Сергій Анатолійович

УДК 547.56:546.221.1:611.61

ДИСЕРТАЦІЯ

**НЕФРОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ РОСЛИННИХ
ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПЛУК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ
ХРОНІЧНІЙ ХВОРОБИ НИРОК ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК З МЕТАБОЛІЗМОМ
ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ**

222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі
«Охорона здоров'я»

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело


_____ С.А. Конюх

Науковий керівник: Волощук Наталія Іванівна, доктор медичних наук,
професор

Вінниця – 2021

АНОТАЦІЯ

Конюх С. А. Нефропротекторні властивості рослинних поліфенольних сполук при експериментальній хронічній хворобі нирок та їх зв'язок з метаболізмом гідроген сульфїду. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 – «Медицина». - Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, 2020.

Дослідження присвячено експериментальному обґрунтуванню ефективності використання нових підходів до фармакотерапії хронічної хвороби нирок шляхом встановлення ролі порушень обміну гідроген сульфїду в патогенезі хронічної хвороби нирок та можливості їх корекції препаратами рослинних поліфенольних сполук.

Експериментальне ураження нирок щурів відтворювали хірургічним шляхом (тотальна резекція лівої нирки з субтотальною (5/6) нефректомією контрлатеральної нирки). Визначали нефропротекторну дію кверцетину, ресвератролу та генїстеїну, які вводили внутрішньошлунково починаючи з 1 дня після оперативного втручання.

Вперше показано, що в патогенезі ураження нирок за експериментального хронічного ураження важливу роль відіграють порушення процесів ензиматичного утворення та утилізації H_2S у нирках. Встановлено, що хронічна хвороба нирок (ХХН) у щурів супроводжується зменшенням активності H_2S -продукуючих ферментів (цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ), цистатіонін- β -синтази (ЦБС) та цистеїн амінотрансферази (ЦАТ) на 28,3-34,2 % ($p < 0,05$), зростанням швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках на 34,3 % ($p < 0,05$) та зниженням вмісту H_2S на 35,8 % ($p < 0,05$), відносно контролю. За умов хронічної хвороби нирок відмічається зростання (на 30-70 %, $p < 0,05$) концентрації креатиніну, іонів Na^+ та K^+ в крові, елімінації білка з сечею, а також зменшення (в 1,4-2,1 рази, $p < 0,05$) діурезу, ШКФ, екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею, порівняно з контролем. Ступінь

гломеруло-тубулярних порушень за ХХН мають прямий кореляційний зв'язок з вмістом H_2S у нирках ($r=|0,54-0,85|$, $p < 0,05$).

Отримано нові дані про хворобо-модифікуючі ефекти системи гідроген сульфід у експериментальній ХХН. Введення пропаргілгліцину поглиблює порушення клубочкової фільтрації та тубулярну дисфункцію нирок. В той же час натрію гідрогенсульфід виявляє потужні нефропротекторні властивості за хронічної хвороби нирок: покращує фільтраційну здатність нирок (рівень креатиніну в плазмі був нижчим на 24,2 %, а рівень креатиніну в сечі, ШКФ та діурез - вищим на 21,8-102 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), вірогідно збільшує реабсорбцію води порівняно з нелікованими щурами, елімінацію електролітів з сечею (рівень іонів Na^+ та K^+ в крові був нижчим на 20,1-34,1 %, а в сечі – вищим на 21,7-99,3 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), стан тубулярного апарату (вміст білка був на 24,1 % меншим порівняно з нелікованими тваринами, $p < 0,05$). Досліджено вплив натрію гідрогенсульфід на цитометричні параметри нирок за умов ХХН. Показано, що за ХХН реєструється індукція апоптозу, сповільнення процесів синтезу ДНК та зменшення кількості мітозів у клітинах кіркового шару нирок. Застосування $NaHS$ за ХХН нормалізувало кількість мітозів та активність синтезу ДНК (частка клітин у фазах G_2+M та S вірогідно не відрізнялась від псевдооперованих тварин), а також зменшувало інтенсивність апоптозу клітин кіркового шару нирок (кількість клітин у фазі $SUB-G_0G_1$ була на 34,8 % менша, ніж у нелікованих тварин). Поряд з цим, $NaHS$ зменшував виразність морфологічних порушень у нирках за ХХН: сприяв зменшенню запалення, дегенеративно-дистрофічних змін у нирках, фібропластичних процесів, гемодинамічних розладів та виявляв ендотеліо- та епітеліопротекторну дію. Таким чином, у ході проведених досліджень отримані переконливі докази того, що за умов ХХН донатор H_2S – $NaHS$ виявляє потужні нефропротекторні властивості, які асоціюються з посиленням швидкості клубочкової фільтрації, покращанням процесів реабсорбції води та електролітів, антиоксидантною, антиапоптотичною, протизапальною, антифіброгенною та ендотеліопротекторною діями.

Доповнені наукові дані про нефропротекторні властивості рослинних поліфенольних сполук та вперше встановлено їх здатність модулювати обмін гідроген сульфїду у нирках за умов хронїчного ураження. В дослідженні розкриті нові механїзми захисного впливу рослинних поліфенольних сполук на нирки. Введення кверцетину, ресвератролу та генїстеїну за ХХН виявляє нефропротекторні властивості (ШКФ достовїрно зростає на 49,8-102 %, протеїнурія вїрогідно зменшується на 12,4-22,8 %, $p < 0,05$), причому саме генїстеїн мав найбільш виразний коригувальний вплив на функціональні параметри нирок. Показано, що важлива роль в нефропротекторному потенціалі поліфенольних сполук належить системі H_2S у нирках. Встановлено, що вплив поліфенолів на систему H_2S за ХХН відрїзнявся залежно від обраної сполуки. Так, генїстеїн та ресвератрол збільшували продукцію H_2S за рахунок активації трьох ензиматичних систем ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ (на 12,7-22,5 %, $p < 0,05$), тоді як кверцетин підвищував активність лише ЦБС. Усі досліджувані сполуки, особливо кверцетин, зменшували швидкість утилізації H_2S (на 17,6-20,5 %, $p < 0,05$), а також збільшували вміст H_2S у нирках (на 16,4-30,8 %, $p < 0,05$). Проведені додаткові дослідження засвідчили, що спрямованість впливу генїстеїну, ресвератролу та кверцетину на метаболїзм H_2S у нирках інтактних щурів співпадала з такою за експериментального хронїчного ураження.

Вперше показано, що вплив поліфенолів на стан системи гідроген сульфїду у нирках за ХХН асоціюється зі зменшенням активності вільнорадикального окиснення ліпїдів та протеїнів на тлі відновлення рївноваги в системі про- та антиоксидантів. Так, рослинні нефропротектори, особливо кверцетин, зменшують вміст МДА, КГП та активність НАДФН-оксидази (на 21,0-40,4 %, $p < 0,05$), з одночасним збільшенням активності СОД (на 29,7-38,7 %, $p < 0,05$) у нирках тварин з експериментальним хронїчним ураженням, порівняно з нелїкованим контролем. В групі лікованих тварин між вмістом H_2S та показниками оксидативного стресу виникали достовїрні сильні або значущі зв'язки ($r=|0,65-0,74|$; $p < 0,05$). Поряд з цим генїстеїн та ресвератрол викликали зростання у нирках активності ендотелїальної

ізоформи NO-синтази (на 36,3-44,7 %, $p < 0,05$) та зменшенням активності її індукцибельної ізоформи (на 15,4-20,9 %, $p < 0,05$), відносно показників нелікованих тварин. За цих умов між вмістом H_2S та активністю різних ізоформ NO-синтази реєструвались достовірні сильні зв'язки ($r=|0,70-0,75|$; $p < 0,05$).

За результатами наших досліджень встановлено, що серед досліджуваних поліфенольних сполук саме ізофлавоноїд геністеїн виявляв найбільш потужний захисний потенціал щодо нирок на тлі ХХН. Застосування геністеїну за ХХН нормалізувало кількість мітозів та активність синтезу ДНК (частка клітин у фазах G2+M та S вірогідно не відрізнялась від такої у псевдооперованих тварин), а також зменшувало інтенсивність апоптозу клітин кіркового шару нирок (кількість клітин у фазі SUB-G0G1 була на 16,6 % менша, ніж у нелікованих тварин). Кореляційний аналіз показав, що на тлі лікування між вмістом H_2S у нирках та кількістю клітин в фазі SUB-G0G1 виникають достовірні обернені зв'язки ($r=-0,81$; $p < 0,05$), тоді як з кількістю клітин у фазі S – прямі кореляції ($r=0,78$; $p < 0,05$). Вплив геністеїну на клітинний цикл асоціюється з його здатністю поповнювати запаси H_2S у нирках, про що свідчать результати кореляційного аналізу. Так, на тлі лікування між вмістом H_2S у нирках та кількістю клітин в фазі SUB-G0G1 виникають достовірні обернені зв'язки ($r=-0,81$; $p < 0,05$), тоді як з кількістю клітин у фазі S – прямі кореляції ($r=0,78$; $p < 0,05$). Додаткові докази нефропротекторної дії геністеїну отримані в ході морфологічних досліджень. Показано, що введення цього ізофлавоноїду стримувало розвиток структурних і дегенеративно-дистрофічних змін у нирках та сприяло активації компенсаторно-приспосувальних і регенеративних процесів, викликало нормалізацію гемодинаміки. За величиною нефропротекторної дії геністеїн практично не поступався натрій гідрогенсульфіду.

Ключові слова: хронічна хвороба нирок, гідроген сульфід, цистатіонін- γ -ліаза, цистатіонін- β -синтаза, цистеїн аміотрансфераза, нефропротекторна дія, рослинні поліфеноли, геністеїн, ресвератрол, кверцетин, щури.

ANNOTATION

Koniukh S. A. Nephroprotective properties of plant polyphenol compounds in experimental chronic kidney disease and their relationship with hydrogen sulfide metabolism – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree Doctor of Philosophy in «Health Care» in specialty 222 – “Medicine”. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsia, 2020.

The study is devoted to the experimental substantiation of the effectiveness of new approaches to pharmacotherapy of chronic kidney disease (CKD) by establishing the role of hydrogen sulfide metabolism disorders in the pathogenesis of chronic kidney disease and the possibility of their correction with herbal polyphenolic compounds.

Experimental kidney damage in rats was performed surgically (unilateral nephrectomy + subtotal resection of the contralateral kidney). Quercetin, resveratrol, and genistein, which were administered intragastrically starting from 1 day after surgery, were studied as plant nephroprotectors.

It has been shown for the first time that in the pathogenesis of kidney damage in experimental chronic lesions, an important role was played by violations of the processes of enzymatic formation and utilization of H₂S in the kidneys. It was found that CKD in rats was accompanied by a decrease in the activity of H₂S-producing enzymes (cystathionine gamma-lyase (CSE), cystathionine beta synthase (CBS), and cysteine aminotransferase (CAT) by 28.3 - 34.2% ($p < 0.05$), an increase in the rate of utilization of exogenous H₂S in the kidneys by 34.3% ($p < 0.05$) and a decrease in H₂S content by 35.8% ($p < 0.05$), relative to control. Under conditions of chronic kidney disease, there was an increase (by 30 - 70%, $p < 0.05$) of concentration of creatinine, sodium, and potassium in the blood, elimination of protein in the urine, as well as a decrease (1.4 - 2.1 times, $p < 0.05$) of diuresis, glomerular filtration rate (GFR), urinary sodium, and potassium excretion, compared with control. The degree of glomerulo-tubular disorders in CKD had a direct correlation with the content of H₂S in the kidneys ($r = |0.54 - 0.85|$, $p < 0.05$).

New data on disease-modifying effects of the hydrogen sulfide system in the experimental CKD were obtained. Administration of propargylglycine exacerbated renal filtration dysfunction and tubular dysfunction. At the same time, sodium hydrogen sulfide had powerful nephroprotective properties in chronic kidney disease: improved renal filtration function (plasma creatinine was decreased by 24.2%, and urine creatinine, GFR, and diuresis were by 21.8 – 102 % higher than in untreated animals, $p < 0,05$); water reabsorption processes (water reabsorption rate was probably higher compared to untreated rats); elimination of electrolytes in urine (sodium and potassium levels in the blood were lower by 20.1 - 34.1%, and in the urine, these levels were higher by 21.7 - 99.3% than in untreated animals, $p < 0,05$); the state of the tubular apparatus (protein content was lower (24.1%) compared to untreated animals, $p < 0,05$). The effect of sodium hydrogen sulfide on the cytometric parameters of the kidneys under the conditions of CKD was studied. It was shown that CKD registered induction of apoptosis, slowing down DNA synthesis processes, and reduction of the number of mitoses in the cells of the cortical layer of the kidneys. The use of NaHS in CKD normalized the number of mitoses and DNA synthesis activity (the proportion of cells in the G2 + M and S phases did not differ significantly from pseudo-operated animals), and also reduced the intensity of apoptosis of renal cortex cells (the number of cells in the SUB-G0G1 phase was 34.8% less than in untreated animals). Also, NaHS reduced the severity of morphological disorders in the kidneys for CKD (inflammation, degenerative-dystrophic changes in the kidneys, fibroblastic processes, hemodynamic disorders), and had endothelial and epithelium-protective effects. Thus, in the course of the research, convincing evidence was obtained that under the conditions of CKD donor H₂S - NaHS exhibited potent nephroprotective properties, which were associated with increased renal filtration function, improved reabsorption of water and electrolytes, antioxidant, anti-apoptotic, anti-inflammatory, antifibrogenic and endothelium-protective effects.

Scientific data on the nephroprotective properties of plant polyphenolic compounds had been supplemented and their ability to modulate hydrogen sulfide metabolism in the kidneys under conditions of chronic lesions had been established

for the first time. The study revealed new mechanisms of the protective effect of phytochemicals on the kidneys. The introduction of quercetin, resveratrol, and genistein in CKD showed nephroprotective properties (GFR significantly increased by 49.8 - 102%, proteinuria probably decreased by 12.4 - 22.8%, $p < 0.05$), and it was genistein that had the most pronounced corrective effect on the functional parameters of the kidneys. We had shown that an important role in the nephroprotective potential of polyphenolic compounds belonged to the H₂S system in the kidneys. It was found that the effect of polyphenols on the H₂S system in CKD differed depending on the selected compound. Thus, genistein and resveratrol increased H₂S production by activating the three enzyme systems CSE, CBS, and CAT (by 12.7 - 22.5%, $p < 0.05$), while quercetin increased the activity of CBS. All studied phytochemicals, especially quercetin, reduced the rate of utilization of H₂S (by 17.6 - 20.5%, $p < 0.05$), and increased the content of H₂S in the kidneys (by 16.4 - 30.8%, $p < 0.05$). Additional studies showed that the direction of the effect of genistein, resveratrol, and quercetin on H₂S metabolism in the kidneys of intact rats coincided with that of the experimental chronic lesion.

It was shown for the first time that the effect of polyphenols on the state of the renal hydrogen sulfide system in CKD was associated with a decrease in the activity of free radical oxidation of lipids and proteins on the background of restoring balance in the system of pro- and antioxidants. Thus, plant nephroprotectors and, in particular, quercetin reduced the content of MDA, GGTP, and NADPH oxidase activity (by 21.0 - 40.4%, $p < 0.05$), with a simultaneous increase in the activity of SOD (by 29.7 - 38, 7%, $p < 0.05$) in the kidneys of animals with experimental chronic lesions, compared with untreated animals. In the group of treated animals, there were significant strong or significant relationships between H₂S content and oxidative stress ($r = |0.65-0.74|$; $p < 0.05$). Besides, genistein and resveratrol caused an increase in renal activity of the endothelial isoform of NO synthase (by 36.3 - 44.7%, $p < 0.05$) and a decrease in the activity of its inducible isoform (by 15.4 - 20.9%, $p < 0.05$), relative to untreated animals. Under these conditions, significant strong bonds were registered between the content of H₂S and the activity of different isoforms of NO synthase ($r = |0.70 - 0.75|$; $p < 0.05$).

According to the results of our research, it was found that among the studied polyphenolic compounds, it was the isoflavonoid genistein that showed the strongest protective potential against the kidneys on the background of CKD. The use of genistein in CKD normalized the number of mitoses and the activity of DNA synthesis (the proportion of cells in the G2 + M and S phases probably did not differ from pseudo-operated animals) and reduced the intensity of apoptosis of renal cortex cells (the number of cells in the SUB-G0G1 phase was 16.6% less than in untreated animals). Correlation analysis showed that on the background of treatment between the content of H₂S in the kidneys and the number of cells in the SUB-G0G1 phase there were significant inverse relationships ($r = -0.81$; $p < 0.05$), while with the number of cells in the S phase - direct correlations ($r = 0.78$; $p < 0.05$). The effect of genistein on the cell cycle was associated with its ability to replenish H₂S in the kidneys, as evidenced by the results of correlation analysis. Thus, on the background of treatment between the content of H₂S in the kidneys and the number of cells in the SUB-G0G1 phase, there were significant inverse relationships ($r = -0.81$; $p < 0.05$), while with the number of cells in the S phase - direct correlations ($r = 0.78$; $p < 0.05$). Additional evidence of nephroprotective action of genistein was obtained during morphological studies. It was shown that the introduction of this bioflavonoid inhibited the development of structural and degenerative-dystrophic changes in the kidneys and promoted the activation of compensatory-adaptive and regenerative processes, caused the normalization of hemodynamics. The magnitude of the nephroprotective effect of genistein was practically not inferior to sodium hydrogen sulfide.

Key words: chronic kidney disease, hydrogen sulfide, cystathionine gamma-lyase, cystathionine beta synthase, cysteine aminotransferase, nephroprotective effect, plant polyphenol, genistein, resveratrol, quercetin, rat.

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.

1. Волощук Н. І. Участь системи гідроген сульфїду в патогенезї експериментальної ниркової недостатності / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, А. В. Мельник // Вісник морфології. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 252-256.

2. Молекулярні механізми нефропротекторного впливу поліфенолів за експериментальної хронічної хвороби нирок. Зв'язок з системою гідроген сульфїду / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, А. В. Мельник, О. М. Денисюк, П. В. Жорняк // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2019. – № 4 (23). – С. 561-566.

3. Дослідження впливу генїстеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфїду у нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2019. – № 13 (3). – С. 187-196.

4. The influence of genistein, resveratrol and quercetin on functional state of kidney in rats with experimental chronic kidney disease. Connection with hydrogen sulfide system / N. Voloshchuk, S. Konjuch, A. Melnyk, O. Denysiuk // Modern Science – Moderní věda. – 2020. – № 2. – P.82-93.

5. Hydrogen sulfide metabolism and its role in kidney function in a rat model of chronic kidney disease / S. Koniukh, N. Voloshchuk, A. Melnyk, I. Domin // Health Prob Civil. – 2020 - №14(4). – P. 289-297. Online publish date: 2020-06-19.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

6. Волощук Н. І. Зміни рівнів гідроген сульфїду у тварин з експериментальною нирковою недостатністю / Н. І. Волощук, С. А. Конюх // Матеріали VIII Національного конгресу фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (13-16 вересня 2016 р., м. Харків): у 2 т. - Харків: НФаУ, 2016. – Т. 2. – С. 17.

7. Конюх С. А. Вплив природних поліфенолів на рівень гідроген сульфід у нирках щурів // С. А. Конюх, І. В. Таран // Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. – С. 66.

8. Волощук Н. І. Вплив рослинних поліфенольних сполук на основні показники роботи нирок у щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. С. Пашинська // Матеріали ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини» (16-17 листопада 2017 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2017. – С. 145-147.

9. Конюх С. А. Участь системи гідроген сульфід у фізіології та патології нирок / С. А. Конюх // Збірник матеріалів XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку - 2018» (18-20 квітня 2018 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2018. – С. 447.

10. Молекулярні механізми впливу природних поліфенолів на метаболізм гідроген сульфід у нирках щурів за експериментальної хронічної хвороби нирок / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, А. В. Мельник, О. Б. Орленко // Матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини» (7-8 листопада 2019 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2019. – С. 50-54.

11. Конюх С. А. Вплив природних поліфенолів на метаболізм гідроген сульфід у тварин з експериментальною хронічною хворобою нирок / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, К. Ю. Вашкеба // Тези доп. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Хімія природних сполук» (30-31 травня 2019 р., м. Тернопіль). – Тернопіль, 2019. – С. 85-86.

12. Волощук Н. І. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфід на метаболізм гідроген сульфід у нирках та їх функціональний стан за умов експериментальної хронічної хвороби нирок / Н. І. Волощук, С. А. Конюх //

Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, присвяченого 165-й річниці від дня народження І. Я. Горбачевського (30 вересня – 4 жовтня 2019 р., м. Тернопіль). – Тернопіль, 2019. – С. 169.

13. Конюх С. А. Вплив геністеїну на морфологічну будову єдиної нирки у щурів з експериментальною хронічною хворобою нирок / С. А. Конюх, А. П. Король // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 70-річчю з дня народження професора В.М. Бобирьова (7-8 травня 2020 р., м. Полтава). – Полтава, 2020. – С. 12-13.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ФАРМАКОТЕРАПІЯ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК - ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ (огляд літератури).....	24
1.1. Поширеність та особливості перебігу хронічної хвороби нирок.....	24
1.2. Роль системи гідроген сульфїду в фізіології та патології нирок	28
1.3. Місце рослинних нефропротекторів в лікуванні захворювань видільних органів.....	39
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	47
2.1. Характеристика експериментальних тварин	47
2.2. Експериментальні моделі.....	49
2.3. Вибір доз досліджуваних сполук.....	49
2.3. Біохімічні методи дослідження.....	50
2.4. Гістологічні методи дослідження.....	54
2.5. Цитометричні методи дослідження.....	55
2.6. Методи статистичної обробки результатів.....	57
РОЗДІЛ 3. РОЛЬ СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ УРАЖЕННЯ НИРОК ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК...	58
3.1. Дослідження показників метаболізму гідроген сульфїду у нирках щурів та їх зв'язку з маркерами функціонального стану нирок за умов експериментальної хронічної хвороби нирок у щурів.....	59

3.2	Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду (пропаргілгліцину та натрій гідрогенсульфїду) на метаболїзм гідроген сульфїду у нирках та функціональний стан нирок за умов експериментальної хронїчної хвороби нирок у щурів.....	69
3.3	Вплив донатору гідроген сульфїду на показники клітинного циклу та фрагментацію ДНК нирок щурів за експериментальної хронїчної хвороби нирок.....	80
3.4	Вплив донатору гідроген сульфїду на морфологічний стан нирок щурів за умов експериментальної хронїчної хвороби нирок.....	86
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ РОСЛИННИХ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК НА МЕТАБОЛІЗМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА ПОКАЗНИКИ РОБОТИ НИРОК (ФУНКЦІОНАЛЬНІ, БІОХІМІЧНІ, ЦИТОМЕТРИЧНІ, МОРФОЛОГІЧНІ) У ТВАРИН З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ХРОНІЧНОЮ ХВОРОБОЮ НИРОК.....		95
4.1.	Дослідження показників обміну гідроген сульфїду у нирках щурів за експериментальної хронїчної хвороби нирок на тлі застосування поліфенольних сполук (генїстеїну, ресвератролу та кверцетину).....	96
4.2.	Дослідження функціонального стану нирок та його зв'язку з вмістом гідроген сульфїду за експериментальної хронїчної хвороби нирок на тлі застосування генїстеїну, ресвератролу та кверцетину).....	101
4.3	Дослідження маркерів оксидативного стресу, активності ізоформ NO-синтази та їх зв'язку з вмістом гідроген сульфїду за експериментальної хронїчної хвороби нирок на тлі застосування поліфенольних сполук (генїстеїну, ресвератролу та кверцетину).....	108

4.4	Вплив геністеїну на показники клітинного циклу, фрагментацію ДНК у нирках щурів та їх зв'язок з вмістом гідроген сульфїду за експериментальної хронїчної хвороби нирок.....	114
4.5	Вплив геністеїну на морфологїчний стан нирок щурів за умов експериментальної хронїчної хвороби нирок.....	117
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ		
	ДОСЛІДЖЕННЯ.....	123
	ВИСНОВКИ.....	137
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	140
	ДОДАТКИ.....	170

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АФК – активні форми кисню;
- БАР – біологічно активні речовини;
- ВРО – вільнорадикальне окиснення;
- в/оч – внутрішньочеревне введення;
- в/шл – внутрішньошлункове введення;
- ГГТП – гамма-глутамілтранспептидаза;
- ГГЦ – гіпергомоцистеїнемія;
- ГНН – гостра ниркова недостатність;
- КГП – карбонільні групи протеїнів;
- МДА – малоновий діальдегід;
- НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат оксидаза;
- ОМБ – окисно модифіковані білки;
- ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів;
- СОД – супероксиддисмутаза;
- ХХН – хронічна хвороба нирок;
- ЦАТ – цистеїн амінотрансфераза;
- ЦБС – цистатіонін- β -синтаза;
- ЦГЛ – цистатіонін- γ -ліаза;
- ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації;
- H₂S – гідроген сульфід;
- eNOS – ендотеліальна синтаза нітроген монооксиду;
- iNOS – індуцибельна синтаза нітроген монооксиду;
- NaHS – натрій гідрогенсульфід;
- PPG – пропаргілгліцин;
- SH – сульфгідрильні групи протеїнів;

ВСТУП

Актуальність теми. Проблема ураження органів видільної системи наразі залишається пріоритетним напрямком медицини, а її актуальність збільшується у зв'язку із загальним постарінням населення планети та зростанням питомої ваги цієї патології в світі – від 10 до 16 % дорослого населення, а згідно даних статистики, кожна 5 особа старша 65 років має патологію нирок, причому ці цифри швидко зростають [1, 2]. Згідно висновків фахівців ВООЗ, хвороби нирок можна вважати найбільш важливими неінфекційними захворюваннями сучасності [3]. Так якщо у 1990 році хронічна хвороба нирок (ХХН) займала 27 місце серед усіх причин смертності, то у 2010 році займала 18 місце (зросла приблизно на 82 %). За цими показниками ця патологія займає третє місце після ВІЛ/СНІД (396 %, та діабету – 93 %) за приростом темпів летальності [4].

Згідно з даними епідеміологічних досліджень, на початок 2015 року в Україні зареєстровано близько 500 тис. осіб, хворих на ХХН I–V стадій. До 30 % з них надходять у лікувальні заклади з V (термінальною) стадією ХХН [5, 6].

Велика розповсюдженість та тяжкі наслідки цієї патології зумовлюють інтерес науковців до дослідження біомаркерів та молекулярних механізмів ураження нирок. Серед відомих патобіохімічних механізмів виділяють прямий безпосередній вплив на певні клітинні мішені, субклітинні структури, ферментні чи транспортні білки, оксидативний та нітрозативний стрес, апоптоз та запалення [7, 8, 9, 10, 11, 12]. Однак це питання ще далеке до свого остаточного вирішення. Тому встановлення молекулярних механізмів захисного потенціалу видільних органів набуває особливої ваги з огляду на можливість визначення додаткових маркерів нефротоксичності та розробки патогенетично обґрунтованих підходів до попередження і медикаментозного лікування ураження нирок.

Однією з потенційних кандидатів на роль мішені для фармакотерапії є гідроген сульфід (H_2S) - сигнальна молекула, яка утворюється в організмі в

процесі метаболізму сірковмісних амінокислот. Існують численні докази, що система гідроген сульфід у важливою метаболічною детермінантою в роботі видільних органів. H_2S утворюється у нирках в реакції транссульфування та трансамінування за участі піридоксальфосфатзалежних ензимів цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистатіонін- β -синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22), 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (3-МСТ, КФ 2.8.1.2) та цистеїн амінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) у досить значних кількостях. Описано вплив ендogenous гідроген сульфід на роботу гломерулярного та тубулярного апарату нирок [13, 14, 15].

На сьогодні існує велика кількість лікарських засобів та біологічно активних сполук, що виявляють здатність захищати нирки, серед яких окремим класом виступають рослинні засоби з політропною органопротекторною дією [16]. Багатогранна нефропротекторна активність при різних за етіологією ураженнях нирок притаманна, зокрема, флавоноїду кверцетину [17, 18], стильбену ресвератролу [19], ізофлавоноу геністеїну [20]. Однак на сьогодні дуже обмеженою є інформація про їх вплив на систему H_2S у нирках щурів. Питання про те, в якій мірі система H_2S залучена в реалізацію нефропротекторного потенціалу вказаних поліфенолів за умов патології видільних органів, наразі є відкритим. Тому доцільним є з'ясування ренальних ефектів вказаних фітосполук у тварин, що дасть можливість розширити та доповнити наші уявлення про їх фармакодинаміку, і водночас стане обґрунтуванням для подальшого вивчення їх нефропротекторного потенціалу при гострому, а особливо при хронічному ураженні нирок. Саме цьому питанню і присвячена дана робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках планових НДР Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України: «Пошук та вивчення біологічно активних речовин серед природних сполук та продуктів хімічного синтезу» (№ держреєстрації 0118U001903 (2018-2022)), «Роль екзогенних та ендogenous сірковмісних сполук у механізмах ураження внутрішніх органів та цитопротекції за різних патологічних станів» (№ держреєстрації

0119U001142 (2019-2023). Дисертант є співвиконавцем вищезазначених тем.

Мета дослідження. Експериментально обґрунтувати нові підходи до фармакотерапії хронічної хвороби нирок шляхом встановлення ролі порушень обміну гідроген сульфід у патогенезі ХХН та можливості їх корекції препаратами рослинних поліфенольних сполук.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання:**

1. Оцінити зміни системи гідроген сульфід у нирках (вміст H_2S , активність ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ, швидкість утилізації H_2S) за умов ХХН (модель 5/6 нефректомії) та їх зв'язок з показниками функціонального стану нирок.

2. Встановити роль дефіциту та надлишку H_2S (введення донатора гідроген сульфід $NaHS$ та інгібітору його синтезу пропаргілгліцину (PPG) на основні показники функції нирок за умов ХХН (модель 5/6 нефректомії).

3. Оцінити стан системи гідроген сульфід у нирках щурів на тлі застосування рослинних поліфенолів за умов хронічної хвороби нирок. Вивчити вплив рослинних поліфенольних сполук на показники функціонального стану нирок та оцінити їх зв'язок з рівнем гідроген сульфід за умов ХХН (модель 5/6 нефректомії).

4. Дослідити вплив рослинних поліфенольних сполук на показники оксидативного стресу, активність ізоформ NO-синтази та оцінити їх зв'язок з рівнем гідроген сульфід за умов хронічної хвороби нирок (модель 5/6 нефректомії).

5. Вивчити морфологічний стан, показники клітинного циклу у нирках щурів з експериментальною ХХН на тлі застосування донатору гідроген сульфід та рослинних поліфенолів.

Об'єкт дослідження – експериментальна хронічна хвороба нирок за умов дефіциту та надлишку гідроген сульфід.

Предмет дослідження – нефропротекторні ефекти рослинних поліфенольних сполук (кверцетину, ресвератролу, геністеїну) за експериментальної хронічної хвороби нирок та їх зв'язок із рівнем гідроген сульфід.

Методи дослідження: фармакологічні (моделювання хронічного ураження нирок у тварин, застосування речовин з ренотропною дією), біохімічні (вміст гідроген сульфід, швидкість утилізації гідроген сульфід, активність ферментів-продуцентів гідроген сульфід, показники функціонального стану клубочкового та канальцевого апарату, маркери оксидативного стресу, активність ізоформ NO-синтаз), гістологічні, цитометричні (фрагментація ДНК як маркер апоптозу, зміни фаз клітинного циклу в клітинах нирок, статистичні (програми Excel, Statistics 6.0, t-критерій Ст'юдента, U-критерій Манна-Уїтні, медіани (Me) та інтерквартильного розмаху [25 %, 75 %], кореляційний аналіз).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що в патогенезі ураження нирок за експериментального хронічного ураження важливу роль відіграють порушення процесів ензиматичного утворення та утилізації H_2S у нирках. Встановлено, що ХХН у щурів супроводжується зменшенням активності H_2S -продукуючих ферментів на 28,3-34,2 % ($p < 0,05$), зростанням швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках на 34,3 % ($p < 0,05$) та зниженням вмісту H_2S на 35,8 % ($p < 0,05$), відносно контролю. Вперше показано, що гломеруло-тубулярні порушення за ХХН у щурів тісно корелюють з вмістом H_2S у нирках ($r=|0,54-0,85|$, $p < 0,05$). Отримано нові дані щодо ролі системи гідроген сульфід в прогресуванні хронічної хвороби нирок на основі дослідження морфо-функціонального стану нирок за даної патології.

Доповнені наукові дані про нефропротекторні властивості рослинних поліфенольних сполук та вперше встановлено їх здатність модулювати обмін гідроген сульфід у нирках за умов хронічної хвороби нирок. Використання досліджуваних поліфенольних сполук, особливо, геністеїну, супроводжувалось збільшенням вмісту H_2S у нирках. Вперше показано, що механізми їх впливу на систему H_2S за ХХН відрізнялись, залежно від обраної сполуки. Так, геністеїн та ресвератрол збільшували продукцію H_2S за рахунок активації трьох ензиматичних систем ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ, тоді як кверцетин підвищував активність лише ЦБС. Усі досліджувані поліфеноли зменшували швидкість утилізації H_2S , причому саме кверцетин в найбільшій мірі

попереджував його окисну деградацію. Вперше показано, що вплив поліфенолів на стан системи гідроген сульфід у нирках за ХХН асоціюється зі зменшенням активності вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів на тлі відновлення рівноваги в системі про- та антиоксидантів, а також сповільненням нітрозативного стресу та відновленням продукції нітроген моноксиду у нирках за участі ендотеліальної ізоформи NO-синтаз (за винятком кверцетину, який достовірно не впливав на ці показники).

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати розширюють теоретичні уявлення щодо ролі системи гідроген сульфід в патогенезі гострого та хронічного ураження нирок, доводять доцільність модуляції його рівня в якості можливої мішені для нефропротекції. В роботі теоретично обґрунтовано та експериментально доведено можливість корекції порушень стану видільних органів за їх хронічного ураження за допомогою природних поліфенольних сполук разом з модуляторами обміну гідроген сульфід з метою підвищення ефективності фармакотерапії хронічної ниркової недостатності на додіалізованому етапі.

Результати впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри фармакології ВНМУ ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного фармацевтичного університету, кафедри біохімії та медичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, науковий процес лабораторії фізико-хімічної фармакології фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України.

Особистий внесок здобувача. Дисертант особисто провів патентно-інформаційний пошук, проаналізував дані вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дисертації, разом із науковим керівником намітив мету й задачі, необхідні методи дослідження. Опанував загальноприйняті моделі з відтворення гострого та хронічного ураження нирок, відповідно до яких обрано методи виконання експериментальної частини дисертаційної роботи. Дисертант самостійно

виконав експериментальні дослідження, виконав статистичну обробку цифрових даних, підготував розділи дисертації, у т. ч. частину, присвячену узагальненню та обговоренню отриманого фактичного матеріалу, разом із науковим керівником сформулював висновки дисертації. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належать експериментальний матеріал і основний творчий доробок.

Автор висловлює подяку за консультативну допомогу наступним співробітникам ВНМУ ім. М. І. Пирогова МОЗ України: д.мед.н., професору кафедри біологічної та загальної хімії А. В. Мельнику при проведенні біохімічних досліджень, к.мед.н., доценту кафедри фармакології І. В. Тарану при проведенні фармакологічних досліджень, к.мед.н., ст.н.с., доценту кафедри очних хвороб І. Л. Черешнюку при здійсненні протоково-цитометричного аналізу, к.мед.н., доценту кафедри гістології А. П. Королю при проведенні гістологічних досліджень.

Апробація результатів дисертації. Головний зміст наукового дослідження оприлюднено на V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); IX та X Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України» (Вінниця, 2017, 2019); XV Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку - 2018» (Вінниця, 2018); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць, з них 5 статей опубліковано в наукових фахових журналах (2 відносяться до міжнародних наукометричних баз, у тому числі 1 стаття опублікована в закордонному науковому журналі (Польща), що входить до наукометричної бази Web of Science та 1 стаття в закордонному періодичному фаховому виданні (Чехія).

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена на 175 сторінках друкованого тексту (основна текстова частина - 135 сторінок) і включає анотацію, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, 2

розділи власних досліджень, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних літературних джерел, що включає 229 найменувань (62 кирилицею, 167 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 36 рисунками та 21 таблицею.

РОЗДІЛ 1

ФАРМАКОТЕРАПІЯ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК - ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Поширеність та особливості перебігу хронічної хвороби нирок

Хронічна хвороба нирок займає особливе місце серед неінфекційних захворювань, оскільки має високу розповсюдженість, різке погіршення якості життя, високу смертність і в термінальних стадіях вимагає високовартісних методів замісної терапії – діалізу або трансплантації нирки [1, 2, 21].

За визначенням KDIGO, 2012, хронічну хворобу нирок діагностують за виявлення тривалих (терміном більше 3 місяців) функціональних, структурних чи клініко-лабораторних змін в роботі нирок, або зниженням швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) < 60 мл/хв/1,73 м². Прогресування ХХН визначається на підставі значення ШКФ та розміру альбумінурії [22].

У перебігу ХХН розрізняють п'ять стадій в залежності від порушення швидкості клубочкової фільтрації (за CRIGO 2012):

Стадія ХХН	Показник ШКФ	Назва ураження нирок
I	90 мл/хв/1,73 м ²	з нормальною або підвищеною ШКФ
II	60-89 мл/хв/1,73 м ²	з незначно зниженою ШКФ
III а	45-59 мл/хв/1,73 м ²	з проміжним зниженням ШКФ (незначним-помірним)
III б	30-44 мл/хв/1,73 м ²	зниження ШКФ поміж помірним і важким
IV	15-29 мл/хв/1,73 м ²	важке зниження ШКФ
V	< 15 мл/хв/1,73 м ²	термінальна ниркова недостатність

Діагноз хронічної ниркової недостатності виставляють при ознаках, що відповідають III-V стадіям порушень ШКФ.

До основних факторів ризику хронічної хвороби нирок можна віднести [21, 23]:

Такі, що немодифікуються:

- чоловіча стать
- вік старший 65 років
- замала кількість нефронів (олігонефронія)
- расові та етнічні особливості
- порушення внутрішньоутробного розвитку, гіпотрофія
- аплазія, гіпоплазія нирки

такі, що модифікуються:

- порушення обміну речовин (цукровий діабет, ожиріння, гіперхолестеринемія, порушення пуринового обміну)
- серцево-судинні захворювання (артеріальна гіпертензія, системний атеросклероз серцева недостатність)
- інші захворювання (аутоімунні, хронічні вірусні і бактеріальні інфекції, злоякісні пухлини, обструктивні захворювання сечових шляхів, перенесена ниркова недостатність, нефропатія вагітних, перенесені хірургічні операції на нирках)
- спосіб життя, характер харчування та шкідливі звички (тютюнопаління, зловживання алкоголем, наркотиками, білкова їжа).

Не менш важливою є ятрогенна нефротоксичність, що є наслідком дії ксенобіотиків, в т. ч. лікарських засобів. На сьогодні відомі тисячі сполук, здатних викликати ураження нирок: медикаменти (аміноглікозидні антибіотики, амфотерицин, радіоконтрастні речовини, парацетамол та інші анальгетики, нестероїдні протизапальні засоби, галогеновані інгаляційні анестетики, циклоспорін, інгібітори ангіотензин-конвертуючого ферменту, численні протипухлинні та противірусні засоби та інші), численні промислові та побутові токсиканти тощо [8, 24, 25, 26, 27].

Механізм розвитку ХХН має різнобічний характер і може включати в себе ураження різних систем та внутрішніх органів хворого. ХХН прогресує поступово до термінальної стадії і приводить до декомпенсації функціональних можливостей нирок. Наростає затримка в крові азотистих шлаків, пігментів, в ряді випадків електролітів (калію), порушується

ендокринна функція нирок. Незважаючи на збереження нирками водовідведення, в крові накопичуються білкові шлаки, кислотні радикали (сечовина, сечова кислота амінокислоти креатинін, гуанідин, фосфати, сульфати); як правило виникає та наростає артеріальна гіпертензія, що врешті-решт приводить до хронічної уремії. Чітка картина ниркової недостатності відмічається тільки після загибелі 75 % нефронів [11, 28].

В основі патогенезу нефротоксичності полягає вазоконстрикція, пошкодження внутрішньоклубочкової гемодинаміки, пошкодження клітин тубулярного апарату нирок, інтерстиціальний нефрит, депозити кристалів, тромботичні мікроангіопатії, осмотичний нефроз та інші [7, 10, 26, 29, 30].

Інший механізм уражень нирок пов'язаний з утворенням у нирках чи позаниркових тканинах реакційно-здатних метаболітів. Зокрема, такий механізм є притаманним для нефротоксичної дії деяких лікарських препаратів (парацетамолу, фенацетину, фторотану, метоксифлуорану та цисплатину) [24; 31; 32].

Але одними з найбільш важливих механізмів, що залучені в процеси ураження видільних органів, є запалення та ініціація оксидативного та нітрозативного стресу [11, 33, 34, 35]. Ініціювання оксидативного стресу може бути наслідком гальмування активності антиоксидантних ферментів чи зв'язування ними небілкових антиоксидантів [36, 37, 38]. Утворення реакційно-здатних інтермедіатів кисню та нітрогену лежать в основі мікроваскулярних порушень, розвитку запалення, а згодом стають причиною фіброзування та інших морфологічних змін нирок [12, 39, 40].

Молекулярні механізми ураження нирок включають в себе прямий безпосередній вплив на певні клітинні мішені, субклітинні структури, ферментні чи транспортні білки [8, 41, 42, 43], порушення процесів мітохондріального окислювального фосфорилування [8, 24, 44, 45], наслідком чого стає дисбаланс в системі внутрішньоклітинної передачі регуляторних сигналів і як наслідок - ініціювання процесів апоптозу [46].

На сьогодні відомі численні біомаркери ураження нирок при ХХН: ендотелін (ЕТК), трансформуючий фактор росту (TGF- β 1) та фібронектин крові (ФНК) [47], прозапальні інтерлейкіни, наприклад, інтерлейкін-18 (IL-18), який у сечі секретується епітелієм проксимальних канальців і підвищується при ураженні нирок, інші цитокіни, KIM-1 («kidney injury molecule-1»), що синтезується у великій концентрації епітеліальними клітинами проксимальних канальців після ішемічного або токсичного ушкодження [48], цистатин С – білок з низькою молекулярною вагою, який не піддається канальцевій секреції. За даними авторів, цей білок переважає креатинін за достовірністю визначення рівня ШКФ, особливо, коли вона змінена незначно [49], нейтрофільний желатиназа-асоційований ліпокалін (NGAL), який синтезується епітеліальними клітинами товстого відділу висхідної петлі Генле і збиральними трубками, де він виконує функцію антимікробного та антиокисного захисту, і стимулюється при запаленні [50]. Також показано, що існує низка таких метаболітів, вміст яких значно змінюється за ХХН як у пацієнтів, так і тварин незалежно від основної причини ХХН. До них відносяться рицинолева кислота, стеаринова кислота, цитозин, лізофосфатидилова кислота (LPA), 3-метилгістидин та аргінінова кислота. Проведене комплексне статистичне дослідження на достатньо великій кількості пацієнтів із ХХН та декількох моделях експериментального ураження нирок дозволило авторам вважати їх чутливими біомаркерами ураження нирок, а відновлення їх рівнів – показником ефективності лікування [51].

Однак пошук нових біомаркерів ураження нирок та молекул, які можуть бути мішенями нефропротективної терапії, наразі ще далекий до свого остаточного вирішення. Подальші дослідження ефективності корекції клітинних механізмів прогресування ХХН з метою сповільнити розвиток ураження нирок, подовжити додіалізний період перебігу захворювання є концептуальною задачею нефрології та фармакології.

1.2 Роль системи гідроген сульфід у фізіології та патології нирок

Гідроген сульфід існує як безбарвний газ із сильним запахом тухлих яєць. Протягом 100 років гідроген сульфід вважався токсичним газом. Він може безпосередньо пригнічувати активність кількох основних ферментів у людини, а саме: цитохром-оксидаза, карбоангідраза, моноаміноксидаза, і Na^+/K^+ АТФ-азу, тим самим викликаючи токсичність. Ніс людини може виявити концентрацію в 400 разів нижче її токсичного рівня, тоді як тривалий вплив може викликати десенсибілізацію нюхових нервів до H_2S . Проте образ H_2S значною мірою розширюється з часу відкриття H_2S як ендogenous нейромодулятора [52]. Після цього фізіологічне значення H_2S широко вивчалось, і натеper H_2S є визнаним членом родини газотрансмітерів, яка включає нітроген монооксид (NO) та карбон монооксид (CO) і бере участь в регуляції судинного тонуcу, нейромодуляції, цитопротекції, запаленні, апоптозі та інших процесах [53, 54, 55]. Наявні дані свідчать про те, що H_2S також активно регулює функцію нирок і залучений до численних захворювань нирок протягом останніх років [56].

Утворення гідроген сульфиду у нирках. Давно відомо, що нирка виробляє H_2S у вимірюваних кількостях. У нирках ссавців реакції утворення гідроген сульфиду забезпечують: цистатіонін- γ -ліаза (ЦГЛ) (КФ 4.4.1.1), цистатіонін- β -синтаза (ЦБС) (КФ 4.2.1.22), 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза (3-МСТ, КФ 2.8.1.2)) та цистатіонін амінотрансфераза (ЦАТ) (КФ 2.6.1.3) [57, 58]. ЦГЛ активує реакцію димеризації двох молекул L-цистеїну до L-цистину, після чого утворюється піруват, NH_3 і тіоцистеїн. Утворений тіоцистеїн потім використовується як субстрат за допомогою ЦГЛ для взаємодії з іншими тіолами для отримання H_2S . CBS каталізує реакцію між L-цистеїном та гомоцистеїном, в результаті чого утворюється цистатинін і H_2S [59]. На відміну від інших ензимів, 3-MST не може безпосередньо використовувати L-цистеїн як субстрат. L-цистеїн спочатку перетворюється на 3-МП за допомогою ЦАТ, який потім каталізується 3-MST на піруват та H_2S [60]. ЦГЛ та ЦБС переважно локалізуються в цитозолі, хоча за умов окиснювального стану вони можуть

переміщатися в мітохондрії, тоді як 3-МСТ зберігає і генерує H_2S в мітохондріях [55]. Четвертий шлях утворення гідроген сульфід у нирках, а саме d-amino acid oxidase (DAO)/3-MST був нещодавно описаний [60]. Автори показали, що лізат нирок може виробляти в 60 разів більше H_2S при використанні D-цистеїну як субстрату порівняно з L-цистеїном. В подальшому D-цистеїн перетворюється на 3-МП за допомогою DAO, розташованого на пероксисомах. У результаті метаболітного обміну між пероксисомою та мітохондріями 3-МП імпортується в мітохондрії та перетворюється на H_2S за допомогою 3-МСТ. Оскільки DAO експресується тільки в головному мозку та нирках, саме цей шлях утворення H_2S притаманний цим органам.

Наявність такої кількості ензиматичних шляхів утворення гідроген сульфід у нирках переконливо свідчить про значну кількість цього газотрансмітера в цьому органі. Найбільшу питому вагу у нирках мають саме ЦГЛ та ЦБС, які локалізуються переважно у проксимальних каналцях видільних органів [61]. Проте інформація щодо локалізації цих ензимів в клубочках нирок є дотепер суперечливою та потребує подальших досліджень [62, 63, 64]. Як ЦГЛ, так і ЦБС присутні у нирках. ЦГЛ експресується ендотеліальними клітинами, мезангіальними клітинами та подоцитами, які разом утворюють більшість клітин клубочка. Цей ензим також експресується в клітинах епітелію проксимальних та дистальних каналців і в перитубулярних капілярах [63, 65]. Однак Yamamoto та співавт. не виявили ні ЦБС, ні ЦГЛ в гломерулах або в ниркових кровоносних судинах, але встановили, що вони експресуються в проксимальних каналцях [64].

Участь гідроген сульфід у фізіології нирок. Незважаючи на досить велику кількість даних літератури щодо участі цієї молекули в фізіологічних та патофізіологічних процесах, роль його в функціонуванні нирок вивчена не настільки ретельно. Інфузія H_2S у формі гідросульфід натрію ($NaHS$) у ниркову артерію збільшує потік крові нирок і збільшує швидкість клубочкової фільтрації, що є показником функції кліренсу нирок. Показник швидкості сечовипускання також збільшувався, і ці ефекти були дозозалежними [66]. H_2S збільшує екскрецію іонів Na^+ та K^+ в сечі, можливо, через інгібування

котранспортера $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ у висхідній частині петлі Henle і Na^+/K^+ АТФ-ази [66]. H_2S збільшував кровообіг у перитубулярних кровоносних судинах, а NaHS коректував гіперперфузію у діабетичних мишей [64], хоча в останні роки з'явилися дані що інтратренальна інфузія донатора H_2S - NaHS здатна збільшувати клубочкову фільтрацію, а також екскрецію іонів Na^+ та K^+ [66, 67]. Аналогічний вплив на функцію нирок отриманий також і за введення L-цистеїну – основного субстрату H_2S [66]. Натомість, інгібітори ендогенної продукції H_2S викликали зниження ШКФ та екскреції електролітів, що дозволяє припустити, що H_2S регулює функцію нирок у фізіологічних умовах. Проте ні амінооксиоцтова кислота, ні PPG самостійно не впливали на функцію нирок, що передбачає компенсуючий ефект між ЦБС та ЦГЛ на регуляцію нирок, що підтверджено ще одним дослідженням [68]. Існує гіпотеза про вплив H_2S на транспортери натрію, перевірка якої показала, що H_2S значно пригнічує активність NKCC ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ котранспортеру) і NKA (Na^+/K^+ АТФази), що може полягати в основі його впливу на функцію нирок. У дослідженні Ge S.N. et al. (2014) [67] вивчали механізм інгібувального впливу H_2S на NKA. Автори показали, що NaHS сприяє ендоцитозу NKA шляхом прямого активації рецептора епідермального фактора росту (EGFR) в клітинах епітелію ниркових каналців. Більше того, мутація *cys797* – залишку у EGFR повністю скасовувала дію H_2S , що свідчить про пряму взаємодію між H_2S і цим цистеїновим залишком. Таким чином, як ендогенний, так і екзогенний H_2S здатний збільшувати ниркову фільтрацію та екскрецію калію і натрію, ймовірно, через інгібувальний ефект на транспортери натрію, такі як NKCC і NKA.

Гідроген сульфід стимулює процеси обміну $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ в різних тканинах, наприклад в тканині аорти [69] та гладком'язових клітинах судин [70]. Однак вплив гідроген сульфиду на обмінні процеси у нирках достеменно невідомий. Припускається, що H_2S також може посилити активність $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обміну в нирковій системі.

Окремої уваги заслуговує вплив гідроген сульфиду на вивільнення реніну у нирках. Ренін-ангіотензинова система нирок причетна до регуляції

концентрації натрію в плазмі крові, а відтак – і до рівня АТ. Ренін вивільняється з юкта-гломерулярних клітин та детермінує активність РАС, і цей процес регулюється внутрішньоклітинним цАМФ [71]. H_2S здатний знижувати рівень цАМФ в деяких клітинах [72], що означає, що H_2S може модулювати вивільнення реніну [73]. Було виявлено, що $NaHS$ інгібує мРНК реніну та його вміст на моделі реноваскулярної гіпертензії, що супроводжується зменшенням внутрішньоклітинного рівня цАМФ. Це підтверджується в дослідженні [74]. Крім того, в дослідженні [75] було показано, що зменшення вмісту реніну під впливом гідроген сульфід у діабетичної нефропатії зумовлено не тільки впливом на аденілатциклазу, але і антирадикальним впливом H_2S . В той же час, при дослідженні впливу H_2S на активність реніну у інтактних щурів, було встановлено, що ані введення $NaHS$, ні гальмування ендogenous H_2S не впливають на активність реніну, що означає, що H_2S може модулювати активність нирок за умов надмірної активності ренін-ангіотензинової системи [73]. Надзвичайно важливим є встановлення ролі гідроген сульфід як «кисневого сенсора» у нирках. Було показано, що хоча продукція H_2S не залежить від O_2 ; однак метаболізм H_2S – це процес, який значно залежить від O_2 [76]. H_2S є чутливим до O_2 у нирках, особливо в мозковому шарі. Кількість кисню в мозковому шарі нефрону є меншою, ніж в кірковому, що приводить до вищої кількості H_2S у цьому регіоні [77]. Враховуючи той факт, що мітохондрії використовують H_2S як донатор електронів для продукування АТФ [78]. Автори припускають, що H_2S може бути прямим джерелом енергії в мозковому шарі нирок. Під час гіпоксії зниження O_2 призводить до подальшого накопичення H_2S , що сприяє відновленню подачі O_2 шляхом збільшення мозкового кровообігу та гальмування тубулярного транспорту [79]. Крім того, ЦБС та ЦГЛ можуть транслокуватись до мітохондрій та стимулювати вироблення H_2S за гіпоксичних умов [78]. Мітохондрії, які отримали додаткові кількості гідроген сульфід, можуть безпосередньо брати участь у продукуванні АТФ. За фізіологічних умов здатність H_2S виступати в якості «кисневого сенсора» показана в різних O_2 -чутливих тканинах, включаючи серцево-судинну

систему [76], дихальну систему [80], шлунково-кишковий тракт [81] та ін. Проте, це питання також потребує більш глибокого вивчення.

Участь гідроген сульфїду в патологічних станах нирок. З порушеннями вмісту та продукції H_2S в тканинах асоціюються різні патологічні стани. Зниження базального вмісту H_2S в плазмі крові відмічається у хворих з артеріальною гіпертензією, ішемічною хворобою серця, тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок, хворобою Альцгеймера, гіпергомоцистеїнемією [54]. Підвищення рівня H_2S виявляється при синдромі Дауна, декомпенсованому цирозі печінки, сепсисі, ішемічному інсульті, хронічних обструктивних захворюваннях легень [13, 14].

Роль гідроген сульфїду у гострому пошкодженні нирок. Гостре ушкодження нирок (раніше відоме як гостра ниркова недостатність, ГНН) є синдромом, який характеризується швидким падінням екскреторної здатності видільних органів і зазвичай супроводжується накопиченням кінцевих продуктів азотистого обміну, таких як сечовина та креатинін, різким зменшенням об'єму сечі або обома цими ознаками. ГНН може бути наслідком різних патологічних станів, і часто виникає у пацієнтів, які знаходяться у критичному стані. Літературні дані останніх років свідчать про беззаперечну роль H_2S в перебігу ГНН, яка виникає внаслідок найбільш часто зустрічаємих станів, таких як ішемія-реперфузія нирок, обструктивна нефропатія та медикаментозна нефротоксичність.

Ішемія-реперфузія нирок. Патогенетичні механізми ушкодження нирок при ішемії-реперфузії включають виснаження енергетичних запасів (АТФ), перевантаження кальцієм, оксидативний стрес, апоптоз і запалення тощо [82]. Існує досить багато досліджень, які переконливо доводять залучення ендогенного гідроген сульфїду в розвиток ішемічно-реперфузійних (ІР) уражень видільних органів. Так, зокрема, було показано, що мРНК та вміст ЦГЛ та ЦБС зменшуються при ІР відповідно до зменшення вмісту H_2S у нирках та плазмі крові [83, 84], хоча механізми, що лежать в основі цих процесів ще невідомі. Крім того, введення інгібіторів H_2S -продукуючих ензимів суттєво посилює ступінь ішемічного ушкодження нирок в

експерименті [61, 84], що може свідчити, що в основі ішемічного пошкодження нирок полягає нестача ендogenous гідроген сульфідy. Цей висновок розділяють також інші дослідники, які встановили що дефіцит ЦГЛ асоціюється з посиленням ураженням нирок та смертю після ІР, що може бути пов'язано з посиленням вільнорадикальних процесів, тоді як екзогенне введення донатора H_2S перед ішемією, навпаки, виявляє ренопротективну дію головним чином внаслідок його антиоксидантної, антиапоптоїчної та протизапальної дій [84, 85]. Однак слід зазначити, що думка науковців щодо захисного впливу гідроген сульфідy при гострих ураженнях нирок не є одностайною. Зокрема, Li L. et al. (2008) та Meng G. et al. (2015) [86, 87] показали, що нефропротективна та кардіопротективна дія $NaHS$ при ІР значно поступається ефекту іншого синтетичного донатору гідроген сульфідy нового покоління (GY4137), який сприяє повільному вивільненню H_2S [86, 87]. Також згідно даних Ahmad A., et al. (2016) [85] ще один мітохондріально спрямований донатор H_2S , сполука AP39, інгібує активність глюкозооксидази, тим самим, посилюючи пошкодження нирок у щурів [85]. Таким чином, є доцільним подальші дослідження щодо можливої захисної дії донаторів гідроген сульфідy при гострому ішемічно-реперфузійному ушкодженні нирок.

H_2S при обструктивній нефропатії. Обструктивна нефропатія – це постренальний тип ушкодження нирок, спричинений обструкцією сечостатевого тракту внаслідок утворення конкрементів, лікування сульфаніламідними лікарськими засобами тощо. Найбільш типовою причиною обструктивної нефропатії є фіброз нирки після обструкції сечоводу [88]. За цих умов встановлено порушення ендogenous продукції H_2S через зменшення рівня експресії ЦБС та зменшення фіброзування нирок за умов введення екзогенного H_2S [89]. У культурах ниркових фібробластів $NaHS$ показав здатність інгібувати проліферацію клітин та блокувати фактора росту β -індукованої трансформації фібробластів до міофібробластів та мітоген-активовану протеїн кіназу (MAPK) [89]. Крім того, застосування $NaHS$ також запобігає порушенню функції нирок, спричиненої уретральною обструкцією [89, 90]. В дослідженнях Lin S. et al. (2016) [91] показало, що повільно

вивільняючий донатор H_2S (сполука GYY4137) сприяє збереженню кіркового шару нефрону, зменшує запальні ушкодження та тубулоінтерстиційний фіброз на моделі обструктивної нефропатії у щурів. Таким чином літературні дані свідчать про доцільність потенційного використання донаторів H_2S як нефропротекторів при обструктивній нефропатії.

H_2S за цисплатинової та доксорубіцинової нефротоксичності.

Цисплатин є добре відомим лікарським засобом в онкології. Серед його побічних ефектів чільне місце займає саме ниркова дисфункція. Недостатнє розуміння патобіохімічних механізмів її розвитку та відсутність дієвих засобів захисту нирок приводить до того, що цисплатинова нефропатія розвивається майже у 30 % пацієнтів [92]. Доведеними факторами в патогенезі цього стану є оксидативний стрес та запалення [92; 93]. Враховуючи добре відомі гальмівні ефекти H_2S на окиснювальний стрес і запалення, можна припустити, що H_2S захищає від нефротоксичності цисплатину. Однак дані літератури з цього приводу досить суперечливі. Так, згідно з [94], в перші 3 дні після введення цисплатину було зареєстровано підвищення експресії ЦГЛ, а прекодиціювання тварин інгібітором синтезу H_2S пропаргілгліцином стримувало цисплатин-індуковані пошкодження нирок, пригнічуючи запалення та апоптоз [94]. Згідно з думкою інших науковців, у більш пізні терміни після введення цисплатину спостерігалось зниження активності ЦГЛ та ЦБС у нирках, а застосування $NaHS$ зменшувало дисфункцію нирок у щурів, лікованих цисплатином [95]. Введення повільновивільняючого донатора H_2S (сполуки GYY4137) також не виявило захисної дії на нирки за цих умов. Таким чином, для остаточного висновку про наявність або відсутність нефропротекторної дії гідроген сульфїду та його донаторів за цисплатинової нефротоксичності потрібні подальші ґрунтовні дослідження [96].

Доксорубіцин є ще одним хіміотерапевтичним агентом, який застосовується при лікуванні злоякісних пухлин. Доксорубіцин може спричинити застійну серцеву недостатність і ушкодження нирок у формі фокального сегментарного склерозу клубочка, що асоціюється із тяжкою протеїнурією та порушеннями ниркового кліренсу [97]. За умов введення

доксорубіцину H_2S показав себе як медіатор ушкодження нирок, викликаючи запалення та протеїнурію [98]. Донатори H_2S в експериментах зменшували доксорубіцин-індуковану кардіотоксичність, однак дані щодо їх протективної ролі щодо нирок відсутні.

Викладені вище факти доводять необхідність уточнення ролі H_2S в медикаментозних ушкодженнях нирок. Крім того, необхідні дослідження щодо залучення H_2S при гострій пошкодженні нирок через інші нефротоксичні речовини, такі як радіоконтрастні речовини, що містять йод та гадоліній, аміноглікозидні антибіотики, нестероїдні антифлогістики тощо.

Гідроген сульфід і хронічна хвороба нирок. Хронічна хвороба нирок (ХХН), (або раніше вживаний термін «хронічна ниркова недостатність») – симптомокомплекс, який розвивається у кінцевій стадії хронічних двобічних захворювань нирок внаслідок поступової необоротної загибелі функціонуючих нефронів і характеризується зниженням функції нирок із розвитком порушень гомеостазу: змінами водно-електролітного складу і кислотно-лужної рівноваги організму на тлі гіперазотемії. У розвинутих країнах Європи ХХН, як правило, розвивається внаслідок вікових змін, діабету, артеріальної гіпертензії, ожиріння та серцево-судинної патології [99].

Діабетична нефропатія (ДН) є однією з найперших причин ХХН. Сучасні дані свідчать про активну роль H_2S в патогенезі ДН. Так, показано, що у хворих з ДН рівень H_2S в плазмі був статистично нижчим, ніж у пацієнтів з цукровим діабетом без ураження нирок, а також у пацієнтів, які перебували на гемодіалізі без цукрового діабету [100]. Крім того, підвищений вміст сульфатів в сечі, який віддзеркалює рівень H_2S у плазмі, асоціюється із нижчим ризиком розвитку ниркових ускладнень при діабеті 2 типу [101] та більш повільним падінням ШКФ у пацієнтів з ДН. Ці дані цілком зіставляються із результатами інших досліджень, які показали зниження ренальної експресії H_2S - продукуючих ензимів (ЦГЛ та ЦБС) у трансгенних мишей з ЦД [64] та щурів із стрептозотоциновим діабетом [101]. Крім того, введення інгібіторів ЦГЛ (пропаргілгліцину) сприяє розвитку глюкозо-індукованих морфологічних порушень подоцитів ниркових клубочків [102], що також свідчить на користь

важливої ролі ендogenous H_2S в при ДН. Біохімічний механізм, що лежать в основі падіння активності основних H_2S -продукуючих ферментів, виділяють підвищення активності матриксних метабопротеїназ, зокрема MMP-9 [103]. Водночас, введення екзогенного H_2S виявилось досить ефективним нефропротективним чинником при ДН як в дослідженнях *in vitro*, так *in vivo*. Так, H_2S нівелював надмірну проліферацію клітин і утворення колагену, індукованих надмірною кількістю глюкози в культурах мезангіальних клітин [104] та клітинах ниркових каналців [105]. Крім того, монотерапія донатором гідроген сульфідом ($NaHS$) [65; 106; 107] або його сумісне застосування разом з лозартаном [108] зменшували ниркову дисфункцію та формування фіброзу нирок на різних моделях ДН. Механізм захисної дії гідроген сульфідом автори пов'язують із: зменшенням продукції вільних радикалів шляхом пригнічення Nrf2, індукованого MMP-9, що спостерігається при гіперглікемії, активацією АМФ-активованої протеїнкінази та пригніченням сигнальних шляхів біосинтезу про-апоптотичних та проліферативних білків (PI3K/Akt/mTORC1), а також стимуляцією утворення NO шляхом індукції експресії iNOS, яка інгібує прооксидантні ферменти (НАФН-оксидази) та утворення реактивних форм кисню [14, 65, 107].

H_2S при гіпертензивній нефропатії. Нефропатія як результат хронічної гіпертензії, є другою за частотою причиною ХХН у всьому світі [109]. Високий артеріальний тиск з часом викликає переважно гломерулярні порушення, що, в свою чергу, ще більше сприяє розладам регуляції артеріального тиску та, як наслідок, ще більшому ушкодженню функції нирок. Таким чином виникає «замкнене коло», що значно погіршує перебіг та прогноз артеріальної гіпертензії. За цих умов стає беззаперечно зрозумілою важлива роль H_2S в контролі АТ. Було встановлено, що генетична недостатність ЦГЛ, так само як інгібування активності ЦБС, зумовлюють розвиток артеріальної гіпертензії та знижує ендотелій-залежну вазорелаксацію [68]. З цих даних випливає, що H_2S є фізіологічним регулятором АТ. Подальші дослідження механізмів судинних ефектів гідроген сульфідом дали підставу вважати H_2S ендотеліальним релаксуючим фактором [110] та ендотеліальним фактором

гіперполяризації. Отримані дані стали підґрунтям для подальших досліджень вазотропних ефектів екзогенного H_2S . Так, Lu et al., 2010, [111] показали, що гіпотензивний ефект донатору H_2S , натрію гідрогенсульфіду, є наслідком інгібуючого впливу на активність реніну в плазмі крові у щурів з генетично високою активністю реніну (2K1C). Інші дослідники продемонстрували гіпотензивний ефект NaHS у спонтанно гіпертензивних щурів [112], мишей, які отримували ангіотензин II [113], і трансгенних мишей sFlt [114]. Нещодавно дослідження [113] показали, що NaHS, або його метаболіт тиосульфат натрію ослаблюють індуковану ангіотензином II протеїнурію, дисфункцію нирок та морфологічну структуру видільних органів. У механізмах захисного ефекту полягає його потужна антиоксидантна дія. Подальші дослідження показали, що побічний ефект H_2S був частково опосередкований пригніченням активності натрієвих каналів в клітинах епітелію нирок [115]. Згідно з одностайною думкою дослідників, H_2S може бути ідеальним кандидатом для лікування гіпертонічної нефропатії.

Гідроген сульфід та гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ). ЦБС є ензимом, що перетворює гомоцистеїн на цистатіонін. Таким чином, гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) виникає або за рахунок зниження експресії ЦБС, або через інгібування його активності. ГГЦ може бути викликаний нестачею вітамінів B_6 , B_9 та B_{12} [116]. ГГЦ асоціюється з підвищеним ризиком атеросклерозом, тромбозів [117] та хворобою Альцгеймера [118]. Підвищення рівня гомоцистеїну пригнічує експресію та активність ензимів, що генерують H_2S – ЦГЛ, ЦБС та 3-MST, що призводить до значного зменшення ендогенної продукції H_2S [115]. ГГЦ глибоко впливає на судинну систему. Це підвищує запалення і нітрозативний стрес, мітофагію в ендотеліальних клітинах, що призводить до їх дисфункції. Зокрема, у нирках існує «порочне коло» метаболізму ГЦ: порушення функції нирок призводить до підвищення ГЦ, що, в свою чергу, призводить до ще більшого пошкодження нирок і втрати їх функції. Хронічна ГГЦ у ЦГЛ-нокаутуваних мишей асоціюється з гломерулосклерозом та протеїнурією, які зменшуються за додаткового введення NaHS [119]. Посилення процесів апоптозу клітин кіркового шару

нирок мишей з ГГЦ пов'язано із підвищеною активністю матриксних металопротеїназ (ММР) -2 і -9, і ці зміни інгібуються введенням NaHS, що дає змогу вважати, що активація ММР бере участь у реконструкції ниркових судин за умов ГГЦ через дефіцит вмісту H_2S у нирках [119].

Підтвердження важливої ролі гідроген сульфїду в регуляції ушкодження нирок, викликаних ГГЦ, отримані також іншими дослідниками. Так, ушкоджувальний вплив ГГЦ у поєднанні зі зниженням H_2S у нирках асоціюється з системною гіпертензією, збільшенням експресії рхосубодиниці NADPH оксидази, гломерулярною інфільтрацією макрофагами та накопиченням колагену IV типу, і ці зміни також були значно меншими при введенні донатору гідроген сульфїду (NaHS). Аналогічну закономірність було виявлено щодо кардіоваскулярної системи та головного мозку. Важливим є той факт, що всі наслідки ГГЦ на судинній системі, міокарді та мозку суттєво зменшуються при введенні донаторів H_2S [120, 121, 122], свідчить про те, що дефіцит H_2S є основним механізмом, який веде до пошкодження тканин при ГГЦ.

Викладені дані переконливо свідчать, що H_2S – це біологічно активна молекула із неосяжним спектром ефектів, значна частина яких ще не визначена. Вплив його на організм залежить від вихідного стану і є високо специфічним. Необхідні поглиблені дослідження необхідні для визначення ролі гідроген сульфїду в окремих фізіологічних та патологічних станах та оцінці цього газотрансмітера як точки прикладання терапевтичної дії. На сьогоднішній день більшість досліджень ефекту H_2S у нирках були в значній мірі обмежені використанням NaHS як донатора H_2S , проте NaHS вивільняє H_2S неконтрольовано і навряд чи буде терапевтичним агентом [59]. Натомість потенційні H_2S -вивільняючі лікарські засоби (такі як GYY4137 або AP39, а також інші сполуки) знаходяться лише на етапі доклінічних випробувань. Інформація про біологічно активні сполуки, здатні вивільняти H_2S , може бути знайдена у Wallace і Wang (2015) [123]. Не менш доцільним, на наш погляд, є дослідження здатності вже відомих лікарських засобів з різними механізмами та спектрами фармакологічної активності, впливати на вміст гідроген сульфїду

в організмі в цілому та в окремих органах. Це питання ще далеке від свого вирішення, хоча в літературі накопичується все більше даних з цього приводу [93, 124, 125, 126]. Подальші дослідження в цьому напрямку дозволить не тільки консолідувати уявлення про захисний ефект H_2S , але також пролити світло на здатність H_2S виступати терапевтичною мішенню при лікуванні захворювань нирок.

1.3 Місце рослинних нефропротекторів у лікуванні захворювань видільних органів

Нефропротективна стратегія – це досить широке поняття, яке включає в себе комплекс заходів, спрямованих на гальмування прогресування ХХН. Звичайно, на першому місці виступає лікування основного захворювання, корекція модифікуючих факторів прогресування патології, однак не менш важливим є фармакотерапевтична ланка [20].

На сьогоднішній день існує така класифікація лікарських засобів та біологічно активних сполук із нефропротекторною дією [за 127]:

Група	Механізм дії	Препарати
1	2	3
Препарати, що інгібують ренін-ангіотензин-альдостеронову систему	інгібітори АПФ	каптоприл, еналаприл, лізиноприл, фозиноприл
	блокатори рецепторів ангіотензину II	лосартан, валсартан
	інгібітори реніну	аліскірен
Антигіпертензивні та інші кардіоваскулярні препарати з додатковими механізмами нефропротекторної дії	блокатори кальцієвих каналів недигідропіридинові	лерканідипін
	агоністи I_1 -імідазолінових рецепторів	моксонідин, рилменідин
	інгібітори нейтральної вазопептидази	оматрилат

	активатори калієвих каналів	флокалін
	периферичні вазодилататори (пурини)	пентоксифілін
Препарати, що нормалізують обмін ліпідів, із додатковими механізмами нефропротекторної дії	стати́ни	симвастатин, аторвастатин, ловастатин
Гіпоурикемічні ЛП	інгібітори синтезу сечової кислоти	алопуринол
Препарати, що відновлюють структуру клубочкової базальної мембрани та нормалізують обмінні процеси при діабетичній нефропатії	глікозаміноглікани	сулодексид
	інгібітори неферментативного глікозилювання білків	аміногуанідин, піридоксамін
	інгібітори альдозоредуктази	толрестат, статил
Препарати, що протидіють колапсу каналців при гострій нирковій недостатності (ГНН)	діуретики	петльові — фуросемід, осмотичні — манітол
	препарати, що відновлюють об'єм внутрішньосудинної рідини	інфузійні розчини
1	2	3
Антигіпоксанти та антиоксиданти	препарати політропної метаболічної дії	мексидол, тіотріазолін, тіоцетам, мельдоній, мелатонін
	антиоксиданти із різним механізмом дії	токоферол, кислота аскорбінова, церулоплазмін та ін
Стимулятори репарації	синтетичний гексапептид, аналог лейциненкефаліну з антипротеолітичним ефектом	даларгін

Окремої уваги заслуговують прпарати природних сполук, які виявляють здатність захищати нирки від ушкоджень та мають політропну органопротекторну дію [за 127]:

Походження	Хімічна будова	Препарати
------------	----------------	-----------

1	2	3
Індивідуальні БАР рослинного походження	флавоноїди	кверцетин, гіперозид, робінін, комплекс L-лізину байкалілату та солей аргініну та гістидину, артонін Е, лікохалкон А, астрагалін, бутеїн, гесперидин, катехін, кемпферол, фізетин, лютеолін, морин, нарингін, нарингенін, цинарозид
	похідні гідроксикоричних кислот	актеозид, літоспермова кислота В, сальвіанолова кислота В
	похідні хромену	метилрипаріохромен А
	діарилгептанони	куркумін
	флаволігнани	силібін, силібінін, силікрістин
	стильбени	ресвератрол
	антраценпохідні	емодин, фісцеон та їх похідні
	лігніни	нордигідрогуаретова кислота
	таніни	проціанідин-В-2 3,3'-ди-О-галат, RG-танін
	інші фенольні сполуки	елагова кислота, епігалокатехінгалат
	тритерпенові сапоніни	алісоли, бетулін, гінсенозиди, гліцеритину-3-монодесмозид, гліциризин, лупеол, олеанолова та урсолова кислоти, протопанаксادیол, протопанаксатріол, сайкосапонін-а, сайкосапонін-d)
	терпенові трилактони	(білобалід)
	фітоекдистероїди	екдистерон, туркестерон
	каротиноїди	астаксантин, кроцин, лікопін
	алкалоїди	берберин, гренландицин, епіберберин, магнофлорин, пальматин, ятроризин, копизин, фелодендрин, хелеритрин
аміди	капсаїцин	
похідні амінокислот, пептиди, інші речовини	S-алілцистеїн, Gly-Arg-γ-Glu-Val-NH ₂ , астрагалозиди, діаліл дисульфід, криптотаншинон,	

		лігустрозин, натрію L-малат, тимохінон та ін.
	фітоекдистероїди	екдистерон, туркестерон
	каротиноїди	астаксантин, кроцин, лікопін
Сумарні препарати ЛР	леспедеди двоколірної та головчастої леспенефрил, леспефлан	
	артишоку посівного, бегонії червонолистої, гінкго дволопатевого, яглиці звичайної, золотушника канадського, вовчуга польового, сої культурної.	
Багатокомпонентні фітопрепарати.		

Кожний з цих препаратів має власні особливості фармакодинаміки, свої показання та застереження при застосуванні, які часто обмежують ефективну фармакокорекцію уражень видільних органів. Тому пошук нових підходів до підвищення захисної дії щодо нирок продовжує залишатись актуальним завданням фармакології. Існує гостра необхідність в уповільненні темпів прогресування хронічних захворювань нирок до термінальної стадії ХХН. Беручи до уваги те, що ХХН може розвиватись внаслідок хронізації гострих уражень нирок, ускладнень інших захворювань (цукровий діабет, серцево-судинна патологія тощо), кожне з яких вимагає постійного та тривалого медикаментозного лікування, а також бути наслідком побічної дії численних лікарських засобів, стає зрозумілим парадигма нефрології та сучасної медицини в цілому щодо використання найбільш фізіологічних та комплексно діючих засобів, які мають достатню органопротективну активність та мінімальну кількість побічних реакцій, навіть за умов тривалого застосування [128].

Особливості сучасного екологічної ситуації в світі, загальне постаріння населення планети, а відтак – збільшення кількості пацієнтів із великою кількістю супутніх захворювань пояснюють зростаючу популярність фітопрепаратів в лікуванні багатьох захворювань, у т.ч. нирок. Сукупність позитивних фармакологічних властивостей, здатність органічно «включатись» у біохімічні процеси в організмі, низька алергезуюча дія та привабливий фармакоеконічний профіль зумовлює ефективне їх використання.

Аналіз літературних джерел свідчить про значну кількість лікарських рослин із нефропротективними властивостями. Сюди відносять пол-пала (ерва шерстиста), хвощ польовий, мучниця, брусниця, ортосифон, береза, кавун звичайний, марена красильна, спориш, яглиця звичайна, золотушник канадський, вовчуг польовий, гінко, бегонія червонолиста, ревіль туркестанський, кропива дводомна, розторопша плямиста, стінниця іудейська, еврикома довголиста, трьохкрильник Вільфорда та багато інших, ниркові збори та фітосаї [129-135]. Таким вимогам відповідають природні поліфенольні сполуки, зокрема, флавоноїд кверцетин. Наразі доведено ефективність кверцетину та препаратів на його основі при гострих та хронічних ураженнях нирок [136-145].

Цей флавоноїд має плейотропну органопротекторну дію, в механізмах якої приймає участь його протизапальна, антиоксидантна, антигіпоксична активність, спроможність запобігати або зменшувати процеси некрозу та апоптозу у нирках, протидіяти протеїнурії та ензимурії, нормалізувати або підтримувати функціональні показники роботи нирок, в т.ч. клубочкову фільтрацію, діурез, концентраційну функцію нирок, тощо. Хімічна формула цього поліфенолу наведена на рис. 1.1.

Багатогранна нефропротекторна активність із залученням зазначених ефектів, патогенетично важливих при хронічній хворобі нирок, притаманна не лише флавоноїдам, але й представникам інших груп рослинних БАР [146]. Серед них стильбеноїд ресвератрол (див. рис.1.1), який часто стає центром уваги численних досліджень, головним чином завдяки наявності потужної антиоксидантної, протизапальної та антиапоптотичної дії, що є важливим у лікуванні та профілактиці численних серцево-судинних та онкологічних захворювань [147, 148, 149, 150].

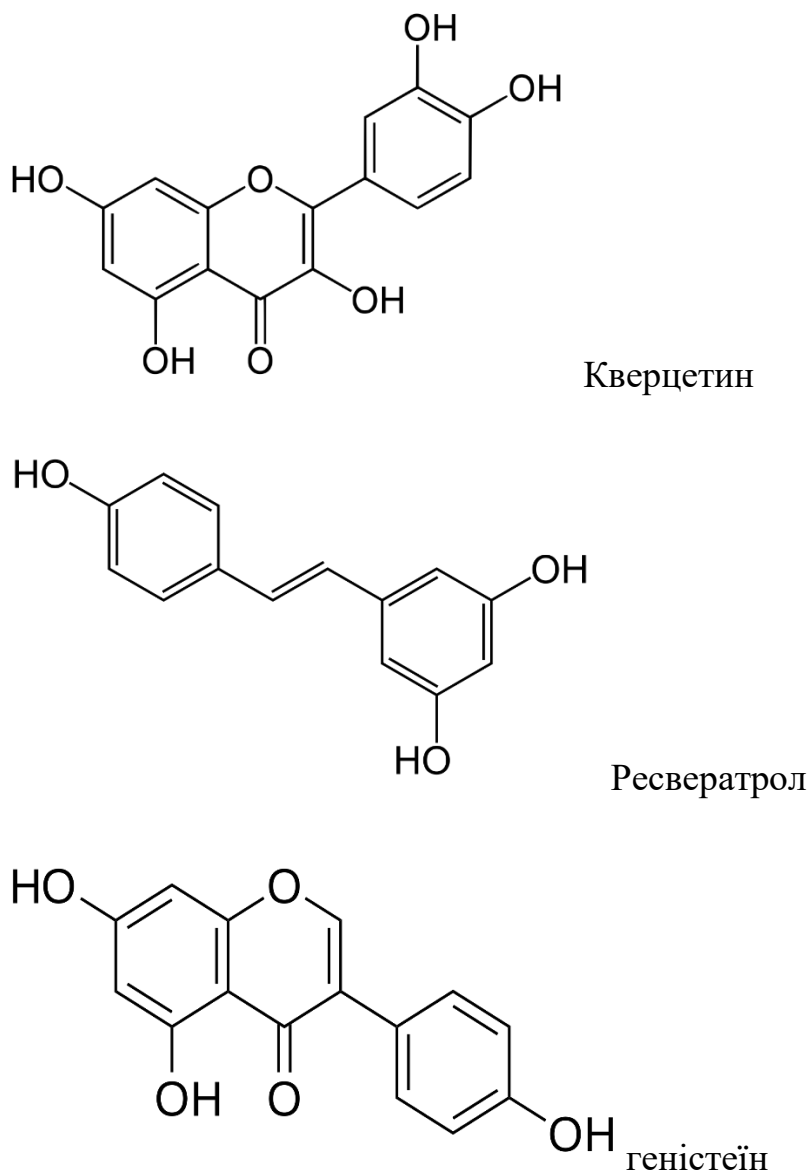


Рис.1.1 Хімічні формули кверцетину, ресвератролу та геністеїну

Описані властивості ресвератролу значно зменшувати ушкодження нирок у спонтанно гіпертензивних щурів з ХХН, діабетичною нефропатією, сепсисом та ін., що пов'язано із протизапальними та антиоксидантними його ефектами, здатністю інгібувати експресію прозапальних цитокінів (IL-6, ICAM-1 and MCP-1) шляхом регуляції ядерної транслокації NF-κB, супресією толл-лайн рецепторів [151]. Нефропротекторний потенціал ресвератрола описаний також на інших моделях гострого та хронічного ураження нирок [19, 152-155].

Потужна антиоксидантна дія притаманна також і класу ізофлавонів, серед яких найбільшу антирадикальну дію має геністеїн (див рис.1). Він, як і

ресвератрол, може виявляти пряму антиоксидантну дію, а також підвищувати активність таких ензимів антиоксидантного захисту як глутатіонпероксидаза, супероксиддисмутаза та глутатіонредуктаза у нирках [156]. Антиоксидантні, цитопротекторні, остеотропні, антиапоптотичні та протипухлинні ефекти геністеїну зумовлені також його властивістю бути агоністом-антагоністом естрогенових рецепторів [157]. Оскільки геністен є природним фітоестрогеном, він проявляє захисну дію як на жіночий, так і на чоловічий організм, головним чином, через негеномні механізми, і при цьому не впливає на рівень тестостерону [157]. У попередніх дослідженнях встановлена здатність геністеїну та кверцетину виявляти нпротективну дію за умов диклофенак-індукованої нефротоксичності в експерименті [158], а також інших ураженнях нирок [159-163].

Зазначене вище дає змогу вважати, що подальше досконале вивчення нефропротекторної активності природних поліфенольних сполук за умов хронічної ниркової недостатності вважати доцільним та актуальним.

Таким чином, аналіз світової літератури свідчить, що як гострі, так і хронічні ураження нирок залишаються важливою проблемою сучасної нефрології та фармакології. Різноманітність механізмів розвитку ниркової недостатності породжує значний поліморфізм клінічних проявів захворювання, а значний функціональний резерв нефронів обумовлює тривалий безсимптомний її перебіг. Часто патологія нирок виявляється вже на стадії незворотних змін. Тому питання дослідження молекулярних механізмів захисного потенціалу видільних органів набуває особливої ваги з огляду на можливість визначення додаткових маркерів нефротоксичності та розробки патогенетично обґрунтованих підходів до попередження і медикаментозного лікування ураження нирок.

Враховуючи вищезазначене, питання, як змінюється робота нирок при ХХН за умов впливу донаторів гідроген сульфід та інгібіторів його синтезу, а також особливості стану регуляторних систем функціонування видільних органів при хронічній хворобі нирок у щурів за різної насиченості організму гідроген сульфідом, потребують додаткового дослідження.

Невідомими на сьогодні залишаються вплив лікарських засобів з нефропротекторною дією, зокрема, природних поліфенольних сполук, на систему гідроген сульфід.

Подальші дослідження в цьому напрямку не тільки сприятимуть більш глибокому розумінню механізмів розвитку цих патологічних станів, але й дають змогу обґрунтувати роль гідроген сульфід як молекулярної мішені для покращення нефропротекції.

В якості робочої гіпотези можна вважати, що синергізм фармакодинамічних ефектів поліфенольних сполук рослинного походження в умовах підвищеного вмісту в організмі рівня гідроген сульфід сприятиме більш ефективній нефропротекції, що дасть змогу сповільнити прогресування захворювання та покращити фармакотерапію хронічної хвороби нирок на додіалізованому етапі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Характеристика експериментальних тварин

Для проведення дослідження було використано 260 білих щурів-самців лінії Вістар, отриманих з віварію ДЗ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», початковою масою 280-330 г. Піддослідні тварини утримувались в умовах віварію Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Досліди виконувались однієї пори року (навесні), розпочинались в першій половині дня. Піддослідні тварини знаходились на карантині протягом 10 днів. За 1 день до початку експериментів тварин переносили до приміщення наукової лабораторії кафедри фармакології ВНМУ для адаптації. Рандомізація тварин виконувалась методом кольорових міток. Всі етапи досліджень виконані згідно з правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин та Міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами, дотримуючись правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» [164] у відповідності з директивою Ради ЄС 86/609 ЄС від 24 листопада 1986 р. про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети [165]. Під час експериментів тварин утримували в стандартних умовах (температура навколишнього середовища 21-25 °С, відносна вологість повітря 54-59 %, та 12-годинному режимі день-ніч та з доступом до води та їжі *ad libitum*) віварію ВНМУ імені М. І. Пирогова, згідно з передбаченими нормами [165, 166]. Загальна кількість тварин та їхній розподіл у залежності від етапу досліджень представлені в таблиці 2.1.

Розподіл щурів у залежності від етапу досліджень

Етап досліджень	Кількість тварин
1. Визначення вплив дефіциту та надлишку гідроген сульфід у на перебіг гострого та хронічного ураження нирок	80
1.1. Визначення функціональних та біохімічних показників роботи нирок за гострого міоглобінуричного ураження за умов введення пропаргілгліцину та натрія гідрогенсульфід у	40
1.2. Визначення функціональних та біохімічних показників роботи нирок на моделі одnobічної нефректомії та субтотальної резекції контралеральної нирки («модель 5/6 нефректомія» за умов введення пропаргілгліцину та натрію гідрогенсульфід у	40
2. Дослідження ролі системи гідроген сульфід у в механізмах ураження нирок щурів за умов експериментальної хронічної хвороби нирок	30
3. Дослідження впливу поліфенолів на метаболізм гідроген сульфід у та показники функціонування нирок у тварин з експериментальною хронічною хворобою нирок	50
4. Дослідження впливу поліфенолів на метаболізм гідроген сульфід у та показники функціонування нирок в умовно здорових щурів	40
5. Дослідження морфологічних змін у нирках щурів з хронічною хворобою нирок на тлі впливу натрію гідрогенсульфід у та геністеїну	40
6. Дослідження показників клітинного циклу та фрагментації ДНК у нирках щурів з хронічною хворобою нирок на тлі впливу натрію гідрогенсульфід у та геністеїну	20

Всього тварин

260

Всі фармакологічні дослідження виконані на базі Науково-дослідної лабораторії доклінічного вивчення фармакологічних речовин (свідоцтво МОЗ України про переатестацію № 023/13 від 05.03.2013 р., свідоцтво про технічну компетентність №030/18 від 1 листопада 2018 р., чинне до 31 жовтня 2023 р.) за допомогою доцента кафедри фармакології к.мед.н. І. В. Тарана.

2.2 Експериментальні моделі

При проведенні досліджень використовували моделі ураження нирок відповідно до методичних рекомендацій [167, 168].

Гостре рабдоміолітичне ураження нирок у щурів викликали шляхом введення 50 % розчину гліцеролу (Гліцерин дистильований, АТ «Галичфарм», Україна) внутрішньом'язово дозою 10 мл/кг у м'язи задніх лапок тварин.

Хронічне ураження нирок відтворювали у два етапи: тотальна резекція лівої нирки з субтотальною (5/6) нефректомією контрлатеральної нирки [169]. Як анестезіологічне забезпечення було використано 5 % розчин кетаміну (2 мл/кг інтраперитонеально), тварини було зафіксовані в правому бічному положенні. Після дезінфекції та гоління було зроблено розріз шкіри довжиною 2 см, перпендикулярно лівій стороні хребта. Потім м'язи розрізали, і ліву нирку повністю видаляли. Потім м'язи та шкіру зашивали з подальшою дезінфекцією швів. Через 1 тиждень проводили другий етап оперативного втручання. Доступ до правої нирки було відкрито. Після відділення капсули нирки 2/3 гілок правої ниркової артерії біли перев'язані. Ушкоджену поверхню нирки обробляли гемостатичною губкою для зупинки кровотечі. Нирку, що залишилась, вміщували в черевну порожнину, м'язи та шкіру пошарово зашивали з наступною дезінфекцією швів.

Псевдооперованим тваринам проводили розріз тканин, оголювали нирки і проводили декапсуляцію обох нирок з інтервалом в 1 тиждень, ретельно стежачи, щоб не порушити роботу наднирникових залоз.

2.3 Вибір доз досліджуваних сполук

Дефіцит та надлишок гідроген сульфід у створювали внутрішньоочеревним введенням, відповідно, пропаргілгліцину (PPG) (Sigma, USA), 10 мг/кг та натрію гідрогенсульфід (NaHS) (Sigma, USA), 3 мг/кг 1 раз на добу [170] за 5 днів до моделювання патології та протягом всього терміну

розвитку ниркової недостатності. Тварини контрольної групи та псевдооперовані щури отримували еквіоб'ємні кількості розчинників. Функціональні та біохімічні зміни у нирках оцінювали на 3 добу за умов гострого ураження нирок та на 41 добу після відтворення ХХН.

Щурам трьох дослідних груп вводили внутрішньошлунково 1 раз на 1 добу відповідно геністеїн (5 мг/кг), ресвератрол (50 мг/кг) і кверцетин (20 мг/кг) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) у 30 % розчині диметилсульфоксиду з розрахунку 0,5 мл на 100 г маси тварини. Дози поліфенольних сполук знаходились у межах доз, які за даними літератури виявляли позитивні нефропротекторні властивості [17, 18, 19, 20] та відповідали таким, що мають позитивний вплив на роботу нирок у тварин без експериментального ураження [171]. Псевдооперовані і контрольні щури отримували еквіоб'ємні кількості розчинників.

2.4 Біохімічні методи дослідження

Дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію № 049/15 від 02 березня 2015 р.) за допомогою д.мед.н., професора А. В. Мельника.

Матеріалом для дослідження служили плазма крові, сеча та постядерний супернатант гомогенату нирок.

Приготування матеріалу для досліджень. Для отримання сечі, щурам давали водне навантаження, яке відтворювали шляхом внутрішньошлункового введення (крізь металевий зонд) питної води з температурою 35-37 °С в об'ємі 5 % від маси тіла тварини. Тварин поміщали в індивідуальні обмінні клітки, де протягом 8 год збирали сечу, а потім її відфільтровували.

Після цього проводили декапітацію тварин під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрій, 80 мг/кг), дотримуючись положень Директиви Європейського союзу 2010/63 EU про захист тварин, що використовуються у

наукових цілях, після декапітації у тварин збирали кров. ЕДТА-плазму отримували шляхом центрифугування крові при 1500 об/хв. протягом 20 хв. Аліквоти плазми крові відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення аналізу зберігали при -20°C .

Нирки подрібнювали ножицями, перфузували холодним 1,15 % розчином KCl і гомогенізували при 3000 об/хв (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % калію хлориду (співвідношення 1:3). Гомогенати центрифугували упродовж 30 хв при 600 g, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20°C .

Для визначення вмісту H_2S нирки промивали холодним 1,15 % розчином KCl, подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 0,01 M NaOH у співвідношенні 1 : 5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50 % ТХО, центрифугували при 1200 g 15 хв і отримували супернатант, який негайно використовували для досліджень.

Досліджували наступні біохімічні та функціональні показники:

1. Активність цистатіонін- γ -ліази у нирках
2. Активність цистатіонін- β -синтази у нирках
3. Активність цистеїнамінотрансферази у нирках
4. Швидкість утилізації екзогенного гідроген сульфід у нирках
5. Вміст гідроген сульфід у нирках
6. Діурез
7. Вміст креатиніну в плазмі крові та сечі
8. Вміст іонів натрію в плазмі крові та сечі
9. Вміст іонів калію в плазмі крові та сечі
10. Швидкість клубочкової фільтрації
11. Реабсорбцію води у нирках
12. Екскреція білка з сечею
13. Вміст білка у нирках
14. Активність НАДФН-оксидази у нирках
15. Активність супероксиддисмутази у нирках
16. Вміст малонового діальдегіду у нирках

17. Вміст карбонільних груп протеїнів у нирках
18. Вміст сульфгідрильних груп білків у нирках
19. Вміст дисульфідних груп білків у нирках
20. Співвідношення білкових сульфгідрильних та дисульфідних груп білків у нирках
21. Активність ендотеліальної та індукцибельної ізоформ NO-синтази

Розрахунковими методами визначали наступні показники транспорту іонів натрію: **фільтраційну фракцію Na^+** ($\text{FF Na}^+ = \text{ШКФ} \cdot \text{PNa}^+$), де ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації; PNa^+ - концентрація іонів Na^+ в плазмі крові; **абсолютну реабсорбцію Na^+** ($\text{RF Na}^+ = \text{ШКФ} \cdot \text{PNa}^+ - \text{V} \cdot \text{UNa}^+$), де V – хвилиний діурез; UNa^+ - концентрація іонів Na^+ в сечі; **відносну реабсорбцію Na^+** ($\text{RF Na}^+ \% = ((\text{FF Na}^+ - \text{UNa}^+) / \text{FF Na}^+) \cdot 100\%$).

Вміст H_2S визначали спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності FeCl_3 [172]. Активність H_2S -синтезуючих ензимів ЦГЛ (КФ 4.4.1.1), ЦБС (КФ 4.2.1.22), ЦАТ (КФ 2.6.1.3) оцінювали в адаптованих нами інкубаційних середовищах за приростом сульфід-аніону [173]. Концентрації субстратів та кофакторів, значення рН та тривалість інкубації, які забезпечували оптимальні умови визначення активності ензимів, були підібрані априорі. До 0,5 мл інкубаційного середовища додавали 0,2 мл (2 мг протеїну) постядерного супернатанту нирок. Проби інкубували при 37 °C 60 хв у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для попередження втрат H_2S). Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, додавали 1 % розчин цинк ацетату для зв'язування утвореного H_2S . Контрольні проби обробляли як і дослідні за винятком того, що досліджуваний матеріал вносили в середовище після інкубації та охолодження. Вміст H_2S у середовищі визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном у присутності FeCl_3 [174].

Здатність нирок до утилізації екзогенного H_2S визначали за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніону в інкубаційному середовищі [175]. До 1,0 мл інкубаційного середовища, що містило 312 мкМ Na_2S , 0,47 мМ Трис-

НСІ буферу (рН 7,4) в кінцевих концентраціях додавали 0,1 мл постядерного супернатанту гомогенату нирок (кількість білка – 1-2 мг), інкубували 30 хв при 37 °С у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf. Контрольні проби інкубували без гомогенату, який додавали лише після зупинки реакції. Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, після чого додавали 0,5 мл 1 % розчину цинк ацетату для зв'язування сульфід-аніону і визначали його кількість за реакцією утворення метиленового синього відомими методом [174]. Пробірки витримували 20 хв при 18-25 °С, додавали 1 мл 20 % трихлороцтової кислоти, центрифугували 10 хв. при 1500 g. Вимірювали абсорбцію надосадової рідини на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 670 нм. Стандартом служили водні розчини $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ з концентраціями 31,2-3120 мкМ, які обробляли як дослідні проби.

Вміст креатиніну в сироватці крові та сечі визначали за методом Яффе з використанням стандартних наборів фірми Філісіт-Діагностика, Україна. Кліренс креатиніну та реабсорбцію води розраховували за відомими формулами [176]. Вміст іонів Na^+ та K^+ в сироватці крові та сечі визначали спектрофотометричним методом за стандартним набором фірми Філісіт-Діагностика, Україна.

Вміст білка визначали мікробіуретовим методом з реактивом Бенедикта [177], малонового діальдегіду (МДА) – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [178], карбонільних груп білків (КГ) – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [179]. Рівень протеїнових SH-груп в плазмі крові визначали за реакцією з реактивом Елмана – 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоатом) . Вміст дисульфідних груп оцінювали за приростом SH-груп в плазмі крові після інкубації з відновником дитіотреїтолом [180].

Активність супероксиддисмутази оцінювали за відсотком гальмування окиснення кверцетину [179], НАДФН-оксидази – за ступенем поглинання НАДФН при 340 нм [181]. Сумарну активність NO-синтаз встановлювали за кількістю утвореного нітрит-аніону (NO_2^-) після інкубації постядерного супернатанту гомогенату мозку протягом 60 хв в середовищі, 1 мл якого містив 50 мМ KH_2PO_4 -NaOH-буфер (рН 7,0), 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 1 мМ

НАДФН, 2,2 мМ L-аргініну. Для визначення активності індукбельної ізоформи NO-синтази в інкубаційне середовище для зв'язування ендogenous кальцію замість CaCl_2 вносили ЕДТА в кінцевій концентрації 4 мМ. Активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази розраховували як різницю сумарної активності та активності ендотеліальної ізоформи [183]. Вміст метаболітів оксиду азоту – нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Гріса - 0,2 % на 12 % розчині оцтової кислоти [184], після попереднього осадження білків ацетонітрилом. Нітрати попередньо відновлювали до нітритів сумішшю, яка містила цинковий порошок та розчин аміаку.

2.5 Гістологічні методи дослідження

Морфологічні дослідження тканини нирок проводилися на базі лабораторії кафедри гістології ВНМУ ім. М. І. Пирогова під керівництвом доцента А. П. Короля. Тварини були розподілені на 4 групи, залежно від умов експерименту, по 10 тварин в кожній. Щурі 1-ї групи (контрольна) – псевдооперовані тварини, яким було проведено серединний розтин передньої черевної стінки з наступним пошаровим ушиванням операційної рани. Щурам 2, 3 та 4 групи проводили експериментальне моделювання хронічної ниркової недостатності – ХХН (однобічна нефректомія та субтотальна (5/6) резекція контрлатеральної нирки). Тварини 3 та 4 груп починаючи з 2 доби після моделювання ХХН отримували інтрагастрально натрій гідроген сульфід - NaHS (3 мг/кг маси тіла, 1 раз на добу). Щурі 4 групи починаючи з 2 дня після операції отримували геністеїн (5 мг/кг в/шл), псевдооперовані тварини отримували інтрагастрально 0,9 % розчин натрій хлориду (з розрахунку 0,1 мл/кг маси тіла, 1 раз на добу). Евтаназію тварин здійснювали під тіопенталовим наркозом (у дозі 30 мг/кг маси інтраперитонеально).

Гістоморфологічне дослідження нирок щурів проводили на 41-у добу експерименту стандартними методами світлової мікроскопії [185]. У зазначений термін тварин виводили з досліду, нирки вилучали та фіксували в

10 % розчині нейтрального забуференого формаліну (рН 7,2-7,4), після чого дегідрували в розчинах етилового спирту зростаючої концентрації і заливали парафіном. З блоків на санному мікротомі виготовляли, які проходили через весь орган, товщиною 5-6 мкм. Після депарафінізації їх забарвлювали гематоксилін-еозином і вивчали в світловому мікроскопі при збільшеннях об'єктива $\times 4$ - $\times 10$. Гістологічні препарати отримували на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Германія) та за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германія).

Оцінювали стан клубочкового апарату та тубулоінтерстиціальної зони єдиної нирки щурів з експериментальною ХХН, а також на тлі введення донатору гідроген сульфід, або геністеїну та псевдооперованими тваринам.

2.6 Цитометричні методи дослідження

Протоково-цитометричний аналіз проводився на базі Науково-дослідного центру функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М. І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво МОЗ України про переатестацію № 050/15 від 02 березня 2015 р.), за безпосередньої участі співробітника ст.н.с., к.мед.н., доцента кафедри очних хвороб І. Л. Черешнюка (консультант з протокової цитометрії).

Досліди проведені на 20 щурах-самцях лінії Вістар. Тварини були поділені на 4 групи ($n = 5$). 1 група – псевдопроперовані тварини, яким було проведено серединний розтин передньої черевної стінки з наступним пошировим ушиванням операційної рани. 2 група – експериментальна модель хронічної хвороби нирок (однобічна нефректомія та субтотальна резекція контрлатеральної нирки), які отримували розинник. Щурам 3 групи на тлі ХХН, починаючи з 2-ї доби після останньої операції, внутрішньошлунково вводили відповідно, геністеїн (5 мг/кг), а тваринам 4 групи – внутрішньочеревно вводили донатор гідроген сульфід – NaHS (3 мг/кг).

Вміст ДНК в ядрах клітин кіркового шару нирки в щурів визначали методом проточної ДНК-цитометрії.

Суспензії ядер з клітин кіркової речовини нирки щурів отримували за допомогою набору для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 1 фірми Partec, Німеччина, відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний набір дозволяє виконувати екстракцію ядер та маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI). У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі «Partec PAS» (Partec, Німеччина). Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. Циклічний аналіз виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) у повній цифровій відповідності згідно математичної моделі, де визначались:

G0G1 – відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2 с);

S – відсоткове співвідношення фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2 с та < 4 с);

G2 + M – відсоткове співвідношення фази G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4 с);

Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах – RN1 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2 с.

2.7 Методи статистичної обробки результатів

Статистичну обробку отриманих результатів проводили в програмі «STATISTICA 6.1», дані представляли як середню (M) і похибку середньої (m) та середнє квадратичне відхилення (σ). Визначення характеру розподілу ознак у вибірці здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Віллка. Достовірність різниці між показниками оцінювали з використанням параметричного t-

критерію Ст'юдента (за нормального розподілу) та непараметричного U-критерію Манна-Вітні (у разі невідповідності нормальному розподілу). При використанні непараметричного U-критерію цифрові дані наведено у вигляді медіани (Me) та інтерквартильного розмаху [25 %, 75 %]. Відмінності вважали вірогідними в разі $p < 0,05$. Для визначення кореляції між двома незалежними показниками використовували непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена.

РОЗДІЛ 3

РОЛЬ СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ УРАЖЕННЯ НИРОК ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК

Гідроген сульфід (H_2S) є важливою біологічно-активною сполукою, яка синтезується нирками в достатньо значимих кількостях і регулює основні фізіологічні функції нирок [13, 14, 15, 55, 57]. Утворення H_2S у нирках забезпечують три основні піридоксальфосфат-залежні ензиматичні системи: 1) цистатіонін- γ -ліаза (ЦГЛ) каталізує утворення H_2S в реакції гідролітичного розщеплення цистеїну; 2) цистатіонін- β -синтаза (ЦБС) забезпечує утворення H_2S в реакції коденсації цистеїну та гомоцистеїну; 3) цистеїнамінотрансфераза (ЦАТ) бере участь в утворенні H_2S у реакції трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом. Утилізація H_2S у нирках відбувається переважно в реакціях окиснення з утворенням сульфідів та сульфатів, які елімінуються з сечею. H_2S у нирках відіграє важливі біологічні функції: 1) має властивості антиоксиданта та цитопротектора; 2) стимулює процеси фільтрації у нирках; 3) активує екскрецію іонів Na^+ та K^+ з сечею; 4) зменшує активність ренін-ангіотензин-альдостеронової системи.

Порушення метаболізму гідроген сульфїду полягає в основі ураження нирок. На сьогодні існують досить суперечливі дані щодо спрямованості змін метаболізму H_2S за різних патологічних станів у нирках [85, 84, 94, 98], зокрема, при гострому та хронічному ураженні видільних органів. Показано, що за умов ішемії / реперфузії нирок відмічається зменшення активності H_2S -продукуючих ензимів та зниження рівня H_2S у нирках. Застосування за цих умов донатору H_2S – натрій гідрогенсульфїду ($NaHS$) виявляло потужну нефропротективну дію. В той же час за гострого ураження нирок цисплатином та доксорубіцином відмічались протилежні зміни в системі H_2S – зростали активність H_2S -продукуючих ензимів та рівень H_2S . За цих умов нефропротекторні властивості виявляв інгібітор ЦГЛ – пропаргілгліцин. На сьогодні практично відсутні дані щодо впливу експериментальної хронічної

хвороби нирок на процеси ензиматичного синтезу та утилізації H_2S у нирках. Залишається невивченим вплив модуляторів обміну H_2S (пропаргілгліцину – інгібітору ЦГЛ, а також NaHS – донатору H_2S) на функціональний стан нирок щурів за хронічної ниркової недостатності. Саме цим невирішеним питанням присвячений цей розділ дисертаційного дослідження.

3.1 Дослідження показників метаболізму гідроген сульфїду у нирках щурів та їх зв'язку з маркерами функціонального стану нирок за умов експериментальної хронічної хвороби нирок у щурів

Для відтворення експериментальної хвороби нирок (ХХН) було застосовано хірургічну модель (субтотальна (5/6) нефректомія), яка подібна до ХХН у людини, оскільки характеризується наявністю анемії, протеїнурії, артеріальної гіпертензії. Мікроскопічно в нирках виявляються гломерулосклероз, артеріолосклероз, інтерстиціальний фіброз, атрофія каналцевих клітин [167-169]. Функціональні, біохімічні та морфологічні зміни оцінювали на 41 добу після першої операції.

Було встановлено, що експериментальна ХХН у щурів супроводжується пригнічувальним впливом на ензиматичну продукцію H_2S у нирках (табл. 3.1). За цих умов реєструється вірогідне зменшення утворення H_2S в реакції гідролітичного розщеплення цистеїну за участі ЦГЛ. В групі псевдооперованих тварин (контроль) активність ЦГЛ у нирках коливається в діапазоні 1,38-1,92 нмоль H_2S / хв·мг протеїну. В той же час, у тварин з ХХН активність ЦГЛ у нирках знаходилась в межах 1,02-1,47 нмоль H_2S / хв·мг протеїну і була достовірно меншою на 28,3 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем.

ХХН у щурів викликала зниження синтезу H_2S в реакції конденсації цистеїну з гомоцистеїном за участі ЦБС. Доказом цього було вірогідне зниження активності ЦБС у тварин з ХХН, порівняно з контролем. У групі псевдооперованих тварин активність ЦБС у нирках знаходилась в межах 1,71-2,73 нмоль H_2S / хв·мг протеїну. Натомість, у тварин з ХХН активність ЦБС у

нирках становила 1,31-1,70 нмоль H_2S / хв·мг протеїну і за середніми величинами була достовірно меншою на 30,2 % ($p < 0,05$), відносно групи контролю.

Експериментальна патологія нирок у щурів призводила до зменшення продукції H_2S в реакції трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом за участі ЦАТ, доказом чого було вірогідне зниження активності ЦАТ у нирках щурів. В контрольній групі щурів активність ЦАТ перебувала в діапазоні 1,81-2,89 нмоль H_2S / хв·мг протеїну. За умов ХХН у щурів активність цього ензиму становила 1,07-1,91 нмоль H_2S / хв·мг протеїну, що за середніми величинами була на 34,2 % меншою ($p < 0,05$), ніж в групі псевдооперованих тварин.

Таблиця 3.1

Активність H_2S -продукуючих ензимів у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Активність ензимів, нмоль H_2S / хв·мг протеїну		
	ЦГЛ	ЦБС	ЦАТ
Псевдооперовані тварини	1,72 \pm 0,06	2,24 \pm 0,10	2,43 \pm 0,12
ХХН	1,23 \pm 0,05*	1,56 \pm 0,04*	1,60 \pm 0,08*

Примітка. * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин.

Дослідження швидкості неензиматичної утилізації екзогенного H_2S у нирках щурів показало, що ХХН асоціюється з прискоренням окисної деградації H_2S (рис. 3.1). В контрольній групі тварин медіана швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках становила 0,782 (95 % СІ 0,718-0,838) нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 0,753-0,820 нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну. За ХХН у щурів швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках була більшою на 34,3 % ($p < 0,05$), медіана дорівнювала 1,05 (95% СІ 0,973-1,13) нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну, а інтерквартильний розмах – 1,01-1,09 нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну.

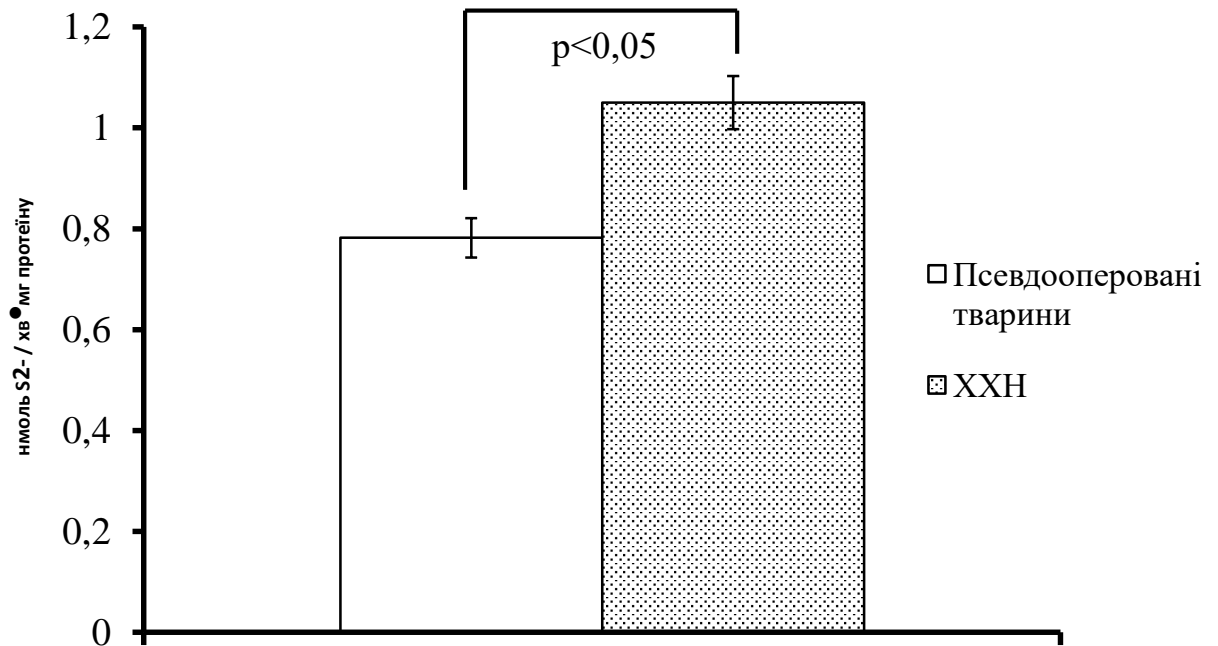


Рис. 3.1 Швидкість утилізації екзогенного H₂S у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, M ± m, n = 10).

Експериментальна ниркова недостатність супроводжується зменшенням вмісту H₂S у нирках щурів (рис. 3.2). Так, в групі псевдооперованих тварин медіана вмісту H₂S у нирках становила 3,73 (95 % СІ 3,36-4,26) нмоль / мг протеїну, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 3,59-4,00 нмоль / мг протеїну. У групі щурів з ХХН за середніми показниками вміст H₂S у нирках був меншим на 35,8 % (p < 0,05), медіана становила 2,33 (95 % СІ 1,95-3,13) нмоль / мг протеїну, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 2,21-2,53 нмоль / мг протеїну.

Формування дефіциту H₂S у нирках щурів за умов ХХН є закономірним явищем і, ймовірно, супряжено зі зростанням швидкості його утилізації в реакціях неензиматичного окиснення та зниженням ензиматичного утворення H₂S в реакціях, які каталізуються ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ у нирках.

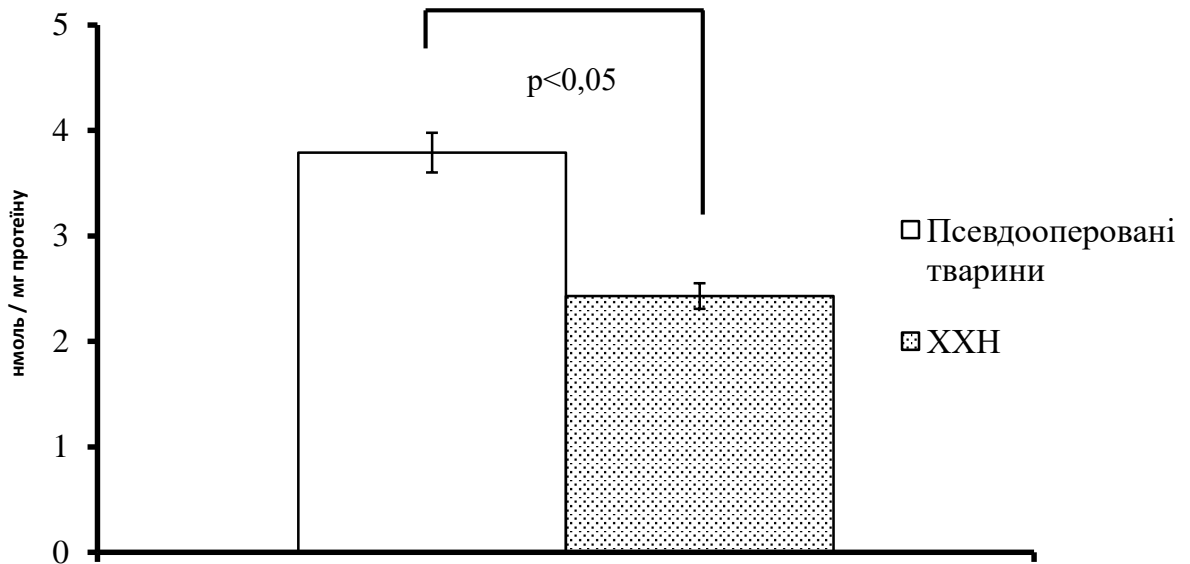


Рис. 3.2 Вміст H₂S у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$).

Також ми оцінили особливості метаболізму H₂S за гострого ураження нирок (табл. 3.2). Виявилось, що на моделі гострої міоглобінуричної нефропатії спрямованість змін обміну H₂S у нирках була протилежною до такої за ХНН. За умов гострого ураження нирок реєструвалось зростання вмісту H₂S на 40 % ($p < 0,05$), а також швидкості синтезу H₂S в реакції гідролітичного розщеплення цистеїну за участі ЦГЛ на 35 % ($p < 0,05$), порівняно з показниками контрольної групи.

Таблиця 3.2

Активність H₂S-продукуючих ензимів та вміст H₂S у нирках щурів за умов гостра міоглобінуричної нефропатії (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	ЦГЛ, нмоль H ₂ S / хв·мг протеїну	H ₂ S, нмоль/мг протеїну
Псевдооперовані тварини	1,76 ± 0,05	3,84 ± 0,08
Гостра міоглобінурична нефропатія	2,38 ± 0,07*	5,38 ± 0,05*

Примітка. * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин.

В подальшому ми оцінили вплив ХХН та показники функціонального стану нирок та їх зв'язок зі змінами обміну H_2S у нирках. З'ясувалось, що за умов ХХН реєструється вірогідне зростання вмісту креатиніну в плазмі крові та зменшення його рівня в сечі (табл. 3.3). Так, у псевдооперованих тварин концентрація креатиніну в плазмі крові коливалась в межах 74,7-96,4 мкмоль / л, а в сечі – 6,18-8,08 ммоль / л. Натомість, у тварин з ХХН рівень креатиніну в плазмі крові становив 111-155 мкмоль / л і був на 51,2 % вищим ($p < 0,05$), а в сечі – 3,98-5,74 ммоль / л і був на 30,6 % меншим ($p < 0,05$), ніж в контролі.

Проведений кореляційний аналіз показав, що вміст креатиніну в сечі та крові тісно асоціюється з рівнем H_2S у нирках щурів. Так, між рівнем H_2S у нирках та концентрацією креатиніну в плазмі крові виникали сильні обернені кореляції ($r=-0,83$; $p < 0,05$), а з рівнем креатиніну в сечі – сильні прямі зв'язки ($r=0,80$; $p < 0,05$). Тобто, формування дефіциту H_2S у нирках за умов ХХН є одним із чинників порушення фільтрації креатиніну у нирках щурів, що супроводжується зростанням рівня креатиніну в крові та зменшенням його вмісту в сечі.

Таблиця 3.3

Вміст креатиніну в плазмі крові та сечі у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Креатинін	
	Плазма крові, мкмоль / л	Сеча, ммоль / л
Псевдооперовані тварини	$86,0 \pm 2,45$	$7,07 \pm 0,19$
ХХН	$130 \pm 4,36^*$	$4,91 \pm 0,18^*$

Примітка. * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин.

Експериментальна ниркова недостатність супроводжується вірогідним зменшенням діурезу та швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) у щурів (табл. 3.4). У тварин групи контролю показник діурезу знаходиться в межах 4,60-5,70 мл / 8 год, а ШКФ становить 0,415-0,512 мл / хв. У той же час, у тварин за умов ХХН показник діурезу знаходився в діапазоні 2,85-4,20 мл / 8

год і був на 34,9 % меншим ($p < 0,05$), а ШКФ – 0,105-0,180 мл / хв і була на 69,9 % меншою ($p < 0,05$) порівняно з показником групи псевдооперованих тварин.

Кореляційний аналіз дозволив встановити, що показник діурезу та ШКФ вірогідно залежать від концентрації H_2S у нирках щурів. Показано, що між рівнем H_2S у нирках та показником діурезу виникали значущі прямі кореляції ($r=0,75$; $p < 0,05$). Більші за силою кореляції виникали між рівнем H_2S у нирках щурів та ШКФ ($r=0,85$; $p < 0,05$). Таким чином, однією із причин зменшення діурезу та погіршенням ШКФ за експериментальної ХХН у щурів є зниження концентрації H_2S у нирках.

Таблиця 3.4

Швидкість клубочкової фільтрації та діурез у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Діурез, мл / 8 год.	ШКФ, мл / хв
Псевдооперовані тварини	$5,38 \pm 0,13$	$0,461 \pm 0,011$
ХХН	$3,50 \pm 0,14^*$	$0,139 \pm 0,008^*$

Примітка. * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин.

В подальшому ми оцінили зміни електролітного обміну у щурів на тлі ХХН та їх зв'язок з рівнем H_2S у нирках щурів. Спершу досліджено вплив ХХН у щурів на обмін натрію, а саме на концентрацію Na^+ в плазмі крові та його екскрецію з сечею (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Показники обміну Na^+ у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Концентрація в плазмі крові, ммоль / л	Ниркова екскреція, мкмоль / 8 год.
Псевдооперовані тварини	$142 \pm 4,07$	$2,40 \pm 0,12$
ХХН	$196 \pm 3,11^*$	$1,66 \pm 0,08^*$

Примітка. * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин.

Виявилось, що на 41 добу моделювання ХХН у щурів реєструється затримка Na^+ в крові та сповільнення його елімінації з сечею. Так, у псевдооперованих тварин концентрація Na^+ в плазмі крові коливається в діапазоні 118-162 ммоль / л, а екскреція його з сечею становить 1,76-3,00 мкмоль / 8 год. У тварин з ХХН концентрація Na^+ в плазмі крові знаходилась у межах 182-212 ммоль / л і була на 37,9 % більшою ($p < 0,05$), а екскреція Na^+ з сечею – 1,19-2,12 мкмоль / 8 год і була на 30,8 % меншою ($p < 0,05$), порівняно з групою контролю.

За ХХН обмін натрію тісно асоціюється з метаболізмом H_2S , про що свідчать результати кореляційного аналізу. Між рівнем H_2S у нирках та концентрацією натрію в крові виникали значущі обернені кореляції ($r = -0,66$; $p < 0,05$), а з екскрецією натрію з сечею – прямі зв'язки ($r = 0,63$; $p < 0,05$).

Поряд з порушенням обміну натрію ХХН супроводжується розладами метаболізму калію в організмі щурів (табл. 3.6). З'ясувалось, що ХХН у щурів викликає порушення елімінації калію з організму, що виявляється в зростанні його рівня в плазмі крові та зменшенні екскреції з сечею. У псевдооперованих тварин концентрація калію в плазмі крові коливається в діапазоні 4,09-5,39 ммоль / л, а екскреція його з сечею становить 33,2-43,5 мкмоль / 8 год. У тварин з ХХН концентрація калію в плазмі крові знаходилась в межах 8,73-10,5 ммоль / л і була на 110 % більшою ($p < 0,05$), а екскреція калію з сечею – 9,90-17,4 мкмоль / 8 год і була на 63,9 % меншою ($p < 0,05$), порівняно з групою контролю.

Таблиця 3.6

Показники обміну K^+ у щурів на моделі хронічної хвороби нирок
(41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Концентрація в плазмі крові, ммоль / л	Ниркова екскреція, мкмоль / 8 год.
Псевдооперовані тварини	$4,60 \pm 0,14$	$38,2 \pm 1,06$
ХХН	$9,68 \pm 0,17^*$	$13,8 \pm 0,74^*$

Примітка. * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин.

За ХХН зменшення елімінації калію до певної міри обумовлено формуванням дефіциту H_2S у нирках, доказом чого є результати кореляційного аналізу. Встановлено, що між рівнем H_2S у нирках та концентрацією калію в крові виникала значуща обернена кореляція ($r=-0,69$; $p < 0,05$), а з екскрецією калію з сечею – прямі зв'язки ($r=0,65$; $p < 0,05$).

Далі ми оцінили співвідношення екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею, який є одним із маркерів регуляторного впливу системи альдостерону на функціонування нирок (рис. 3.3). Експериментальна ХХН супроводжується зростанням співвідношення Na^+ / K^+ в сечі щурів. Так, у групі псевдооперованих тварин медіана співвідношення Na^+ / K^+ в сечі становила 0,064 (95 % СІ 0,051-0,071), а інтерквартильний розмах P_{25} - P_{75} – 0,062-0,066. У групі щурів з ХХН за середніми показниками співвідношення Na^+ / K^+ в сечі було більшим на 94,7 % ($p < 0,05$), медіана становила 0,118 (95 % СІ 0,100-0,155), а інтерквартильний розмах P_{25} - P_{75} – 0,112-0,124.

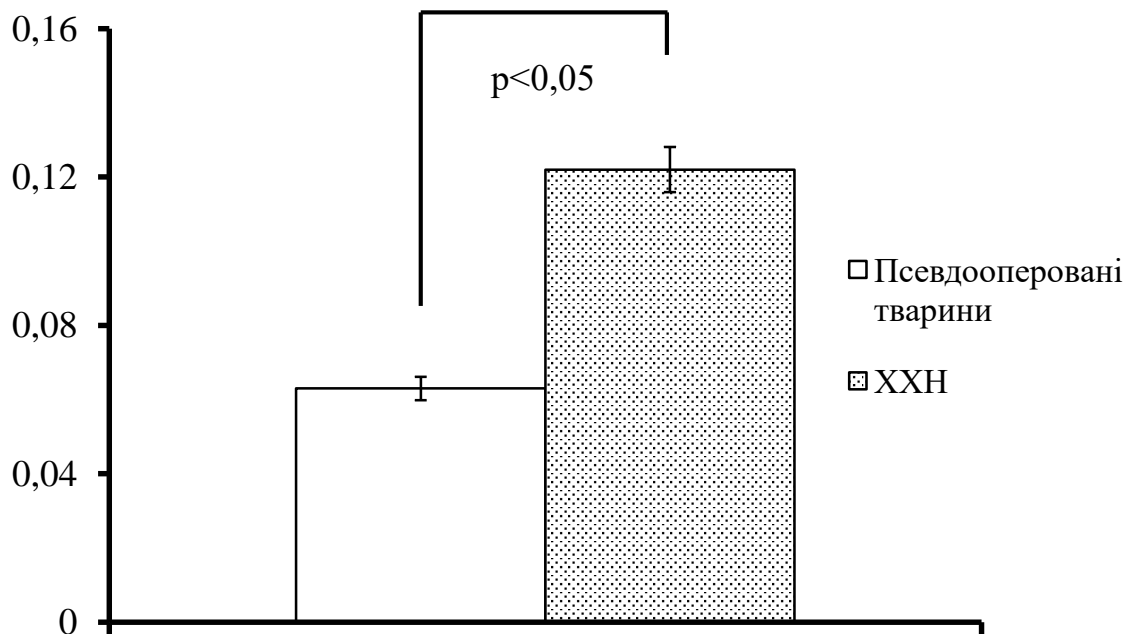


Рис. 3.3 Співвідношення екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$).

Формування дефіциту H_2S у нирках щурів за умов ХХН є важливим чинником, який викликає порушення альдостеронової регуляції функцій нирок. Встановлено, що між рівнем H_2S у нирках та співвідношення Na^+ / K^+ в сечі виникали значущі обернені кореляції ($r=-0,59$; $p < 0,05$).

ХХН викликає порушення реабсорбції води в каналцях нефрону, про що свідчить вірогідне зменшення реабсорбції води (рис. 3.4). В групі контролю медіана коефіцієнту реабсорбції води становить 97,6 (95% СІ 97,3-97,8) %, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 97,5-97,6 %. У тварин з ХХН коефіцієнт реабсорбції води є вірогідно меншим, його медіана дорівнює 94,7 (95% СІ 93,9-95,5) %, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 94,2-95,0 %.

Порушення реабсорбції води тісно пов'язані з порушенням обміну H_2S у нирках щурів за умов ХХН. Виявилось, що між вмістом H_2S у нирках щурів та реабсорбцією води виникали прямі значущі кореляції ($r=0,54$; $p < 0,05$).

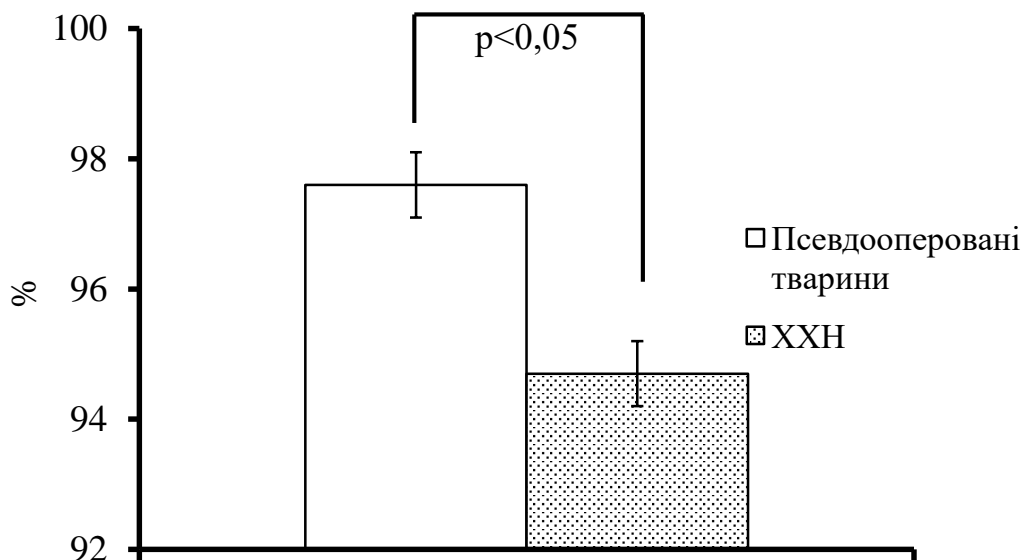


Рис. 3.4 Реабсорбція води у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$).

Експериментальна ХХН супроводжувалась порушенням транспорту іонів натрію, про що свідчить вірогідне зменшення на 58,2% фільтраційної фракції Na^+ у тварин з ураженням нирок в порівнянні з псевдооперованими щурами, а також зниженням абсолютної реабсорбції Na^+ (на 59,2%) та відносної реабсорбції Na^+ ($p < 0,05$).

Ще одним підтвердженням тубулярної дисфункції за ХХН є розвиток протеїнурії (рис. 3.5). У групі контролю медіана вмісту білка в сечі становить 0,852 (95% СІ 0,804-0,910) мг / 8 год, а інтерквартильний розмах P_{25} - P_{75} – 0,843-0,866 мг / 8 год. У тварин з ХХН вміст білка в сечі є вірогідно більшим на 69,6 % ($p < 0,05$), його медіана дорівнює 1,45 (95% СІ 1,34-1,56) мг / 8 год, а інтерквартильний розмах P_{25} - P_{75} – 1,37-1,53 мг / 8 год.

Однією із причин тубулярної дисфункції та протеїнурії у щурів з ХХН є формування дефіциту H_2S у нирках щурів. Показано, що між вмістом H_2S у нирках щурів та екскрецією білка з сечею виникали обернені значущі кореляції ($r=-0,58$; $p < 0,05$).

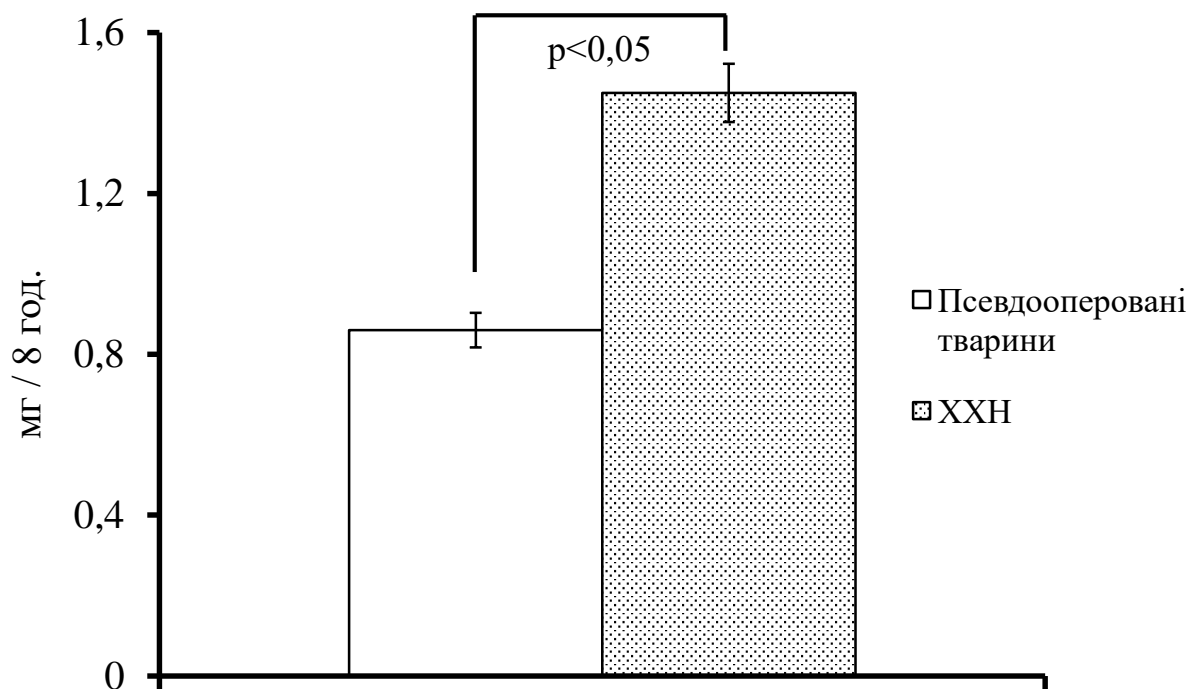


Рис. 3.5 Екскреція білка з сечею у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$).

Таким чином, за ХХН у щурів реєструються масштабні порушення метаболізму H_2S у нирках: зменшується його ензиматичне утворення в реакціях, каталізованих ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ, збільшується швидкість неензиматичної окиснювальної деградації, що супроводжується зниженням вмісту H_2S у нирках. Формування дефіциту H_2S є важливим чинником, який

інтегрований в розвиток порушень функціонального стану нирок у щурів з експериментальною патологією, а саме олігурії, зменшення ШКФ, порушення елімінації креатиніну, розладів обміну іонів Na^+ та K^+ , тубулярних порушень (зменшення реабсорбції води, протеїнурії).

3.2 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфід (пропаргілгліцину та натрій гідрогенсульфід) на метаболізм гідроген сульфід у нирках та функціональний стан нирок за умов експериментальної хронічної хвороби нирок у щурів

У попередньому підрозділі нами показано важливу роль системи гідроген сульфід у порушенні функцій тубулярного та гломерулярного апаратів нирок за ХХН. Тому, в цьому підрозділі ми оцінили вплив модуляторів обміну H_2S - пропаргілгліцину (PPG – інгібітору ЦГЛ) та натрій гідрогенсульфід (NaHS – донатору H_2S) на показники метаболізму H_2S та параметри функціонального стану нирок за умов ХХН.

Застосування модуляторів обміну H_2S на тлі ХХН у щурів супроводжується різноспрямованим впливом на ензиматичну продукцію H_2S у нирках (табл. 3.7). Введення пропаргілгліцину за умов ХХН викликає вірогідне зменшення утворення H_2S в реакції гідролітичного розщеплення цистеїну за участі ЦГЛ. В групі тварин «ХХН+PPG» активність ЦГЛ коливається в діапазоні 0,840-1,175 нмоль H_2S / хв·мг протеїну і є меншою на 21,2 % ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН». В той же час, у тварин, які отримували NaHS , активність ЦГЛ у нирках знаходилась у діапазоні 1,27-1,68 нмоль H_2S / хв·мг протеїну і була більшою на 23,3 % ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН».

У щурів з ХХН, які отримували пропаргілгліцин, не відмічалось вірогідних відмінностей синтезу H_2S в реакції конденсації цистеїну з гомоцистеїном за участі ЦБС, порівняно з групою «ХХН». Натомість, за умов застосування NaHS активність ЦБС у нирках знаходилась в діапазоні 1,76-2,13

нмоль H_2S / хв·мг протеїну і була більшою на 27,1 % ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН».

Таблиця 3.7

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність H_2S -продукуючих ензимів у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Активність ензимів, нмоль H_2S / хв·мг протеїну		
	ЦГЛ	ЦБС	ЦАТ
Псевдооперовані тварини	1,72±0,06	2,24±0,10	2,43±0,12
ХХН	1,23±0,05*	1,56±0,04*	1,60±0,08*
ХХН + PPG	0,969±0,038*#	1,50±0,06*	1,52±0,07*
ХХН+ NaHS	1,52±0,04*#	1,99±0,04*#	2,14±0,05*#

Примітки:

1. * – $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Введення пропаргілгліцину на тлі ХХН не викликало достовірних відмінностей синтезу H_2S в реакції трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом за участі ЦАТ, порівняно з групою «ХХН». В той же час, у щурів групи «ХХН + NaHS» активність ЦАТ у нирках перебувала в діапазоні 1,85-2,28 нмоль H_2S / хв·мг протеїну і була більшою на 34,0 % ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН».

Модулятори обміну H_2S виявляли різноспрямований вплив на швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках щурів за ХХН (рис. 3.6). В групі тварин «ХХН + PPG» швидкість утилізації екзогенного H_2S була на 28,6 % більшою ($p < 0,05$), ніж в групі «ХХН», і становила 1,36 (95% СІ 1,18-1,48) нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 1,26-1,46 нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну.

Застосування натрій гідрогенсульфіду мало протилежний до пропаргілгліцину вплив на окисну деградацію H_2S у нирках щурів на тлі ХХН. У тварин з ХХН, які отримували NaHS, швидкість утилізації екзогенного H_2S

була меншою на 21,0 % ($p < 0,05$), ніж в групі «ХХН», і становила 0,832 (95% СІ 0,756-0,891) нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 0,795-0,873 нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну.

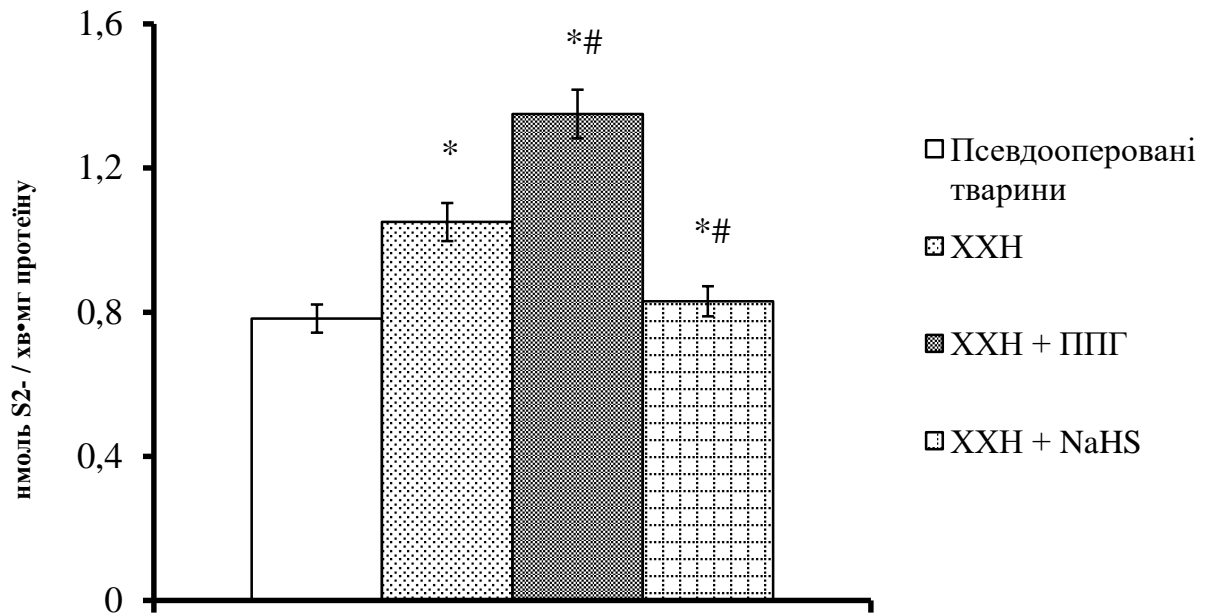


Рис. 3.6 Вплив модуляторів обміну H_2S на швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n=10$). Примітка: * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Призначення тваринам з ХХН модуляторів обміну H_2S мало різний вплив на вміст ендogenous H_2S у нирках щурів за ХХН (рис. 3.7). Застосування пропаргілгліцину потенціювало негативний вплив ХХН на рівень H_2S у нирках щурів. Так, в групі тварин «ХХН + PPG» рівень H_2S у нирках був на 23,9 % меншим ($p < 0,05$), ніж в групі «ХХН», і становив 1,88 (95% СІ 1,36-2,23) нмоль / мг протеїну, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 1,78-2,01 нмоль / мг протеїну.

Застосування натрій гідрогенсульфіду зменшувало, індуковане ХХН, формування дефіциту H_2S у нирках щурів. У тварин з експериментальною ХХН, які отримували NaHS, концентрація ендogenous H_2S у нирках була більшою на 40,3 % ($p < 0,05$), ніж в групі «ХХН», і становила 3,40 (95 % СІ

3,18-3,70) нмоль / мг протеїну, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 3,28-3,54 нмоль / мг протеїну.

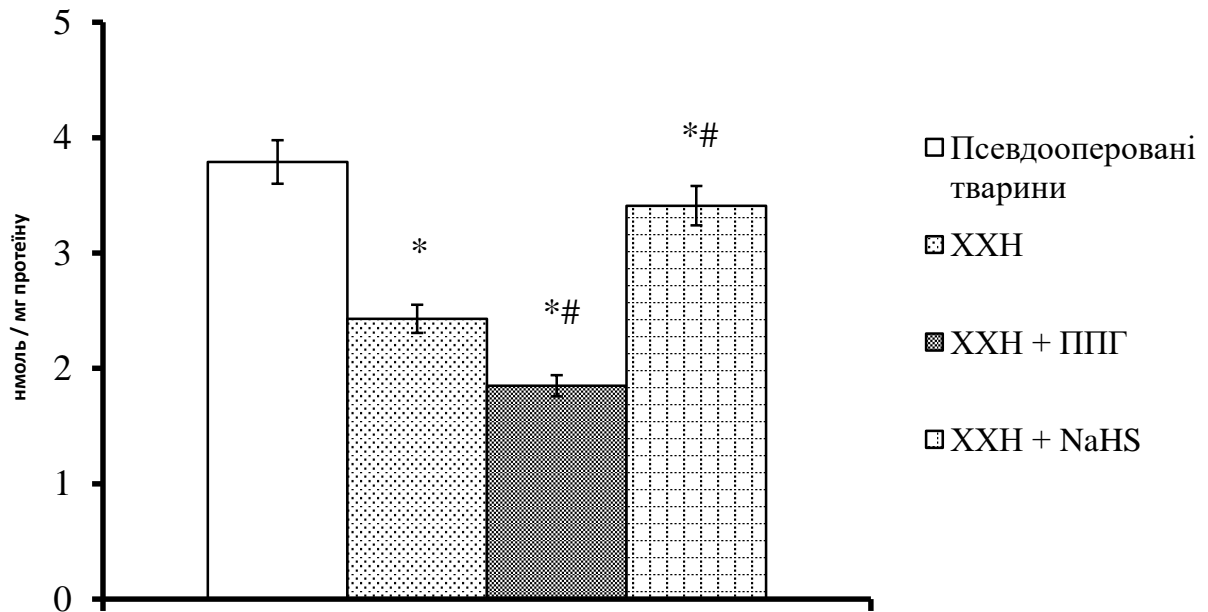


Рис. 3.7 Вплив модуляторів обміну H_2S на вміст H_2S у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Введення пропаргілгліцину потенціює порушення екскреції креатиніну з організму, індуковане ХХН (табл. 3.8). У тварин з ХХН, які отримували пропаргілгліцин, вміст креатиніну в плазмі крові коливався в межах 144-171 мкмоль / л, а в сечі – 3,61-5,04 ммоль / л. За середніми показниками рівень креатиніну в плазмі крові був вищим на 23,1 % ($p < 0,05$), а вміст в сечі – меншим на 14,3 % ($p < 0,05$) відносно показників групи «ХХН».

Застосування натрій гідрогенсульфіду за ХХН виявляло протилежний до пропаргілгліцину вплив на процеси елімінації креатиніну з організму (табл. 3.8). В групі тварин ХХН + NaHS» вміст креатиніну в плазмі крові коливався в межах 83,2-113 мкмоль / л, а в сечі – 5,01-7,29 ммоль / л. За середніми показниками рівень креатиніну в плазмі крові був меншим на 24,2 % ($p < 0,05$), а вміст в сечі – більшим на 21,8 % ($p < 0,05$) відносно такого в групі «ХХН», однак достовірно відрізнялись від таких у групі псевдооперованих тварин.

Таблиця 3.8

Вплив модуляторів обміну H_2S на вміст креатиніну в плазмі крові та сечі у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Креатинін	
	Плазма крові, мкмоль / л	Сеча, ммоль / л
Псевдооперовані тварини	$86,0 \pm 2,45$	$7,07 \pm 0,19$
ХХН	$130 \pm 4,36^*$	$4,91 \pm 0,18^*$
ХХН + PPG	$160 \pm 3,25^{*#}$	$4,21 \pm 0,15^{*#}$
ХХН+ NaHS	$98,6 \pm 3,09^{*#}$	$5,98 \pm 0,24^{*#}$

Примітки:

1. $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Модулятори обміну H_2S мали різновекторну дію на показники діурезу та клубочкової фільтрації за ХХН у щурів (табл. 3.9). Застосування пропаргілгліцину поглиблювали ініційоване ХХН зменшення діурезу та ШКФ (табл. 3.8). В групі тварин «ХХН + PPG» діурез коливався в межах 1,95-3,36 мл / 8 год, а ШКФ – 0,052-0,104 мл / хв. За середніми показниками діурез був меншим на 20,0 % ($p < 0,05$), а ШКФ – меншою на 44,4 % ($p < 0,05$), відносно групи «ХХН».

Призначення натрій гідрогенсульфіду за ХХН, навпаки, сприяло покращенню процесів фільтрації у нирках щурів. У групі тварин «ХХН + NaHS» діурез коливався в межах 3,64-5,27 мл / 8 год, а ШКФ – 0,193-0,354 мл / хв. За середніми показниками діурез був більшим на 25,7 % ($p < 0,05$), а ШКФ – більшою на 102 % ($p < 0,05$) відносно показників групи «ХХН», однак статистично достовірно відрізнялись від таких у групі псевдооперованих тварин.

В подальшому ми оцінили вплив модуляторів обміну H_2S на показники електролітного обміну за умов ХХН у щурів. Спершу дослідили їх вплив на обмін Na^+ в організмі щурів (табл. 3.10).

Таблиця 3.9

Вплив модуляторів обміну H_2S на швидкість клубочкової фільтрації та діурез у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Діурез, мл / 8 год.	ШКФ, мл / хв
Псевдооперовані тварини	$5,38 \pm 0,13$	$0,461 \pm 0,011$
ХХН	$3,50 \pm 0,14^*$	$0,139 \pm 0,008^*$
ХХН + PPG	$2,80 \pm 0,15^{*#}$	$0,077 \pm 0,005^{*#}$
ХХН+ NaHS	$4,40 \pm 0,16^{*#}$	$0,280 \pm 0,016^{*#}$

Примітки:

1. * – $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Виявилось, що введення пропаргілгліцину потенціює негативний вплив ХХН на процеси елімінації Na^+ з крові (див. табл. 3.9). Зокрема, в групі тварин з ХХН, які отримували інгібітор ЦГЛ, рівень натрію в плазмі крові коливався в межах 210-249 ммоль / л, а в сечі перебував у діапазоні 0,893-1,69 мкмоль / 8 год. За середніми показниками рівень Na^+ в плазмі крові був більшим на 17,3 % ($p < 0,05$), а його концентрація в сечі, навпаки, була меншою на 21,1 % ($p < 0,05$), відносно таких показників у групі тварин з ХХН, які не отримували модулятори.

Застосування натрій гідрогенсульфіду за експериментальної ХХН значною мірою коригувало процеси елімінації Na^+ з організму. Так, у тварин з ХХН, які отримували донатор H_2S , рівень Na^+ в плазмі крові коливався в межах 136-175 ммоль / л, а екскреція з сечею знаходилась в діапазоні 1,62-2,54 мкмоль / 8 год. За середніми показниками рівень Na^+ в плазмі крові був меншим на 34,1 % ($p < 0,05$), а екскреція з сечею – більшою на 99,3 % ($p <$

0,05), відносно групи «ХХН», однак статистично достовірно відрізнялись від таких показників в групі псевдооперованих тварин.

Таблиця 3.10

Вплив модуляторів обміну H_2S на показники обміну Na^+ у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Na^+	
	Вміст у плазмі крові, ммоль / л	Ниркова екскреція мкмоль / 8 год.
Псевдооперовані тварини	$142 \pm 4,07$	$2,40 \pm 0,12$
ХХН	$196 \pm 3,11^*$	$1,66 \pm 0,08^*$
ХХН + PPG	$230 \pm 3,89^{*#}$	$1,31 \pm 0,09^{*#}$
ХХН+ NaHS	$157 \pm 3,85^{*#}$	$2,02 \pm 0,09^{*#}$

Примітки:

1. * – $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Також ми оцінили вплив модуляторів на процеси метаболізму K^+ (табл. 3.11). З'ясувалось, що застосування пропаргілгліцину поглиблює пригнічувальний вплив ХХН на процеси елімінації K^+ з крові. Зокрема, в групі тварин з ХХН, які отримували інгібітор ЦГЛ, рівень K^+ в плазмі крові коливався в межах 9,85-12,9 ммоль / л, а екскреція K^+ з сечею знаходилась у діапазоні 6,78-9,56 мкмоль / 8 год. За середніми показниками рівень K^+ в плазмі крові був більшим на 15,7 % ($p < 0,05$), а його екскреція з сечею, навпаки, меншою на 40,9 % ($p < 0,05$), відносно таких в групі тварин з ХХН, які не отримували модулятори.

Призначення натрій гідрогенсульфіду за експериментальної ниркової недостатності покращувало процеси метаболізму K^+ в організмі щурів. Так, у тварин з ХХН, які отримували донатор H_2S , рівень K^+ в плазмі крові коливався в межах 5,24-7,70 ммоль / л, а екскреція K^+ з сечею знаходилась у діапазоні 22,8-32,2 мкмоль / 8 год. За середніми показниками рівень K^+ в плазмі крові

був меншим на 20,1 % ($p < 0,05$), а екскреція з сечею – більшою на 21,7 % ($p < 0,05$), відносно таких у групі «ХХН», однак статистично достовірно відрізнялись від таких показників в групі псевдооперованих тварин.

Таблиця 3.11

Вплив модуляторів обміну H_2S на показники обміну K^+ у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	K^+	
	Вміст в плазмі крові, ммоль / л	Ниркова екскреція мкмоль / 8 год
Псевдооперовані тварини	$4,60 \pm 0,14$	$38,2 \pm 1,06$
ХХН	$9,68 \pm 0,17^*$	$13,8 \pm 0,74^*$
ХХН + PPG	$11,2 \pm 0,32^{*#}$	$8,15 \pm 0,33^{*#}$
ХХН+ NaHS	$6,38 \pm 0,25^{*#}$	$27,5 \pm 0,90^{*#}$

Примітки:

1. * – $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Модулятори обміну H_2S мали різноспрямовану дію на співвідношення екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею (рис. 3.8). Так, введення пропаргілгліцину потенціює негативний вплив ХХН на екскрецію іонів Na^+ та K^+ з організму. В групі тварин «ХХН + PPG» медіана співвідношення Na^+ / K^+ становила 0,166 (95% CI 0,129-0,181), а інтерквартильний розмах $P_{25}-P_{75}$ – 0,150-0,172. За середніми показниками співвідношення Na^+ / K^+ перевищувало на 31,2 % ($p < 0,05$) такий показник в групі «ХХН».

Застосування натрій гідрогенсульфіду чинило протилежний вплив на співвідношення Na^+ / K^+ за ХХН – одночасно покращувало процеси екскреції іонів Na^+ та K^+ з організму. В групі тварин «ХХН + NaHS» медіана співвідношення Na^+ / K^+ становила 0,072 (95% CI 0,064-0,082), а інтерквартильний розмах $P_{25}-P_{75}$ перебував в діапазоні 0,068-0,079. За середніми показниками співвідношення Na^+ / K^+ було на 39,8 % меншим

($p < 0,05$), відносно показника в групі тварин з ХХН, які не отримували модулятори, однак залишалось вірогідно більшим порівняно з показником псевдооперованих тварин.

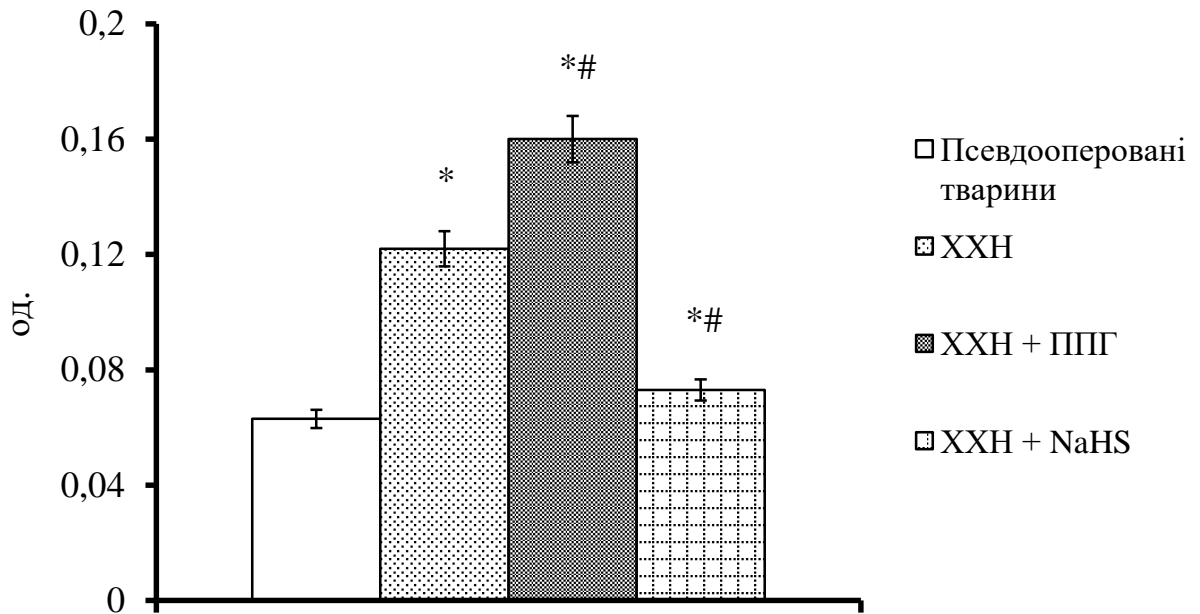


Рис. 3.8. Вплив модуляторів обміну H_2S на співвідношення екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n=10$). Примітка: * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Введення пропаргілгліцину поглиблює порушення процесів реабсорбції води в каналцях нефрона, індуковані ХХН (рис. 3.9). В групі тварин «ХХН + PPG» медіана реабсорбції становила 92,4 (95 % СІ 91,3-93,2) %, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 92,1-92,8 %. За середніми показниками реабсорбція води була вірогідно меншою порівняно з величиною в групі «ХХН».

Застосування натрій гідрогенсульфіду навпаки, покращувало реабсорбцію води в нефроні за ХХН. В групі тварин «ХХН + NaHS» медіана реабсорбції становила 96,7 (95 % СІ 95,9-97,1) %, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 96,7-96,9 %. За середніми показниками реабсорбція води була вірогідно більшою ніж у групі тварин з ХХН, які не отримували модулятори,

однак залишалась достовірно меншою порівняно з показником псевдооперованих тварин.

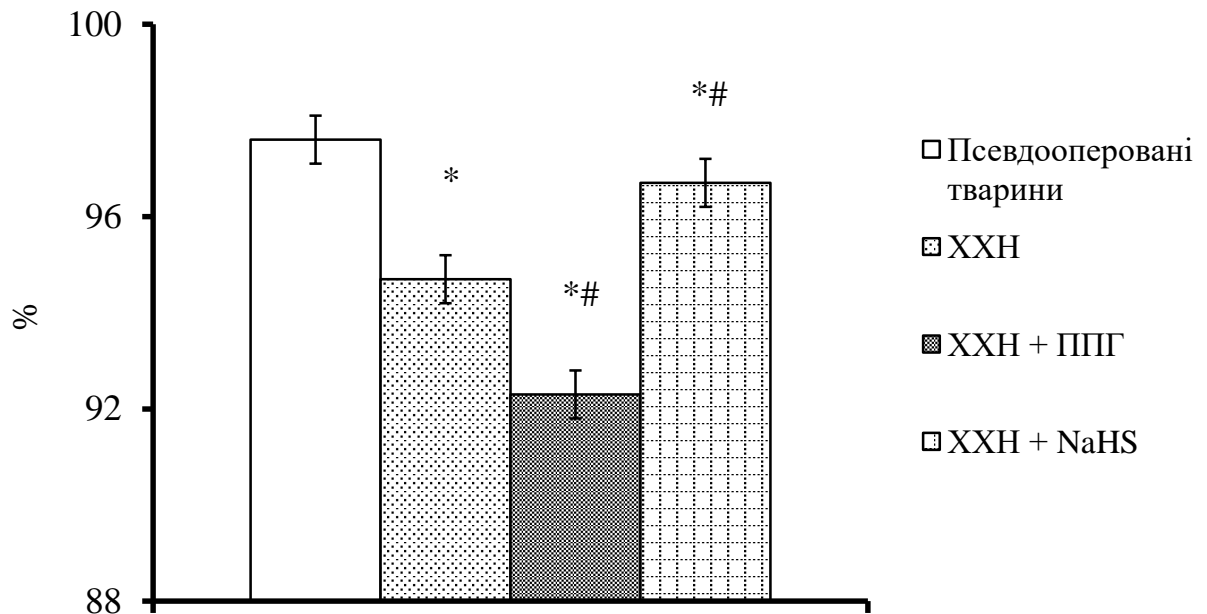


Рис. 3.9 Вплив модуляторів обміну H_2S на реабсорбцію води у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Модулятори обміну H_2S мали різновекторну дію на екскрецію білка з сечею за ХХН (рис. 3.10). Введення пропаргілгліцину потенціює негативний вплив ХХН на екскрецію білка з сечею. В групі тварин «ХХН + РРГ» медіана екскреції білка з сечею становила 1,89 (95% СІ 1,68-2,06) мг / 8 год, а інтерквартильний розмах P25-P75 – 1,76-2,01 мг / 8 год. За середніми показниками екскреція білка з сечею перевищувала на 29,7 % ($p < 0,05$) такий показник в групі «ХХН».

Застосування натрій гідрогенсульфіду чинило протилежний вплив на екскрецію білка з сечею за ХХН – зменшувало виразність протеїнурії. В групі тварин «ХХН + NaHS» медіана екскреції білка з сечею становила 1,09 (95% СІ 1,03-1,19) мг / 8 год, а інтерквартильний розмах P25-P75 перебував в діапазоні 1,05-1,14 мг / 8 год. За середніми показниками екскреція білка з сечею була на 24,1 % меншою ($p < 0,05$) відносно показника в групі тварин з ХХН, які не

отримували модулятори, однак залишалась вірогідно більшою, порівняно з псевдооперованими тваринами.

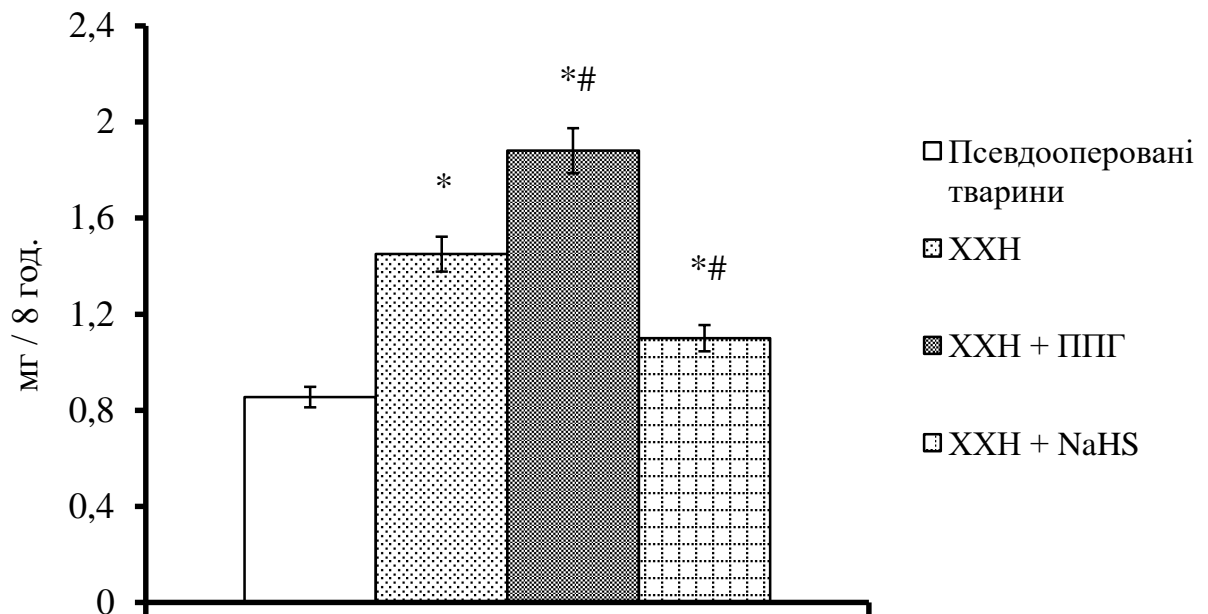


Рис. 3.10 Вплив модулаторів обміну H_2S на екскрецію білка з сечею у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка. * - $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,001$ відносно тварин з ХХН.

Таким чином, застосування модулаторів обміну гідроген сульфїду має різноспрямований вплив на функціонування гломерулярного та каналцевого апаратів нирок за ХХН у щурів. Так, введення інгібітору ЦГЛ пропаргілгліцину за ХХН викликає зменшення рівня H_2S у нирках, що супроводжується поглибленням гломерулярної та тубулярної дисфункції. У той же час, призначення натрій гідрогенсульфїду коригує рівень H_2S у нирках і виявляє потужні нефропротекторні властивості: покращує фільтрацію нирок, процеси реабсорбції води, електролітного обміну, стану тубулярного апарату. Проведені дослідження є вагомим доказом важливої ролі системи гідроген сульфїду в регуляції функцій нирок в нормі та за ХХН.

3.3 Вплив донатору гідроген сульфїду на показники клітинного циклу та фрагментацію ДНК клітин кіркового шару нирки щурів за експериментальної хронічної хвороби нирок

У попередніх дослідженнях виявлено захисний вплив екзогенного гідроген сульфїду на функціонування каналцевого та клубочкового апарату нирок у щурів та вірогідну нефропротекторну дію за ХХН. Враховуючи відомі дані, щодо в спектрі механізмів впливу гідроген сульфїду на організм неабияка роль належить його антиапоптотичній дії, доцільним було дослідити змін показників клітинного циклу та процеси апоптозу в клітинах кіркового шару нирки щурів з хронічною хворобою нирок, яким в лікувальному режимі вводили донатор гідроген сульфїду (NaHS) в умовно-терапевтичній дозі. Для визначення змін цих показників був використаний метод протокової цитометрії, схема експерименту та досліджувані параметри описані в розділі 2.

Результати досліджень наведені в таблиці 3.12, приклади ДНК-гістограм піддослідних щурів представлені на рис. 3.11-3.13. Можна відмітити, що на ДНК-гістограмах перший вищий пік (фаза G0G1) відповідав ядрам клітин кіркового шару нирки з вмістом ДНК=2с. Відсоток цих ядер клітин кіркового шару нирки щурів із модельованою ХХН становив $93,75 \pm 0,81$ %, що практично не відрізнялось від такого показника у псевдооперованих щурів ($91,31 \pm 1,0$ %). Введення NaHS також не змінювало кількість подій в цій фазі (відсоток клітин становив в середньому $90,48 \pm 1,72$ %, що статистично не відрізнялось від показник інших експериментальних груп (табл. 3.12).

Другий пік, який віддзеркалює відсоток клітин, які перебувають у фазі G2+M (вміст ДНК=4с), у тварин дослідної групи «ХХН без лікування» знижувався порівняно з тваринами без патології і становив в середньому $5,88 \pm 0,73$ проти $7,02 \pm 0,73$ %, відповідно, однак ця різниця не сягала статистично вірогідних значень.

Вплив донатору гідроген сульфїду на показники клітинного циклу клітин кіркового шару нирок щурів з експериментальною ХХН (41 доба, $M \pm \sigma$)

Експериментальні групи (n=5)	Фази клітинного циклу, $M \pm \sigma$			
	G0G1	S	G2+M	SUB-G0G1
Псевдооперовані тварини	91,31 \pm 1,0	1,66 \pm 0,67	7,02 \pm 0,73	2,1 \pm 0,33
ХХН без лікування	93,75 \pm 0,81	0,37* \pm 0,16	5,88 \pm 0,73	3,79 \pm 0,69*
ХХН + натрій гідроген сульфїд	90,48 \pm 1,72	1,71 \pm 0,37 [#]	7,8 \pm 1,79	2,47 \pm 0,18 [#]

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно псевдоперованих щурів (критерій Манна-Вітні);
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно тварин з ХХН без лікування (критерій Манна-Вітні).

В групі тварин, які отримували NaHS, цей показник був таким, як і у псевдоперованих щурів. Між двома цими піками на ДНК-гістограмах проліферуючих клітин присутні об'єкти з вмістом ДНК $>2c$ і $<4c$, тобто ті, що перебувають у так званій фазі синтезу ДНК (S-фазі). Як свідчать отримані результати, у тварин з хронічним ураженням нирок відсоток клітин в цій фазі статистично знижувався ($p < 0,05$) відносно показника псевдоперованих щурів, тоді як введення донатору гідроген сульфїду сприяло відновленню синтетичної фази і досліджуваний показник у групі «ХХН + NaHS» практично не відрізнявся від контролю (див. табл. 3.12).

Інтегративним показником процесів апоптозу, як відомо, є фрагментація ДНК [186]. На ДНК-грамах цей показник відповідав фазі SUB-G0G1 клітинного циклу. У дослідженні показник фрагментації ДНК в ядрах клітин кіркового шару нирок щурів з ХХН становив $3,79 \pm 0,69$ %, що в 1,80 разу ($p < 0,05$) перевищував показник фрагментації ДНК у псевдоперованих тварин,

що свідчить про активацію процесів апоптозу. Водночас, у групі щурів з ХХН, які отримували NaHS, відсоток клітин кіркового шару нирок у фазі SUB-G0G1 становив в середньому $2,47 \pm 0,18$, що було на 34,8 % менше, ніж у тварин без лікування, і незначно відрізнявся від псевдооперованих тварин ($p > 0,05$).

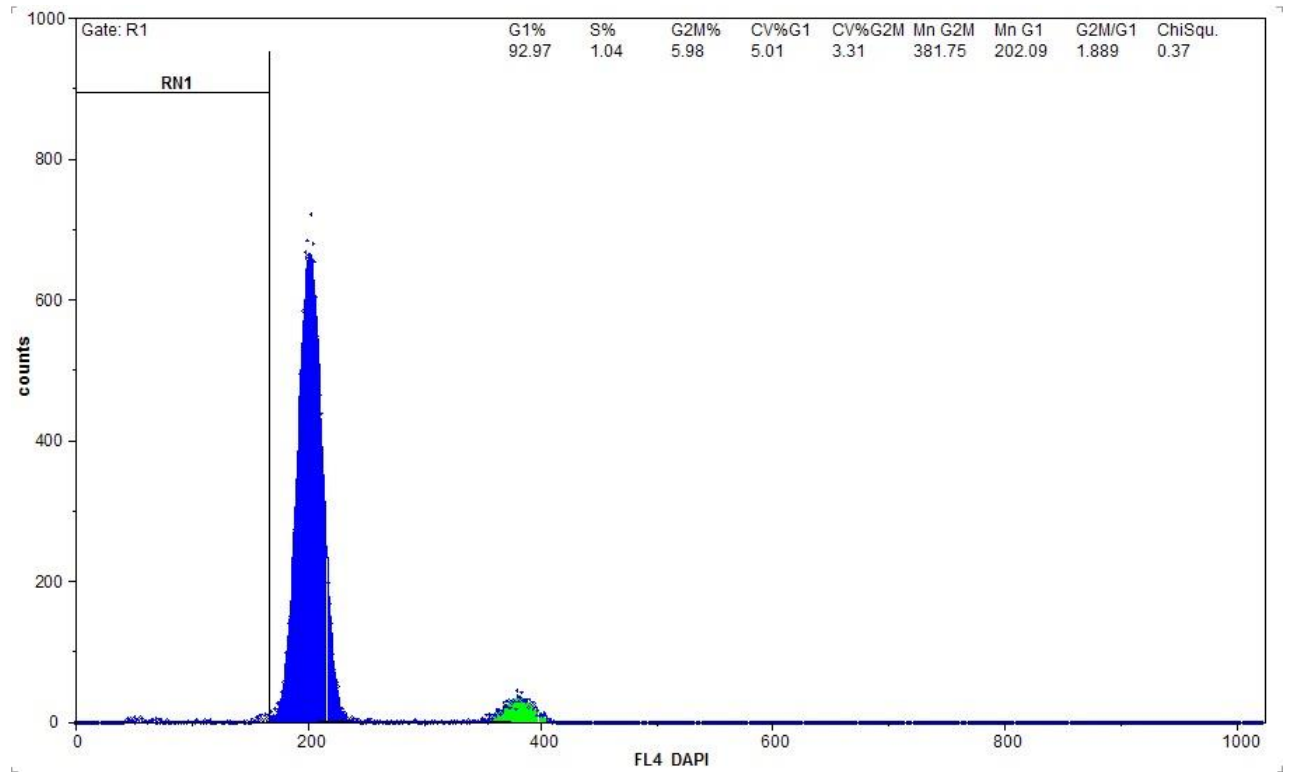


Рис. 3.11 ДНК-гістограма ядерної суспензій клітин коркової речовини нирки щура групи псевдооперованих тварин RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 1,92 %. Кількість подій 20000.

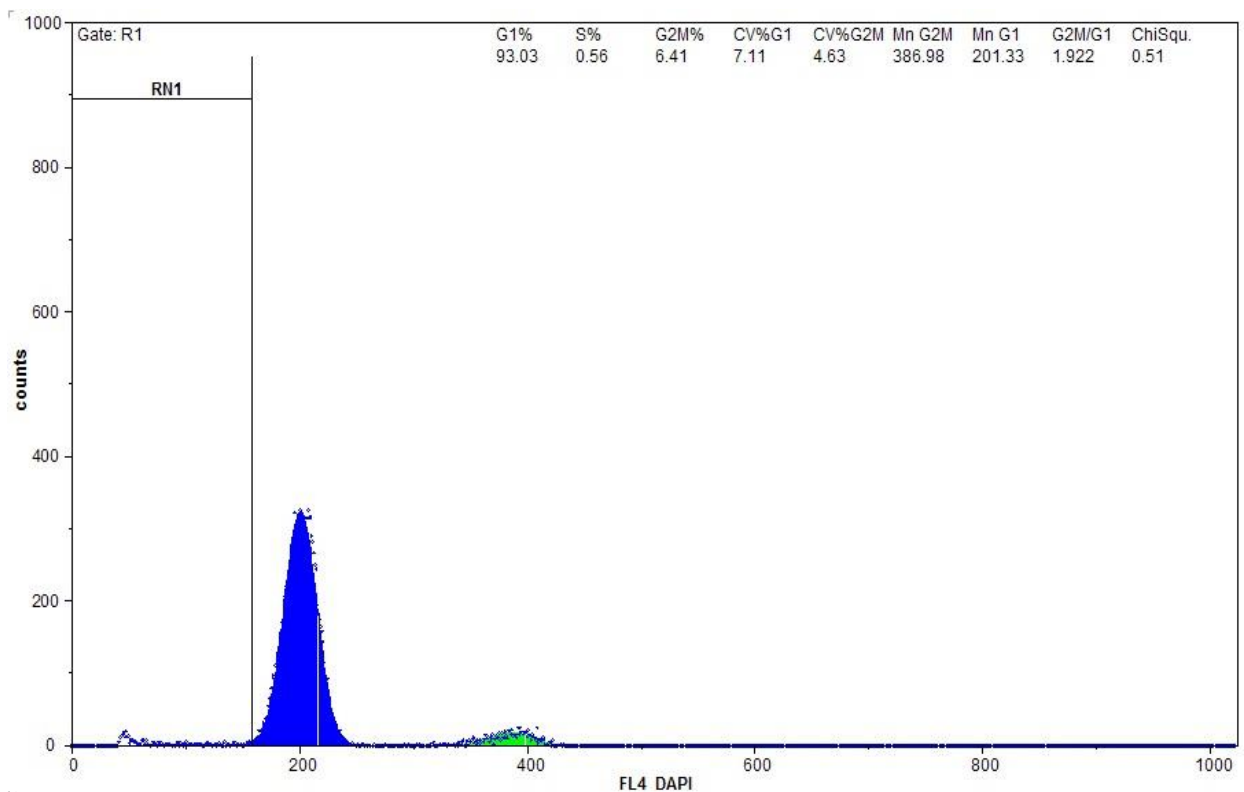


Рис. 3.12 ДНК-гістограма ядерної суспензій клітин коркової речовини нирки щура групи тварин «XXH без лікування». RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 3,76 %. Кількість подій 20000.

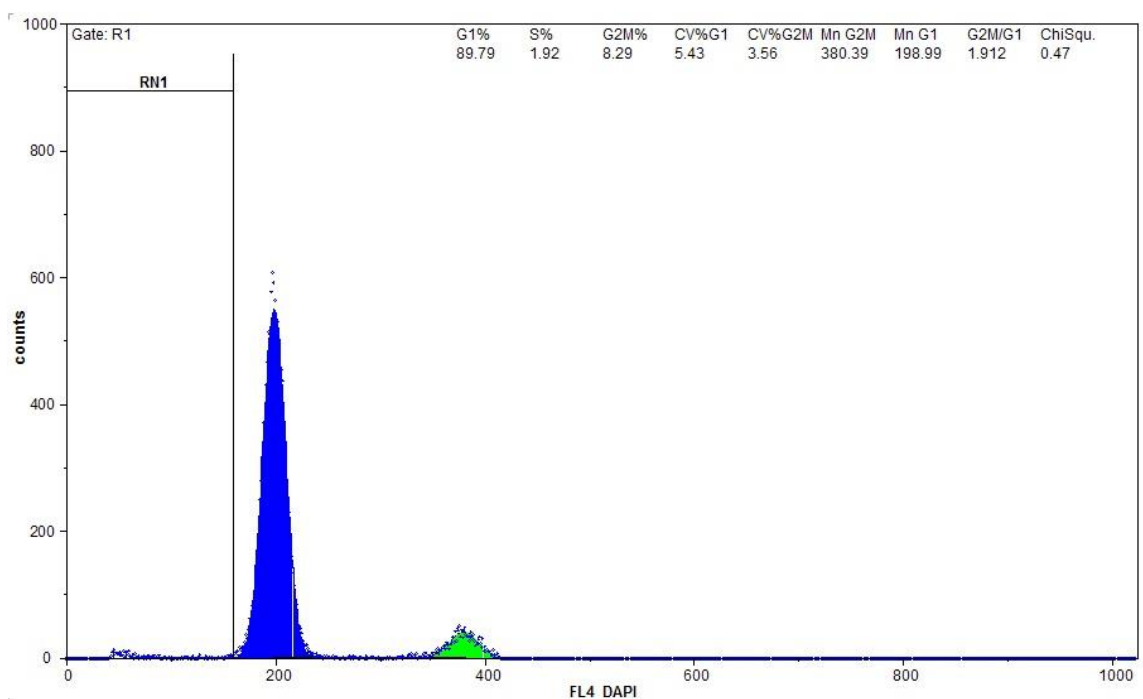


Рис. 3.13 ДНК-гістограма ядерної суспензій клітин коркової речовини нирки щура групи тварин «XXH + NaHS». RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 2,47 %. Кількість подій 20000.

Тобто, за даних умов експерименту введення натрію гідроген сульфід у умовнотерапевтичній дозі зменшувало процеси апоптозу та відновлювало синтетичну фазу клітинного циклу в клітинах кіркового шару нирок щурів з експериментальною хронічною хворобою нирок.

3.4. Вплив донатору гідроген сульфід на морфологічний стан нирок щурів за умов експериментальної хронічної хвороби нирок

Для виконання цієї частини дослідження гістологічні зміни в нирці щура з експериментальною ХХН на тлі введення натрій гідрогенсульфід оцінювали в порівнянні з умовно здоровими тваринами та щурами з модельною патологією без лікування. Моделювання патології та лікувальний режим введення NaHS детально описаний в розділі 2.

При макроскопічному дослідженні нирки умовно здорових щурів бобоподібної форми, м'яко-еластичної консистенції, темно-червоного кольору з рівномірним забарвленням, поверхня гладенька. Вкриті щільною фіброзною і слабо вираженою жировою оболонками, з вентрального боку ще і серозною оболонкою. Оболонки легко відділяються. На розрізі поверхня нирки помірно волога, межа між кірковою і мозковою речовиною чітка. На межі розташовані дугові артерії та вени. Кровонаповнення звичайне. У нирковій мисці присутня незначна кількість сечі. У воротах нирки, розташовані ниркова артерія, вена та сечовід. Масовий коефіцієнт нирки умовно здорових щурів становив в середньому $0,71 \pm 0,09$.

Мікроскопічно нирки мають типову морфологічну організацію. Кірковий шар представлений нирковими тільцями сферичної форми приблизно однакового розміру, проксимальними та дистальними каналцями нефронів. У нирковому тільці чітко візуалізуються його структурні елементи: парієтальний листок клубочкової капсули, що складається з одношарового сплющеного епітелію, порожнина капсули клубочка та судинний клубочок, клітини якого (епітеліоцити, подоцити та мезангіоцити) мають нормальну гістологічну будову. Просвіт капсули звичайного розміру, не містить

сторонніх включень. Капіляри клубочка помірно повнокровні, просвіт заповнений елементами крові.

Проксимальні канальці мають просвіт неправильної форми та займають більшу площу зрізу, ніж дистальні. Останні меншого діаметру та з ширшим просвітом правильної форми. Стінки проксимальних канальців вистелені одношаровим кубічним епітелієм з мікрворсинками на апікальній поверхні, радіальною посмугованістю в базальній частині та оксифільною цитоплазмою. Дистальні канальці вистелені епітеліальними клітинами звичайної будови з більш світлою цитоплазмою. Ядра епітеліоцитів у стінках проксимальних та дистальних канальців округлої приблизно однакової форми з нормальною кількістю гетерохроматину, розташовані на одному рівні. Сторонні включення в просвітах канальців нирок відсутні (рис. 3.14).

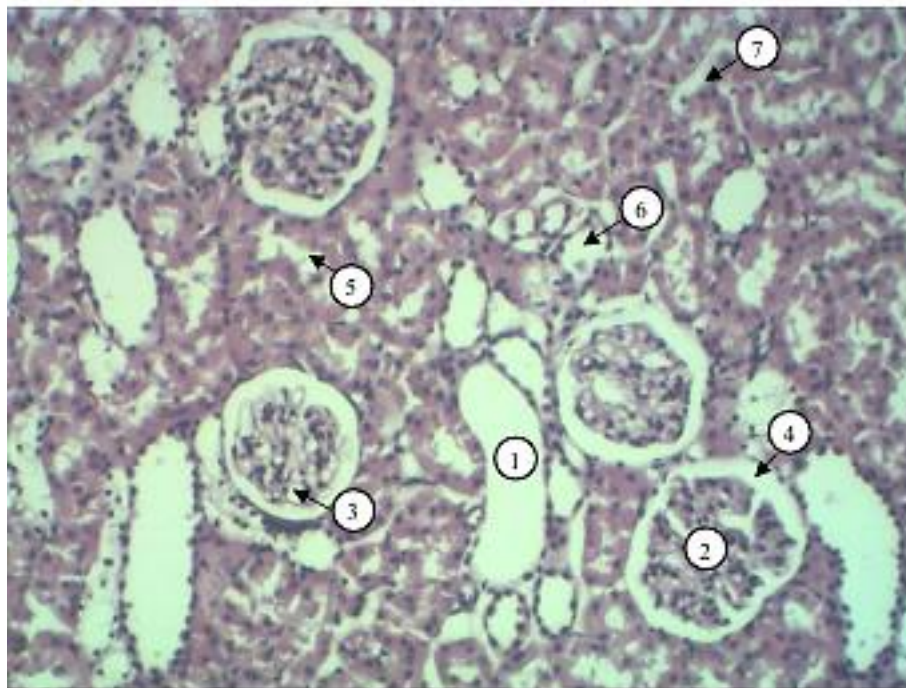


Рис. 3.14 Фрагмент кіркової речовини нирки псевдооперованого щура на 41-у добу. Забарвлення гематоксилін-еозином. об'єктив x 10. Окуляр x 10. Позначення: 1 - просвіт венули; 2 - ниркові тільця кіркових нефронів; 3 - просвіти клубочкових капілярних судин; 4 - сечові простори; 5 - просвіти проксимальних канальців; 6 - просвіти дистальних канальців; 7 - помірно повнокровні перетубулярні кровоносні судини.

Мозкова речовина нирки представлена петлями нефронів і збиральними трубками. Стінки трубки низхідної частини петель нефронів утворені плоским епітелієм, клітини якого мають бліду цитоплазму. Стінки трубочки висхідної частини вкриті одношаровим кубічним епітелієм. Збірні трубки, які складають більшу частину зрізів мозкової речовини, вистелені циліндричними епітеліоцитами з гіперхромними круглими ядрами.

Інтерстиціальна тканина без особливостей. Лімфатичні судини звичайного розміру. Просвіти дугових, міжчасточкових артерій та вен, приносних та виносних артеріол, перитубулярних кровонесних капілярів помірно кровонаповненні, не розширені. Структура судинної стінки звичайна, ендотеліоцити утворюють суцільний шар, базальна мембрана однорідної структури. Пристінкові тромби в їх просвітах відсутні.

Морфологічна структура нирки щурів з ХХН без корекції. При зовнішньому огляді видно, що кукса нирки має горбисту поверхню, сірувато-бурого кольору, з чисельними крововиливами під фіброзною капсулою. Консистенція м'яка. Сполучнотканинна оболонка потовщена, щільно зрощена з паренхімою органу. На розрізі водно чітку межу між кірковим і мозковим шаром. В нирковій корі спостерігаються ознаки жирової дистрофії, в мозковій речовині – склерозу. Ниркові миски значно розширені. Масовий коефіцієнт кульші нирки за модельної патології становив в середньому $0,54 \pm 0,06$, що виявилось на 23,9 % меншим, ніж у умовно здорових щурів, що може бути наслідком гіпертрофії нефронів та іншим патологічним процесам в нирках.

Мікроскопічно виявлено значні порушення гістоструктури нирок піддослідних тварин. У полі зору присутні як гіпертрофовані, так і атрофовані ниркові тільця. У збережених тільцях просвіти клубочкових капілярів розширені, одні з них порожні, інші містять формені елементи крові. При цьому еритроцити розташовані у вигляді монетних стовпчиків. Спостерігається мезангіальна проліферація, яка є ознакою хронічної ендотоксемії. Наявна зерниста та гідропічна дистрофія мезангіоцитів та подоцитів. Руйнування останніх свідчить про порушення фільтраційного бар'єру. Частина ниркових клубочків зруйнована та дезорганізована, що

супроводжується парціальним некрозом клубочка. Крім цього виявлено вогнища склерозування клубочків або всього ниркового тільця. Зазначені зміни гломерулярного апарату можуть бути ознакою як компенсаторних, так і деструктивних змін в органі, що відбуваються при ХХН.

Присутні мозаїчні зміни епітеліальних клітин капсули ниркових тілець. В одних випадках спостерігається зерниста дистрофія, в інших - гіпертрофія та гіперплазія. Наслідком цього є потовщення парієтального листка капсули. У більшості ниркових тілець спостерігається суттєве розширення сечових просторів, хоча наявні тільця з нормальним або зменшеним просвітом капсули.

Морфологічні зміни в каналцях неоднотипні і пов'язані з патологічними змінами у ниркових тільцях (рис 3.15). Так, у нефронах з розширеними сечовими просторами в ниркових тільцях проксимальні та дистальні звивисті трубочки розширені. У нефронах, де спостерігається склероз клубочка або всього ниркового тільця, проксимальні та дистальні звивисті каналці звужені.

Спостерігаються різноманітні зміни епітеліоцитів в стінках проксимальних і дистальних трубочок. Більш виразні вони в стінці проксимальних каналців – клітини збільшені в об'ємі, перинуклеарні простори розширені, цитоплазма просвітлена з чисельними вакуолями. Збільшення розмірів епітеліоцитів і їх проліферація свідчить про розвиток компенсаторно-приспосувальних процесів.

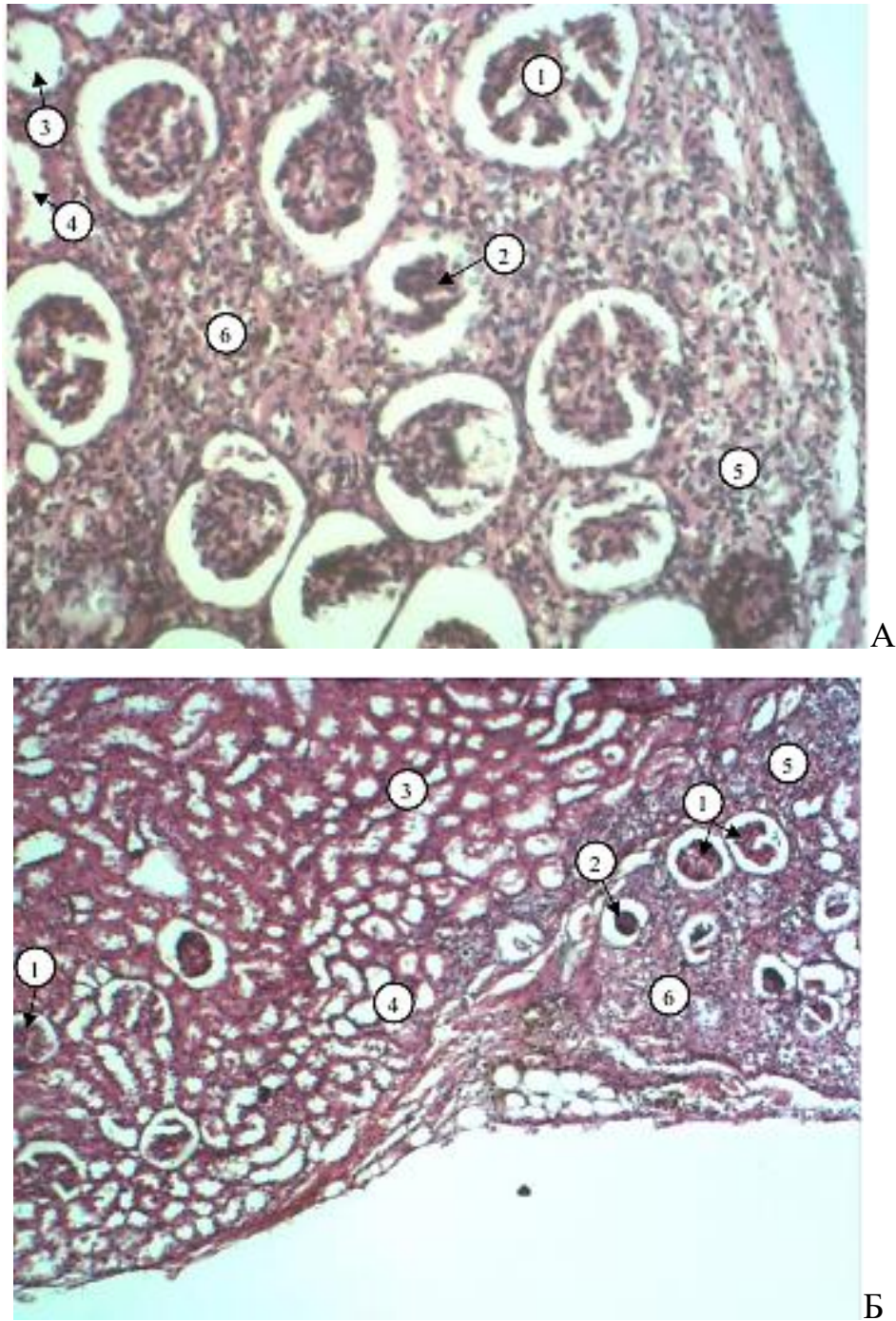


Рис. 3.15 Структура кіркової речовини кукси єдиної нирки щура, що залишилась після нефректомії при експериментальній ХХН на 41-у добу. Забарвлення гематоксилін еозин. А. Об'єктив x 10. Окуляр x 10. Б. Об'єктив x 4. Окуляр x 10. Позначення: 1 – ниркові тільця; 2 – склероз клубочка; 3 – розширені просвіти, клітинний детрит та зернисті циліндри проксимальних трубочок нефронів; 4 – розширені просвіти дистальних трубочок нефронів; 5 – гістіолімфоцитарна інфільтрація інтерстицію; 6 – склероз інтерстицію.

З іншого боку, в тубулярному апараті виявлені ознаки дистрофічно-некротичних змін. Так, частина епітеліоцитів у стінках проксимальних та

дистальних трубочок нефронів атрофічно та некротично змінені. В просвіті каналців виявлено білковий детрит, у деяких – еритроцити, що вказує на ушкодження стінки клубочкових капілярів та базальної мембрани. Спостерігаються вогнища зруйнованих звивистих проксимальних та дистальних трубочок з розростанням волокнистої сполучної тканини. Останній факт свідчить про розвиток фібропластичних змін. Зустрічаються мікрокісти різних розмірів (див. рис. 3.15).

В інтерстиції виявлено набряк, розширення лімфатичних судин, значні за розмірами ділянки склерозу, а також вогнищеву інфільтрацію лімфоцитами, моноцитами та макрофагами, що вказує про вогнищевий інтерстиційний лімфоцитарний нефрит (рис 3.16).

Просвіти мозкових відділів каналців переважно звужені, проте на окремих ділянках реєстрували вогнищеве розширення прямих мозкових трубочок, які утворювали мікрокісти.

Вени повнокровні, стінки набряклі, у просвітах містяться складжі еритроцитів. Стінка артеріол потовщена, частина просвітів звужена, в просвітах спостерігаються пристінкові тромби. Ендотеліальний шар судинної стінки як артерій, так і вен, місцями не суцільний з ділянками десквамації клітин, подекуди ендотеліоцити випинаються в просвіт судин. Гладкі міоцити в медії з ознаками зернистої дистрофії. Місцями судинна стінка набрякла з ознаками гіпереластозу. Подекуди спостерігається склероз стінок артеріол (рис. 3.16, 3.17).

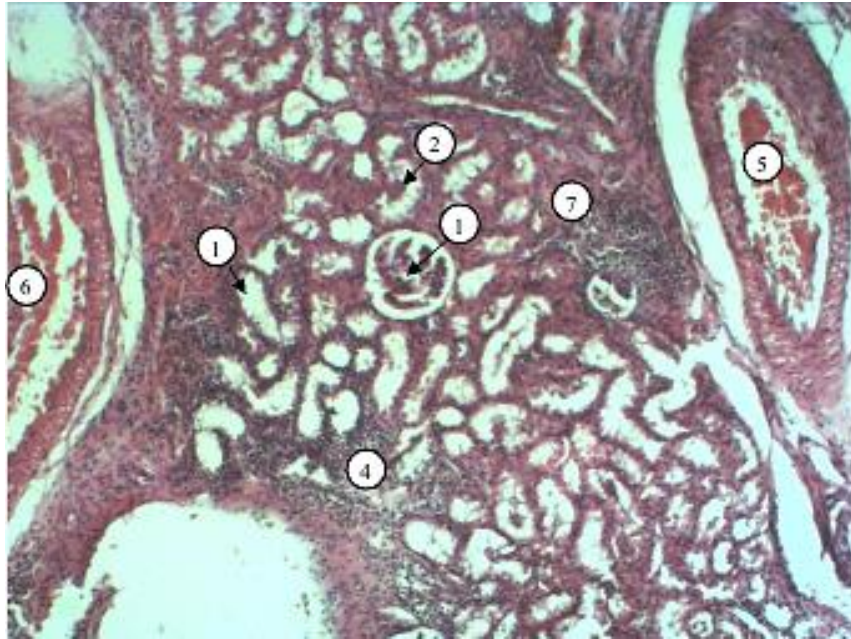


Рис 3.16 Структура кори та мозкової речовини кукси єдиної нирки щура, що залишилась після 5/6 нефректомії при експериментальній ХХН на 41-у добу. Забарвлення гематоксилін еозин. А. об'єктив x 10. Окуляр x 10. Позначення: 1 – ниркові тільця; 2 – клітинний детрит та зернисті циліндри в просвітах проксимальних трубочок; 3 – розширені просвіти дистальних трубочок; 4 – гістіолімфоцитарна інфільтрація інтерстицію; 5 – тромб в просвіті артеріоли; 6 – тромб в просвіті венули; 7 – склероз інтерстицію.

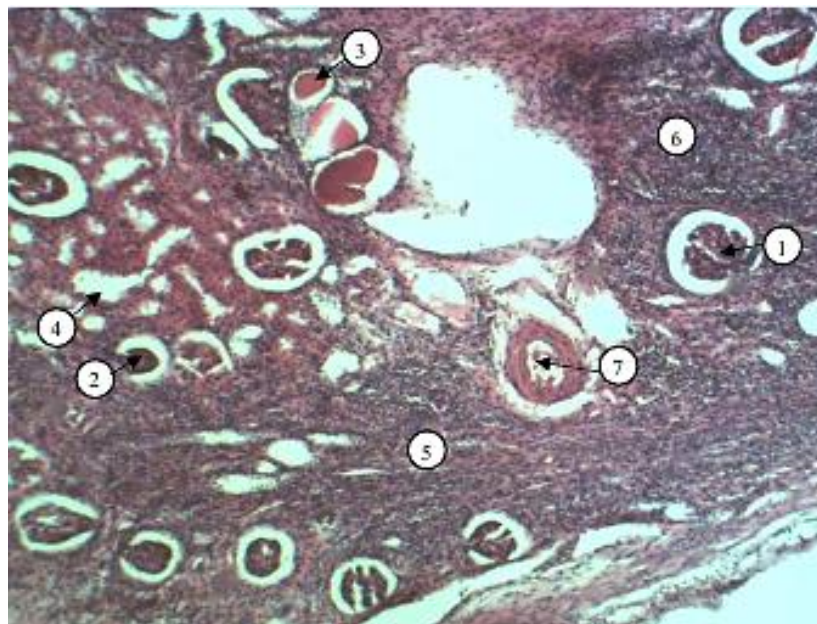


Рис 3.17 Фрагмент кори кукси єдиної нирки щура, що залишилась після нефротомії при експериментальній ХХН на 41-у добу. Забарвлення гематоксилін еозин. Об'єктив x 4. Окуляр x 10. Позначення: 1 – ниркові тільця; 2 – склероз клубочка; 3 – гіалінові циліндри в просвітах проксимальних трубочок; 4 – розширені просвіти дистальних трубочок; 5 – гістіолімфоцитарна інфільтрація інтерстицію; 6 – склероз інтерстицію; 7 – пристінкові тромби в артеріолах.

Таким чином, при морфологічному дослідженні єдиної нирки у щурів з ХХН без корекції виявлені патологічні зміни як у тканинах нирки, так і в судинній системі, які свідчать про дистрофічні, некробіотичні, атрофічні, склеротичні процеси, крім цього спостерігаються певні ознаки компенсаторної перебудови.

Морфологічна структура нирки щурів з ХХН за умови її корекції NaHS. При макроскопічному дослідженні нирок щурів, що залишилась після нефректомії при експериментальній ХХН за умови її корекції NaHS встановлено, що вони, як і в контрольних групах, м'якої консистенції, поверхня горбиста, сірувато-бурого кольору. Проте, на відміну від тварин з ХХН без корекції, сполучнотканинна оболонка потовщена в меншій мірі, не зрощена з паренхімою органу, під капсулою фіксуються лише поодинокі крововиливи. Масовий коефіцієнт нирки $0,61 \pm 0,01$. На розрізі малюнок шарів нирки та межа між ними чіткі. Ниркові миски помірно розширені.

При гістологічному дослідженні патологічні зміни в тканинах нирки також менш виразні, ніж у групі порівняння (патологія без лікування). Клубочки в ниркових тільцях однорідні. Просвіти клубочкових капілярів дещо розширені, помірно повнокровні, при цьому сладж-синдром у них відсутній. У деяких ниркових клубочках капіляри розташовані компактно, екстракапілярні простори відсутні, а в деяких – екстракапілярні простори розширені, знижена кількість мілких капілярних петель. Ознаки некробіотичних змін ендотеліоцитів у капілярних стінках відсутні. Кількість мезангіоцитів у клубочках збільшена, проте зернистої та гідропічної дистрофії у них, як і в подоцитах, не виявлено. В поодиноких ниркових тільцях спостерігається сегментарний склероз.

Товщина парієтального листка капсули ниркових тілець рівномірна без ознак гіпертрофії та гіперплазії клітин простого плоского епітелію. Сечові простори дещо розширені заповнені ексудатом без вмісту еритроцитів, що свідчить про цілісність фільтраційного бар'єру.

Частина проксимальних та дистальних звивистих каналців нефронів помірно розширені. Патологічні зміни в епітелії трубочок незначні, менша

кількість ендотеліоцитів з гіперхромними ядрами та більша кількість мітотичних фігур в порівнянні з такою у щурів з ХХН без лікування. Це може бути ознакою активації репаративних та регенераційних процесів. Спостерігається менша кількість великих за розмірами каналцевих кіст. Клітинний детрит та зернисті циліндри в просвітах виявляються рідко. Білкові маси та гіалінові циліндри в просвітах ниркових трубочок також займають меншу частину просвітів, ніж у щурів групи ХХН без лікування.

Вогнища проліферації гістіоцитів, лімфоцитів, а також гіперплазія фібробластів та колагенових волокон сполучної тканини навколо судин кровоносного мікроциркуляторного русла та ниркових трубочок в нирковій корі менш виражені, ніж у щурів з ХХН без лікування, вогнищ гіалінізованих та некротизованих волокон не виявлено. У поодиноких випадках виявляли ознаки дисплазії різного ступеню, а також запальні і склеротичні процеси. набряк інтерстицію мав незначний характер, рівномірно виражений у всіх відділах нирки. Діapedезні крововиливи, ділянки лімфогістіоцитарної інфільтрації та вогнища склерозу зустрічалися в невеликій кількості (рис. 3.18-3.19).

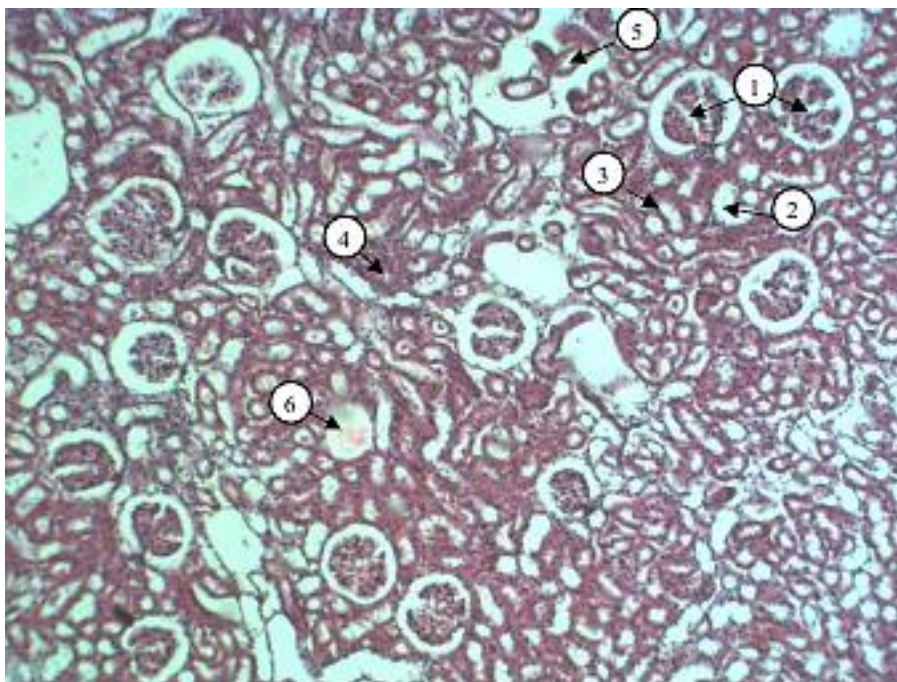


Рис. 3.18 Фрагмент кори кукси єдиної нирки щура при експериментальній ХХН за умов застосування NaHS для її корекції на 41-у добу. Забарвлення

гематоксилін-еозин. Об'єктив x 4. Окуляр x10. Позначення: 1 – ниркові тільця; 2 – проксимальні трубочки; 3 – дистальні трубочки; 4 – гістіолімфоцитарна інфільтрація; 5 – просвіт артеріоли; 6 – просвіт венули.

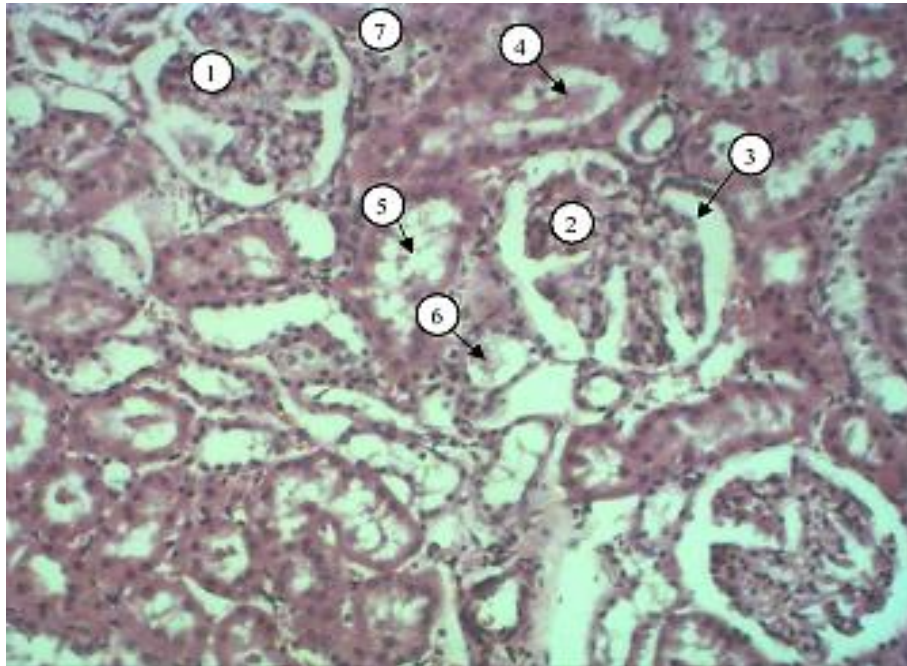


Рис. 3.19 Фрагмент кори кукси єдиної нирки щура при експериментальній ХХН за умов застосування NaHS для її корекції на 41-у добу. Забарвлення гематоксилін-еозин. Об'єктив x 10. Окуляр x 10. Позначення: 1 – ниркові тільця; 2 – клубочки; 3 – сечові простори; 4 – проксимальні трубочки; 5 – дистальні трубочки; 6 – помірно повнокровні просвіти венул; 7 – гістіолімфоцитарна інфільтрація.

При морфологічному дослідженні судинного русла нирки ознаки дисангіогенезу також були менш виражені. Стінки судин не потовщені, ендотеліальна вистілка без ознак дистрофічно-деструктивних змін, суцільна. Пристінкові тромби в просвітах ниркових та дугових артерій, міжчасткових артеріол виявляли рідко. Просвіти вен розширені, помірно повнокровні.

Резюме до розділу 3.

1. ХХН у щурів супроводжується порушенням метаболізму гідроген сульфід у нирках щурів: зменшується активність H_2S -продукуючих ферментів на 28,3-34,2 % ($p < 0,05$), зростає швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках на 34,3 % ($p < 0,05$) та знижується вміст H_2S на 35,8 % ($p < 0,05$), відносно контролю.

2. За умов ХХН відмічається зростання (на 30-70 %, $p < 0,05$) концентрації креатиніну, іонів Na^+ та K^+ в крові, елімінації білка з сечею, а

також зменшення (в 1,4-2,1 разу, $p < 0,05$) діурезу, ШКФ, екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею порівняно з контролем. Вказані гломеруло-тубулярні порушення за ХХН тісно корелюють з вмістом H_2S у нирках ($r=|0,54-0,85|$, $p < 0,05$).

3. Застосування пропаргілгіцину поглиблює фільтраційну недостатність та тубулярні порушення за ХХН (наприклад, ШКФ вірогідно зменшується на 44,4 %, протеїнурія достовірно зростає на 29,7 %). Натомість, введення NaHS за цих умов виявляє нефропротекторні властивості (наприклад, ШКФ достовірно зростає на 102 %, протеїнурія вірогідно зменшується на 24,1 %).

4. Застосування NaHS в умовах експериментальної ХХН сприяє зменшенню дегенеративно-дистрофічних змін у нирках, фібропластичних процесів, гемодинамічних розладів та виявляє ендотеліо- та епітеліопротекторну дію, а також зменшує процеси апоптозу і нормалізує показники клітинного циклу в клітинах кіркового шару нирок.

Матеріали цього розділу репрезентовано в таких публікаціях: [193, 194, 197, 198, 199].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ РОСЛИННИХ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК НА МЕТАБОЛІЗМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА ПОКАЗНИКИ РОБОТИ НИРОК (ФУНКЦІОНАЛЬНІ, БІОХІМІЧНІ, ЦИТОМЕТРИЧНІ, МОРФОЛОГІЧНІ) У ТВАРИН З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ХРОНІЧНОЮ ХВОРОБОЮ НИРОК

За даними літератури природні поліфенольні сполуки мають потужні нефропротекторні властивості [187]. Застосування геністеїну, кверцетину та ресвератролу за умов як гострого ураження нирок так і ХХН, супроводжується значним покращенням показників, які характеризують функціональний стан гломерулярного та тубулярного апаратів нирок. Нefропротекторні властивості вказаних поліфенольних сполук асоціюються з їх протизапальними, антиоксидантними, антиапоптотичними властивостями, здатністю покращувати кровопостачання нирок, посилювати діурез, клубочкову фільтрацію.

У попередньому розділі показано, що в патогенезі ураження нирок за експериментальної ХХН у щурів важливу роль відіграє порушення процесів ензиматичного утворення та утилізації ендogenous H_2S у нирках. На сьогодні дуже обмеженою є інформація щодо впливу природних поліфенольних сполук на стан системи гідроген сульфід у організмі щурів. Показано, що фітоестроген геністеїн збільшує продукцію H_2S у слизовій оболонці шлунку тварин за диклофенак-індукованої гастротоксичності. Застосування геністеїну збільшує вміст H_2S у серцево-судинній системі, зменшує швидкість утилізації H_2S та збільшує активність H_2S -продукуючих ензимів в міокарді та аорті за умов гіпергомоцистеїнемії. За цих умов введення кверцетину також супроводжувалось збільшенням вмісту H_2S та зменшенням швидкості його утилізації в серцево-судинній системі, але не впливало на активність H_2S -продукуючих ензимів [190]. На моделі пірогалол-індукованого оксидативного стресу у мишей показано, що застосування ресвератролу зменшує депримуєчий вплив активних кисневих дериватів на вміст H_2S в аорті [191].

Залишається невивченим вплив геністеїну, ресвератролу та кверцетину на метаболізм H_2S у нирках інтактних щурів та за умов хронічної хвороби нирок. Нез'ясована роль системи H_2S в реалізації нефропротекторного потенціалу вказаних сполук. Саме вирішенню вказаних проблемних питань присвячений цей розділ дисертаційного дослідження.

4.1 Дослідження показників обміну гідроген сульфїду у нирках щурів за експериментальної хронічної хвороби нирок на тлі застосування поліфенольних сполук (геністеїну, ресвератролу та кверцетину)

Застосовані поліфеноли стимулювали ензиматичне утворення H_2S у нирках щурів за ХХН (табл. 4.1). Однак, їх ефективність впливу на активність H_2S -продукуючих ензимів залежала від обраного поліфенолу. Так, геністеїн за ХХН виявляв найбільш потужний вплив на синтез H_2S у нирках. За цих умов активність ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ у нирках перевищувала відповідно на 18,7; 18,0 та 22,5 % ($p < 0,05$) такі показники в групі нелікованих тварин.

Ресвератрол виявляв менш виразний вплив на активність H_2S -продукуючих ензимів у нирках щурів за ХХН порівняно з геністеїном. За цих умов активність ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ у нирках перевищувала відповідно на 12,7; 13,9 та 15,6 % ($p < 0,05$) такі показники в групі тварин з ХХН, які не отримували поліфенольних коректорів.

Кверцетин виявляв найменш потужний вплив на процеси ензиматичного утворення H_2S у нирках щурів за ХХН. Виявилось, що застосування цього поліфенолу супроводжувалось достовірним зростанням активності ЦБС у нирках на 21,6 % ($p < 0,05$). У той же час у тварин з групи «ХХН + Кверцетин» активність продукції H_2S в реакціях, каталізованих ЦГЛ та ЦАТ, статистично достовірно не відрізнялась від таких показників у групі тварин з ХХН, які не отримували поліфенольних коректорів.

Введення досліджуваних сполук зменшувало, індуковане ХХН, прискорення неензиматичної деградації H_2S у нирках щурів (рис. 4.1). Показано, що призначення тваринам з ХХН геністеїну виявляло найменш

потужний вплив на процеси утилізації H_2S у нирках щурів. В групі тварин «ХХН + Геністеїн» середній показник швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках був на 18,9 % меншим ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН», однак залишався достовірно вищим, ніж в контролі.

Таблиця 4.1

Вплив природних поліфенолів на активність H_2S -продукуючих ензимів у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок ($M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Активність ензимів, нмоль H_2S / хв·мг протеїну		
	ЦГЛ	ЦБС	ЦАТ
Псевдооперовані тварини	1,72 ± 0,06	2,24 ± 0,10	2,43 ± 0,12
ХХН	1,23 ± 0,05*	1,56 ± 0,04*	1,60 ± 0,08*
ХХН + Геністеїн	1,46 ± 0,05*#	1,84 ± 0,06*	1,96 ± 0,07*
ХХН + Ресвератрол	1,39 ± 0,03*#	1,78 ± 0,08*#	1,85 ± 0,07*#
ХХН + Кверцетин	1,15 ± 0,06*	1,90 ± 0,06*#	1,67 ± 0,08*

Примітки:

1. * – $p < 0,001$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

За здатністю сповільнювати окисну деградацію H_2S у нирках щурів ресвератрол дещо поступався геністеїну. За цих умов середній показник швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках був на 17,6 % меншим ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН», однак залишався достовірно вищим, ніж у контролі.

Серед усіх поліфенолів найбільший вплив на процеси утилізації H_2S у нирках виявляв кверцетин. У групі тварин «ХХН + Кверцетин» середній показник швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках був на 20,5 % меншим ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН», однак залишався достовірно вищим, ніж у контролі.

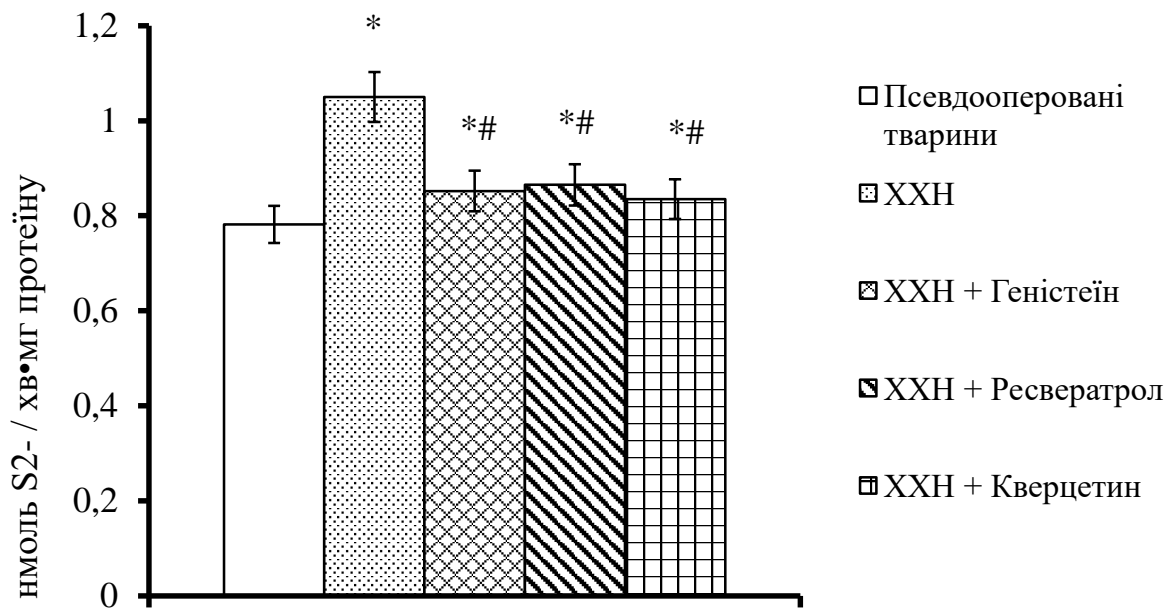


Рис. 4.1 Вплив природних поліфенолів на швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * – $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # – $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Обрані поліфенольні сполуки зменшували дефіцит H_2S у нирках щурів за ХХН (рис. 4.2). За цих умов найбільш виразний вплив на рівень H_2S виявляв саме геністеїн. У тварин, які отримували геністеїн, вміст H_2S у нирках перевищував на 30,8 % ($p < 0,05$) такий показник в групі нелікованих тварин з ХХН.

Порівняно з геністеїном ресвератрол виявляв менш виразний вплив на вміст H_2S у нирках щурів за ХХН. У групі тварин «ХХН + Ресвератрол» рівень H_2S у нирках був вищим на 22,9 % ($p < 0,05$), відносно групи тварин з ХХН, які не отримували поліфеноли.

Найменшу здатність відновлювати запаси ендogenous H_2S у нирках за ХХН виявляв кверцетин. В групі тварин «ХХН + Кверцетин» рівень H_2S у нирках був вищим на 16,4 % ($p < 0,05$), відносно групи тварин з ХХН, які не отримували поліфеноли.

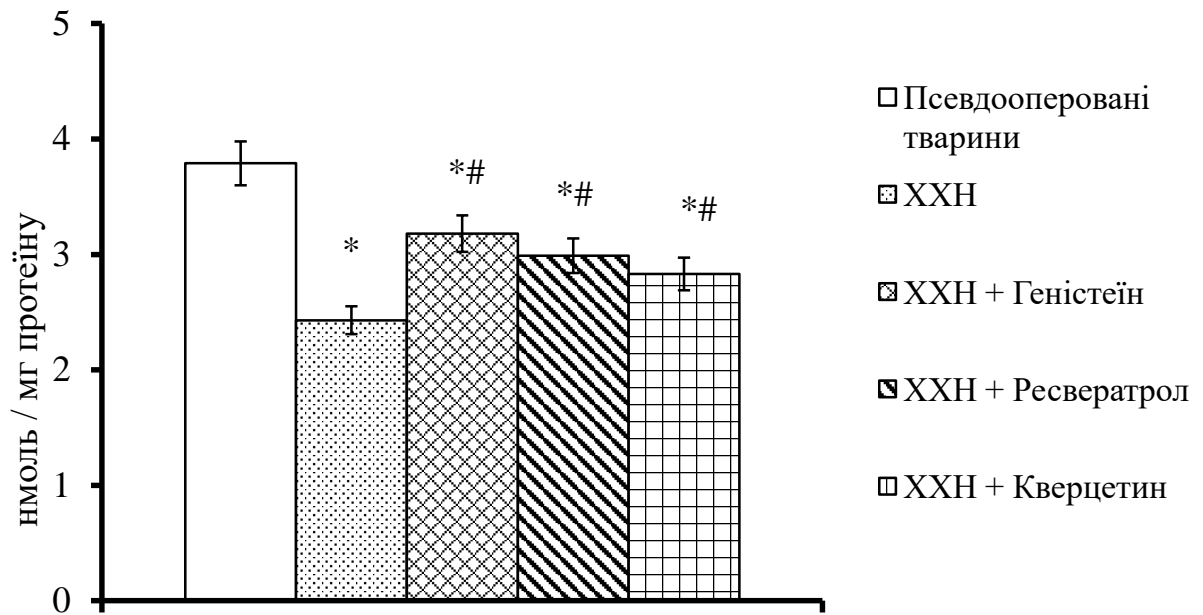


Рис. 4.2 Вплив поліфенольних сполук на вміст H_2S у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * – $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # – $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Нами також досліджено питання щодо впливу поліфенолів на стан системи гідроген сульфїду у нирках умовно здорових щурів. Застосування природних поліфенолів у інтактних тварин викликало збільшення ензиматичної продукції H_2S у нирках (табл. 4.2). Серед досліджуваних поліфенолів лише геністеїн та ресвератрол сприяли посиленню синтезу H_2S за участі ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ. У групі тварин, які отримували геністеїн та ресвератрол, активність ЦГЛ у нирках перевищувала показники інтактних тварин відповідно на 15,1 та 11,7 % ($p < 0,05$), активність ЦБС – на 14,4 та 13,1, активність ЦАТ – на 17,7 та 13,3 %, порівняно з умовно здоровими щурами. В той же час, у тварин, лікованих кверцетином, достовірних відмінностей активності ЦГЛ та ЦАТ не зареєстровано, а активність ЦБС на 17,5 % ($p < 0,05$) перевищувала показник інтактних тварин.

Використані поліфеноли, особливо геністеїн, збільшували запаси ендogenous H_2S у нирках інтактних щурів (рис. 4.3). У тварин, лікованих

геністеїном, ресвератролом та кверцетином, вміст H_2S у нирках був більшим відповідно на 24,4, 18,6 та 12,9 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Таблиця 4.2.

Вплив поліфенольних полук на активність H_2S -продукуючих ензимів у нирках інтактних щурів (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Активність ензимів, нмоль H_2S / хв·мг протеїну		
	ЦГЛ	ЦБС	ЦАТ
Інтактні тварини	$1,75 \pm 0,04$	$2,30 \pm 0,09$	$2,53 \pm 0,09$
Геністеїн	$2,01 \pm 0,03^*$	$2,63 \pm 0,07^*$	$2,98 \pm 0,10^*$
Ресвератрол	$1,95 \pm 0,05^*$	$2,60 \pm 0,08^*$	$2,87 \pm 0,11^*$
Кверцетин	$1,79 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,05^*$	$2,52 \pm 0,07$

Примітка. * – $p < 0,001$ відносно інтактних тварин.

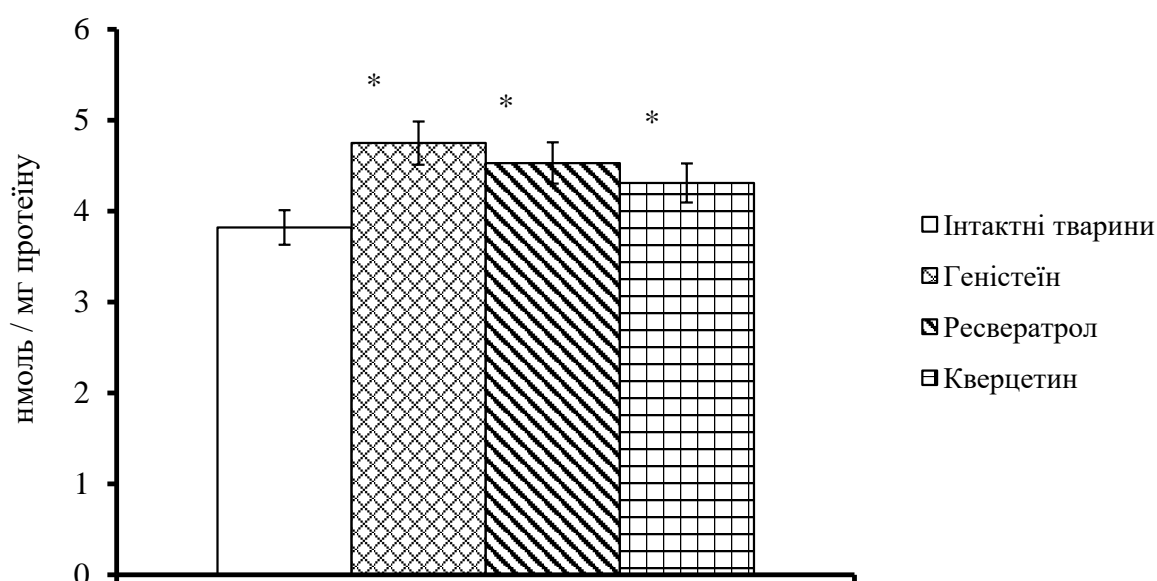


Рис. 4.3 Вплив рослинних поліфенолів на вміст H_2S у нирках інтактних щурів (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка. * – $p < 0,001$ відносно інтактних тварин.

Проведені дослідження засвідчили, що спрямованість впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на метаболізм H_2S у нирках інтактних щурів співпадала з такою за ХХН.

4.2 Дослідження функціонального стану нирок та його зв'язку з вмістом гідроген сульфідом за експериментальної хронічної хвороби нирок на тлі застосування геністеїну, ресвератролу та кверцетину

Використання поліфенольних коректорів сприяє посиленню фільтрації креатиніну в нирках за ХХН (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

Вплив поліфенольних сполук на вміст креатиніну в плазмі крові та сечі у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Креатинін	
	Плазма крові, мкмоль / л	Сеча, ммоль / л
Псевдооперовані тварини	$86,0 \pm 2,45$	$7,07 \pm 0,19$
ХХН	$130 \pm 4,36^*$	$4,91 \pm 0,18^*$
ХХН + Геністеїн	$97,8 \pm 3,03^{*#}$	$6,10 \pm 0,27^{*#}$
ХХН + Ресвератрол	$105 \pm 3,05^{*#}$	$5,75 \pm 0,25^{*#}$
ХХН + Кверцетин	$112 \pm 3,36^{*#}$	$5,58 \pm 0,21^{*#}$

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

За цим ефектом геністеїн випереджав інші поліфеноли. В групі тварин «ХХН + Геністеїн» вміст креатиніну в плазмі крові був меншим на 24,8 % ($p < 0,05$), а в сечі – більшим на 24,2 % ($p < 0,05$) порівняно з групою нелікованих тварин. У тварин групи «ХХН + Ресвератрол» рівень креатиніну в плазмі крові був меншим на 19,2 % ($p < 0,05$), а в сечі – більшим на 17,1 % ($p < 0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. Найменшу здатність стимулювати фільтрацію креатиніну за ХХН мав кверцетин. За умов його введення рівень креатиніну в плазмі крові був меншим на 13,8 % ($p < 0,05$), а в сечі – більшим на 13,6 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами.

Кореляційний аналіз надав важливі докази того, що стимулювальний вплив поліфенолів на елімінацію креатиніну за ХХН опосередковується через їх здатність поповнювати запаси H_2S . Між рівнем H_2S у нирках та концентрацією креатиніну в плазмі крові виникає сильна обернена кореляція ($r=-0,72$; $p < 0,05$), а з рівнем креатиніну в сечі – значущий прямий зв'язок ($r=-0,66$; $p < 0,05$).

Застосування поліфенолів супроводжується посиленням діурезу та ШКФ за ХХН, причому найбільш потужний вплив на ці процеси має геністеїн, а найменший реєструється у кверцетину (табл. 4.4). У групі тварин «ХХН + Геністеїн» діурез був більшим на 23,1 % ($p < 0,05$), а ШКФ – на 102 % ($p < 0,05$) порівняно з групою нелікованих тварин. У тварин групи «ХХН + Ресвератрол» діурез був більшим на 19,1 % ($p < 0,05$), а ШКФ – на 72,1 % ($p < 0,05$) порівняно з групою нелікованих тварин. За умов введення кверцетину відмічалось зростання діурезу та ШКФ відповідно на 14,2 та 49,8 % ($p < 0,05$).

Таблиця 4.4

Вплив поліфенольних сполук на швидкість клубочкової фільтрації та діурез у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Діурез, мл / 8 год	ШКФ, мл / хв
Псевдооперовані тварини	$5,38 \pm 0,13$	$0,461 \pm 0,011$
ХХН	$3,50 \pm 0,14^*$	$0,139 \pm 0,008^*$
ХХН + Геністеїн	$4,31 \pm 0,11^{* \#}$	$0,281 \pm 0,013^{* \#}$
ХХН + Ресвератрол	$4,17 \pm 0,15^{* \#}$	$0,239 \pm 0,014^{* \#}$
ХХН + Кверцетин	$4,00 \pm 0,18^{* \#}$	$0,208 \pm 0,011^{* \# \dagger}$

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН ;
3. † – $p < 0,05$ відносно групи «ХХН + Геністеїн».

Здатність поліфенолів посилювати діурез та ШКФ за ХХН асоціюється з їх стимулювальним впливом на рівень H_2S у нирках. Так, між вмістом H_2S у

нирках та діурезом виникали прямі значущі кореляції середньої сили ($r=0,66$; $p < 0,05$), а з ШКФ – сильні прямі зв'язки ($r=0,74$; $p < 0,05$).

Обрані поліфеноли коригували обмін Na^+ в організмі щурів за ХХН (табл. 4.5). За вказаним ефектом геністеїн випереджає інші сполуки. Призначення геністеїну супроводжується зменшенням вмісту Na^+ в плазмі крові на 17,9 % ($p < 0,05$) та збільшенням його екскреції з сечею на 17,5 % ($p < 0,05$), відносно тварин групи «ХХН». Ресвератрол за цих умов виявляв менший ефект на обмін Na^+ : рівень цього електроліту в плазмі крові був меншим на 13,3 % ($p < 0,05$), а екскреція з сечею була більшою на 15,1 % ($p < 0,05$), відносно нелікованих тварин. Найменшу здатність коригувати обмін натрію виявляв кверцетин. В групі тварин «ХХН + Кверцетин» вміст Na^+ в крові був меншим на 12,3 % ($p < 0,05$), а його екскреція з сечею – більшою на 12,1 % ($p < 0,05$) відносно тварин групи «ХХН».

Таблиця 4.5

Вплив поліфенольних сполук на обмін Na^+ у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Na^+	
	Вміст у плазмі крові, ммоль / л	Ниркова екскреція, мкмоль / 8 год
Псевдооперовані тварини	$142 \pm 4,07$	$2,40 \pm 0,12$
ХХН	$196 \pm 3,11^*$	$1,66 \pm 0,08^*$
ХХН + Геністеїн	$161 \pm 3,52^{* \#}$	$1,95 \pm 0,07^{* \#}$
ХХН + Ресвератрол	$170 \pm 3,32^{* \#}$	$1,91 \pm 0,08^{* \#}$
ХХН + Кверцетин	$172 \pm 3,26^{* \# \dagger}$	$1,86 \pm 0,04^{* \#}$

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН;
3. † – $p < 0,05$ відносно групи «ХХН + Геністеїн».

Кореляційний аналіз показав, що властивість поліфенолів коригувати обмін Na^+ в організмі щурів за ХХН супряжено з їх здатністю покращувати

запаси H_2S у нирках. Між вмістом H_2S у нирках та рівнем натрію в плазмі крові є обернена значуща кореляція ($r=-0,59$; $p < 0,05$), а з ШКФ – значущий прямий зв'язок ($r=0,54$; $p < 0,05$).

Ще одним показником, який характеризував захисну нефропротективну дію рослинних поліфенольних сполук за ХХН є їх здатність покращувати транспорт іонів натрію. Так, якщо фільтраційна фракція Na^+ у щурів з ХХН становила в середньому $27,3 \pm 2$, мкмоль/хв на 100 г маси, що було вірогідно на 58,2% нижче, ніж у псевдооперованих щурів, то застосування геністеїну, ресвератролу та кверцетину збільшувало цей показник на 66,3, 49,5 та 31,8 %, відповідно. Показник абсолютної реабсорбції натрію, який також вірогідно знижувався за умов хронічної патології нирок ($21,4 \pm 1,63$ мкмоль/хв на 100 г маси проти $52,4 \pm 1,95$ мкмоль/хв на 100 г маси у псевдооперованих щурів), під впливом рослинних нефропротекторів зростав на 72,5, 53,3 та 33,2 %, відповідно. Аналогічний вектор змін зареєстровано і щодо відносної реабсорбції Na^+ . Найбільший вплив на показники, що досліджувалися виявляв геністеїн.

Застосування природних поліфенолів стимулює елімінацію K^+ з організму щурів за ХХН, причому саме геністеїн випереджав інші поліфеноли за вказаним ефектом (табл. 4.6). Застосування геністеїну супроводжується зменшенням вмісту K^+ в плазмі крові на 30,3 % ($p < 0,05$) та збільшенням його екскреції з сечею на 84,1 % ($p < 0,05$), відносно тварин групи «ХХН». Ресвератрол за цих умов виявляв менш виразний ефект на рівень K^+ в крові та сечі: вміст цього мікроелементу в плазмі крові був меншим на 25,0 % ($p < 0,05$), а екскреція з сечею – була більшою на 45,7 % ($p < 0,05$), відносно нелікованих тварин. Найменшу здатність посилювати елімінацію K^+ виявляв кверцетин. В групі тварин «ХХН + Кверцетин» вміст K^+ в крові був меншим на 20,1 % ($p < 0,05$), а його екскреція з сечею – більшою на 27,5 % ($p < 0,05$), відносно тварин групи «ХХН».

Вплив поліфенольних сполук на обмін K^+ у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Вміст K^+ у плазмі крові, ммоль / л	Ниркова екскреція K^+ , ммоль / 8 год
Псевдооперовані тварини	$4,60 \pm 0,14$	$38,2 \pm 1,06$
ХХН	$9,68 \pm 0,17^*$	$13,8 \pm 0,74^*$
ХХН + Геністеїн	$6,75 \pm 0,29^{*\#}$	$25,4 \pm 0,83^{*\#}$
ХХН + Ресвератрол	$7,26 \pm 0,34^{*\#}$	$20,1 \pm 0,78^{*\#}$
ХХН + Кверцетин	$7,73 \pm 0,35^{*\#\dagger}$	$17,6 \pm 0,65^{*\#\bullet}$

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН;
3. † - $p < 0,05$ відносно групи «ХХН + Геністеїн».
4. • - $p < 0,05$ відносно групи «ХХН + Ресвератрол».

Одним із механізмів коригувального впливу поліфенольних сполук на обмін K^+ за ХХН є їх здатність стимулювати поповнення запасів H_2S у нирках. Між вмістом H_2S у нирках та рівнем K^+ в плазмі крові виникає обернена значуща кореляція ($r = -0,64$; $p < 0,05$), а з ШКФ – прямий зв'язок ($r = 0,67$; $p < 0,05$).

Використання поліфенолів коригує співвідношення екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею за ХХН, однак ефективність залежить від обраної сполуки (рис. 4.4). Найбільш потужний вплив на екскрецію Na^+ та K^+ з сечею мав геністеїн: показник Na^+ / K^+ в сечі достовірно зменшувався на 36,9 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин. Ресвератрол поступався за даним ефектом геністеїну. Виявлялось, що за умов введення цього поліфенолу реєструвалось зменшення співвідношення Na^+ / K^+ в сечі на 21,8 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин.

Найменший вплив на екскрецію Na^+ та K^+ з сечею мав кверцетин. У групі тварин «ХХН + Кверцетин» показник Na^+ / K^+ в сечі був меншим на 12,6 % ($p < 0,05$), порівняно з тваринами групи «ХХН».

Здатність поліфенольних сполук посилювати екскрецію з сечею одночасно Na^+ та K^+ за ХХН реалізується через їх вплив на вміст H_2S у нирках.

Встановлено, що між рівнем H_2S у нирках та співвідношенням Na^+ / K^+ в сечі виникає значуща обернена кореляція ($r=-0,54$; $p < 0,05$).

Застосовані поліфенольні сполуки стимулювали реабсорбцію води у нирках щурів за ХХН (рис. 4.5). За вказаним ефектом поліфенол геністеїн випереджає інші сполуки. Призначення геністеїну супроводжується вірогідним збільшенням реабсорбції води відносно тварин групи «ХХН». За цих умов показник коливався в межах 96,2-97,2 %. Ресвератрол та кверцетин поступались геністеїну за здатністю стимулювати процеси реабсорбції води в каналцях нефрону за ХХН. Так, у групі «ХХН + Ресвератрол» реабсорбція води коливалась в діапазоні 95,7-96,9 %, а в групі «ХХН + Кверцетин» - 95,2-96,5 %.

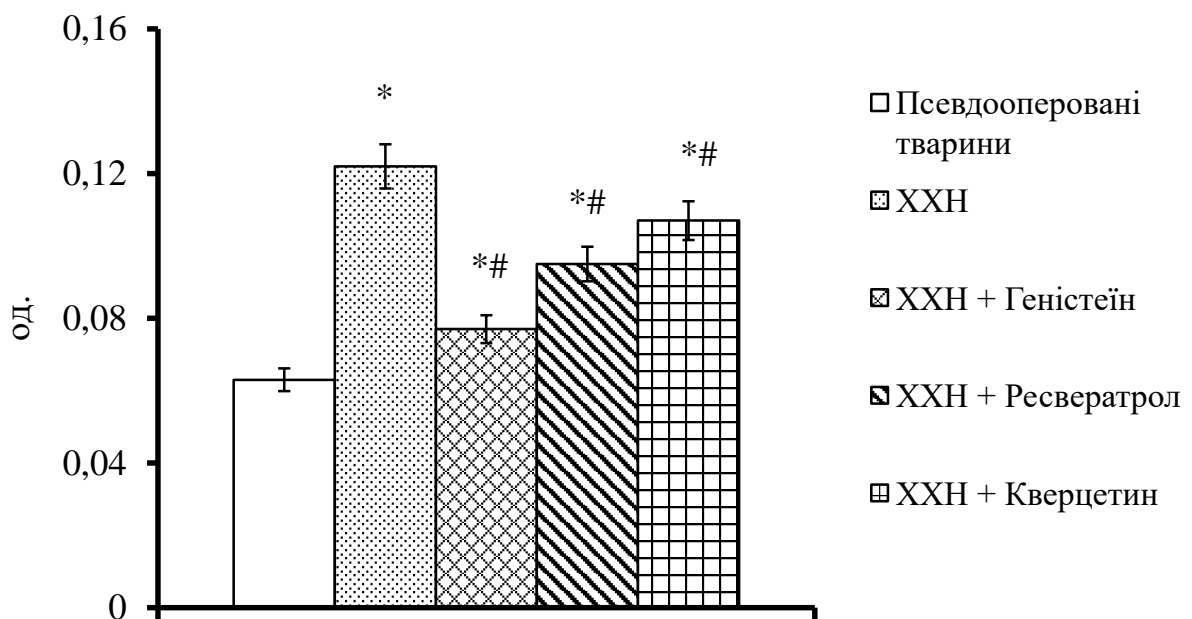


Рис. 4.4 Вплив поліфенольних сполук на співвідношення екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * – $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # – $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Кореляційний аналіз показав, що здатність поліфенолів стимулювати реабсорбцію води у нирках за ХХН також опосередковується через вплив на

систему H_2S у нирках. Між вмістом H_2S у нирках щурів та реабсорбцією води виникає пряма значуща кореляція ($r=0,52$; $p < 0,05$).

Нефропротекторна дія природних поліфенолів за ХХН реалізується також через їх здатність зменшувати екскрецію білка з сечею (рис. 4.6). Найбільш потужний вплив на процеси екскреції білка з сечею виявляв геністеїн. За цих умов відмічалось зменшення цього показника на 22,8 % ($p < 0,05$), відносно нелікованих тварин. Ресвератрол поступався за даним ефектом геністеїну. Виявлялось, що за умов введення цього поліфенолу реєструвалось зменшення екскреції білка з сечею на 17,2 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин. Найменший вплив на екскрецію білка з сечею мав кверцетин. В групі тварин «ХХН + Кверцетин» цей показник був меншим на 12,4 % ($p < 0,05$) порівняно з тваринами групи «ХХН».

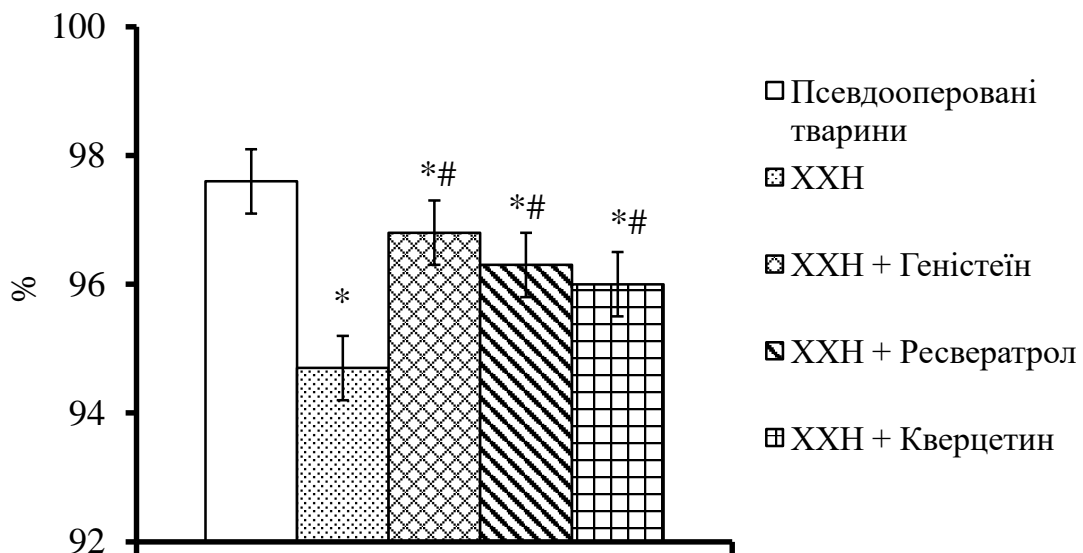


Рис. 4.5 Вплив природних поліфенолів на реабсорбцію води у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок ($M \pm m$, $n=10$). Примітка: * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Коригувальний вплив поліфенолів на екскрецію білка з сечею за ХХН певною мірою обумовлений здатністю цих сполук збільшувати вміст H_2S у нирках.

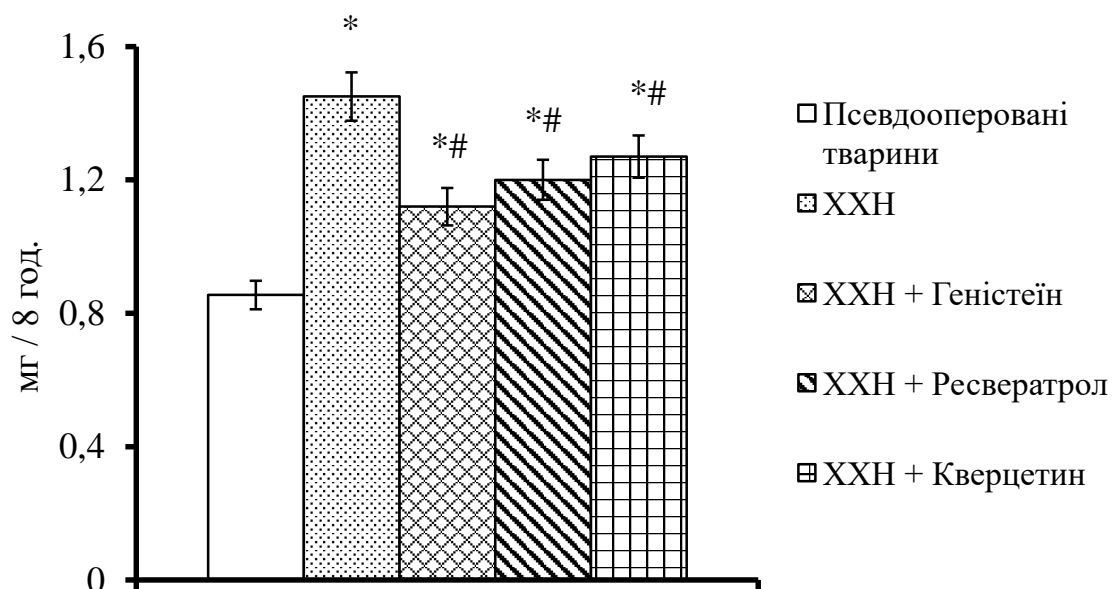


Рис. 4.6 Вплив природних поліфенолів на екскрецію білка з сечею у щурів на моделі хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Показано, що між вмістом H_2S у нирках щурів та екскрецією білка з сечею виникала обернена значуща кореляція ($r = -0,52$; $p < 0,05$).

Таким чином, застосування поліфенолів за ХХН стимулює продукцію H_2S , сповільнює його деградацію, відновлює запаси ендogenous H_2S у нирках щурів, що супроводжується виразною нефропротекторною дією (покращенням фільтрації у нирках, процесів реабсорбції води, електролітного обміну, стану тубулярного апарату).

4.3 Дослідження маркерів оксидативного стресу, активності ізоформ NO-синтази та їх зв'язку з вмістом гідроген сульфїду за експериментальної хронічної хвороби нирок на тлі застосування природних поліфенолів (геністеїну, ресвератролу та кверцетину)

Застосування поліфенольних сполук за ХХН зменшувало продукцію супероксидного аніон-радикалу в реакції, каталізованій НАДФН-оксидазою (рис. 4.7). Так, у тварин з ХХН відмічається зростання активності НАДФН-оксидази на 86,5 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем. Введення геністеїну

тваринам з ХХН сповільнювало утворення супероксидного аніон-радикалу: активність НАДФН-оксидази була на 21,7 % меншою ($p < 0,05$), відносно групи нелікованих тварин. У групі тварин «ХХН + Ресвератрол» відмічалось зменшення НАДФН-оксидазної активності на 23,2 % ($p < 0,05$), порівняно з тваринами групи «ХХН». Найбільш потужний вплив на продукцію супероксиду мав кверцетин: активність НАДФН-оксидази була на 30,4 % меншою ($p < 0,05$), ніж в групі нелікованих тварин.

Кореляційний аналіз засвідчив, що в групах тварин з ХХН, які отримують поліфеноли, між рівнем H_2S у нирках та активністю НАДФН-оксидази виникав сильний обернений зв'язок ($r = -0,71$; $p < 0,05$). Тобто вплив поліфенолів на систему гідроген сульфід асоціюється з їх здатністю сповільнювати продукцію супероксидного аніону.

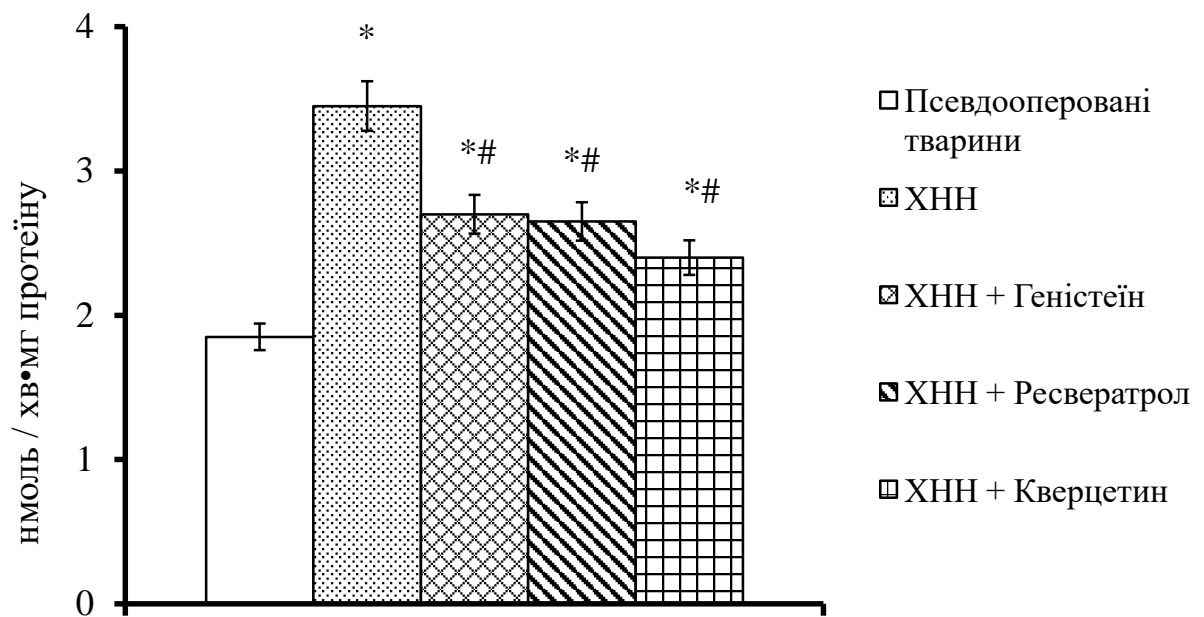


Рис. 4.7 Вплив природних поліфенолів на активність НАДФН-оксидази у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$).

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Обрані поліфеноли за ХХН збільшували швидкість реакції знешкодження супероксиду в реакції, каталізованій супероксиддисмутазою (СОД) (рис. 4.8). ХХН у щурів супроводжувалась депримуєчим впливом на швидкість знешкодження супероксидного аніону: активність СОД була на 36,3 % меншою ($p < 0,05$), порівняно з псевдооперованими тваринами. Введення геністеїну викликало збільшення активності СОД на 29,7 % ($p < 0,05$), а застосування ресвератролу – на 32,8 % ($p < 0,05$), відносно тварин з ХХН, які не отримували коректорів. Найбільший вплив на процеси інактивації супероксиду мав кверцетин: активність СОД була на 38,7 % ($p < 0,05$) вищою, ніж у групі нелікованих тварин. Між рівнем H_2S та активністю СОД у нирках щурів виникає пряма значуща кореляція ($r=0,65$; $p < 0,05$).

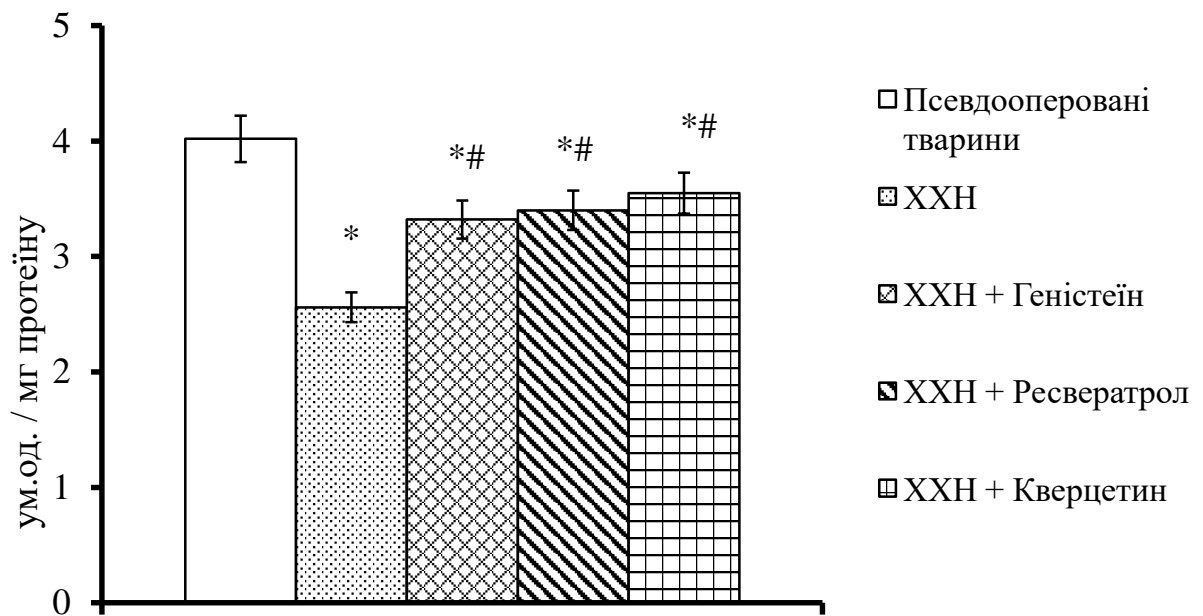


Рис. 4.8 Вплив природних поліфенолів на активність СОД у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Застосування поліфенольних сполук за ХХН сповільнює реакції вільнорадикального окиснення ліпідів у нирках щурів (рис. 4.9). За умов ХХН відмічається посилення перекисного окиснення ліпідів, доказом чого є

зростання рівня вторинного продукту ліпопероксидації малонового діальдегіду (МДА) на 101,4 % ($p < 0,05$), порівняно з групою контрольних тварин. Натомість, застосування геністеїну за ХХН сприяє зменшенню вмісту МДА у нирках на 33,5 % ($p < 0,05$), а призначення ресвератролу – на 34,8 % ($p < 0,05$), відносно нелікованих тварин. Найбільший коригувальний вплив на процеси пероксидації ліпідів мав кверцетин. За цих умов вміст МДА був на 40,4 % меншим ($p < 0,05$), ніж у тварин з ХХН, які не отримували поліфенолів. За результатами кореляційного аналізу між рівнем H_2S та вмістом МДА у нирках виникає обернена сильна кореляція ($r = -0,74$; $p < 0,05$).

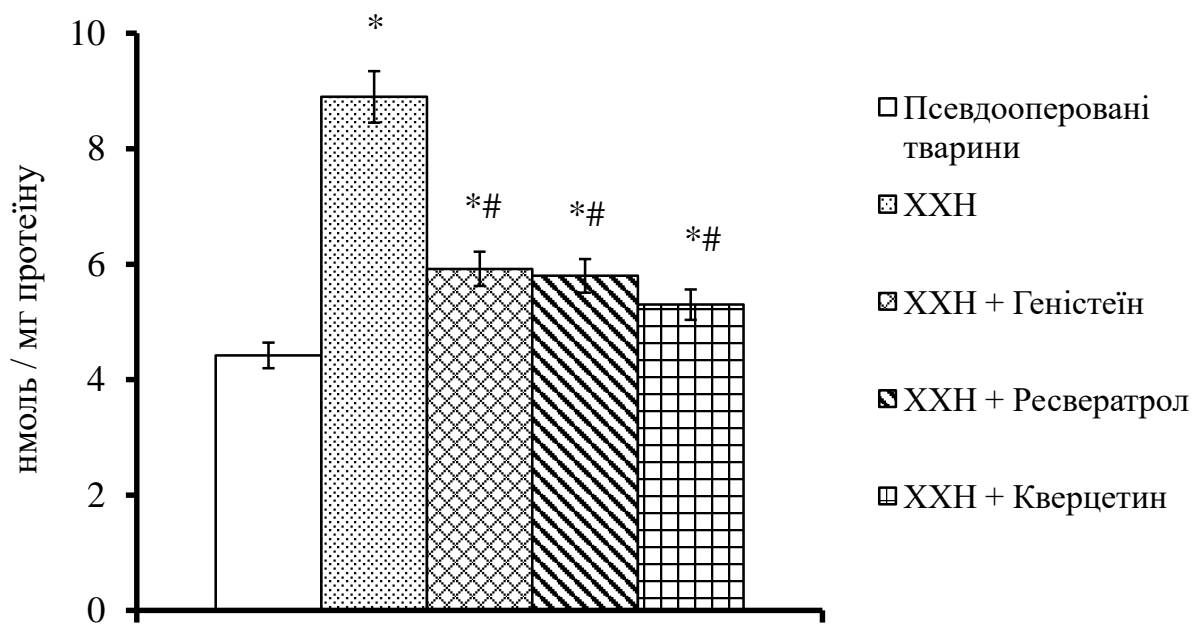


Рис. 4.9 Вплив природних поліфенолів на вміст МДА у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Використання природних поліфенолів за ХХН стримує гіперактивацію реакцій вільнорадикального окиснення протеїнів у нирках щурів (рис. 4.10). У щурів з ХХН виникає гіперактивація перекисного окиснення білків, доказом чого було зростання рівня карбонільних груп протеїнів (КГП) у нирках на 84,1 % ($p < 0,05$), порівняно з групою контрольних тварин. В той же час, застосування геністеїну за ХХН викликало зниження вмісту КГП у нирках на

21,0 % ($p < 0,05$), а призначення ресвератролу – на 24,0 % ($p < 0,05$), відносно нелікованих тварин. Найбільш виразний вплив на процеси пероксидації протеїнів мав кверцетин. За цих умов вміст КГП був на 31,1 % меншим ($p < 0,05$), ніж у тварин з ХХН, які не отримували поліфенолів. Між рівнем H_2S та вмістом КГП у нирках виникали обернені сильні кореляції ($r = -0,77$; $p < 0,05$).

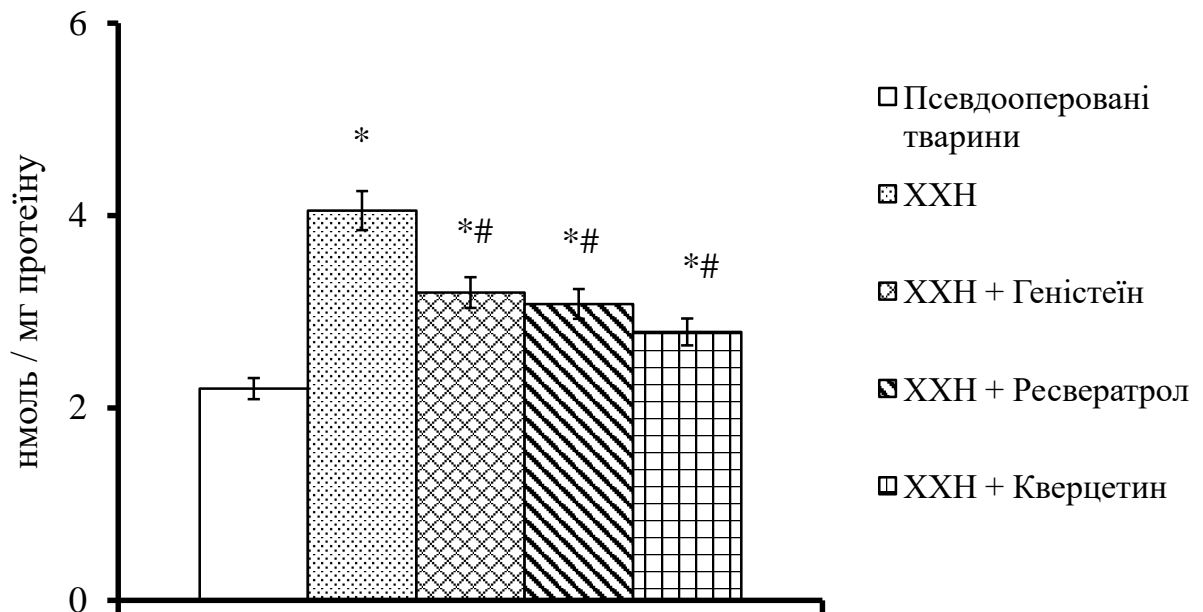


Рис. 4.10 Вплив природних поліфенолів на вміст КГП у нирках щурів за умов хронічної хвороби нирок (41 доба, $M \pm m$, $n = 10$). Примітка: * - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Використання геністеїну та ресвератролу супроводжувалось зменшенням дисбалансу в системі різних ізоформ NO-синтази у нирках щурів за ХХН: активність eNOS була більшою відповідно на 44,7 та 36,3 % ($p < 0,05$), а iNOS – меншою на 20,9 та 15,4 % відносно таких показників в групі нелікованих тварин (табл. 4.7). Тобто, найбільш потужний вплив на систему нітроген монооксиду у нирках за ХХН мав геністеїн. У той же час, застосування кверцетину за ХХН не викликало вірогідних змін активності ендотеліальної та індукцибельної ізоформ NO-синтази у нирках щурів.

Кореляційний аналіз показав, що між рівнем H_2S та активністю eNOS у нирках виникає сильний прямий зв'язок в групах «ХХН + Геністеїн» та «ХХН + Ресвератрол» ($r=0,72-0,75$; $p < 0,05$). Поряд з цим між рівнем H_2S та активністю iNOS у нирках виникає сильний обернений зв'язок в групах «ХХН + Геністеїн» та «ХХН + Ресвератрол» ($r=-(0,70-0,73)$; $p < 0,05$). Отримані дані є доказом того, що вплив геністеїну та ресвератролу на рівень гідроген сульфїду у нирках асоціюється з його біологічними ефектами на систему нітроген монооксиду.

Таблиця 4.7

Вплив природних поліфенолів на активність ендотеліальної та індукцїбельної ізоформ NO-синтази у нирках щурів за умов хронїчної хвороби нирок

(41 доба, $M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	eNOS, пмоль NO_2^- / хв·мг протеїну	iNOS, пмоль NO_2^- / хв·мг протеїну
Псевдооперовані тварини	$6,25 \pm 0,13$	$1,24 \pm 0,06$
ХХН	$3,42 \pm 0,17^*$	$2,15 \pm 0,08^*$
ХХН + Геністеїн	$4,95 \pm 0,13^{*\#}$	$1,70 \pm 0,04^{*\#}$
ХХН + Ресвератрол	$4,66 \pm 0,12^{*\#}$	$1,82 \pm 0,07^{*\#}$
ХХН + Кверцетин	$3,70 \pm 0,15^*$	$2,33 \pm 0,08^*$

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;
2. # – $p < 0,05$ відносно тварин з ХХН.

Проведені дослідження показали, що серед механїзмів впливу поліфенолів на стан системи гідроген сульфїду у нирках за ХХН можна виділити такі: 1) зменшення активності вільнорадикального окиснення ліпїдів та протеїнів на тлі відновлення рівноваги в системі про- та антиоксидантів; 2) зменшення активності індукцїбельної ізоформи та збільшення активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази у нирках (за винятком кверцетину, який достовірно не впливав на ці показники).

Враховуючи отримані дані, для подальшого поглибленого дослідження механізмів захисної дії на нирки за ХХН (вплив на клітинний цикл та ін.) було обрано найбільш перспективну сполуку – геністеїн, який виявив найкращі результати (за функціональними показниками).

4.4 Вплив геністеїну на показники клітинного циклу, фрагментацію ДНК у нирках щурів та їх зв'язок з вмістом гідроген сульфїду за експериментальної хронічної хвороби нирок

У попередній частині роботи було показано, що препарати рослинних поліфенолів здатні захищати нирки за умов хронічного ураження, і найбільш виразну нефропротекторну дію виявляв геністеїн. Для перевірки гіпотези про залученість антиапоптотичної компоненти в нейропротекторній дії цього ізофлавоноу в цій частині роботи було визначено показник фрагментації ДНК та інші характеристики клітинного циклу щурів з ХХН, які отримували геністеїн в лікувальному режимі. Хід експерименту описаний в розділі 2.

Результати засвідчили, що у тварин з експериментальною ХХН кількість клітинних подій в інтервалі SUB-G0G1, яка відзеркалює процеси апоптозу в клітинах кіркового шару нирок, становила $3,79 \pm 0,69$ %, що вірогідно (в 1,80 разу) перевищувало аналогічний показник у псевдооперованих тварин і свідчило про більшу частку ядер клітин з фрагментованою ДНК і, відповідно, індукцію апоптозу (табл. 4.8). У групі щурів, лікованих геністеїном, відсоток клітин, які знаходились в фазі SUB-G0G1, був на 16,6 % меншим, і становив $3,16 \pm 0,61$, однак ця різниця не сягала статистично вірогідних значень ($p > 0,05$), тому може бути розцінена як тенденція. Водночас у тварин, яким вводили геністеїн, у порівнянні з нелікованими тваринами з ХХН, зареєстровано вірогідне (в 3,7 разу) збільшення відсотку клітин кіркового шару нирок з вмістом ДНК $> 2c$ і $< 4c$, тобто таких, що перебувають у фазі синтезу ДНК (S-фазі), що практично відповідає результатам

псевдооперованих тварин та свідчить про нормалізацію цієї фази клітинного циклу.

Таблиця 4.8

Вплив геністеїну на показники клітинного циклу клітин кіркового шару нирок щурів з експериментальною ХХН (41 доба, $M \pm \sigma$)

Експериментальні групи (n=10)	Фази клітинного циклу, $M \pm \sigma$			
	G0G1	S	G2+M	SUB-G0G1
Псевдооперовані тварини	91,31 ± 1,0	1,66 ± 0,67	7,02 ± 0,73	2,1 ± 0,33
ХХН без лікування	93,75 ± 0,81	0,37* ± 0,16	5,88 ± 0,73	3,79 ± 0,69*
ХХН + геністеїн	92,31 ± 1,24	1,37 ± 0,65#	6,32 ± 0,68	3,16 ± 0,61*

Примітки:

1. статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно хибнооперованих щурів (критерій Манна-Вітні);
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно тварин з ХХН без лікування (критерій Манна-Вітні).

В той же час не було зареєстровано суттєвих змін в кількості клітин з вмістом ДНК=4с, тобто таких, що перебували в фазі G2+M, а також в фазі G0G1 між групами, що досліджувались.

Кореляційний аналіз показав, що на тлі лікування між вмістом H_2S у нирках та кількістю клітин в фазі SUB-G0G1 виникає достовірний обернений зв'язок ($r=-0,81$; $p < 0,05$), тоді як з кількістю клітин у фазі S – пряма кореляція ($r=0,78$; $p < 0,05$). Отримані дані свідчать, що нормалізувальний вплив геністеїну на клітинний цикл асоціюється з його здатністю поповнювати запаси H_2S у нирках.

Приклади ДНК-гістограм ядерних суспензій клітин кіркового шару нирок псевдооперованих щурів, а також тварин з ХХН без лікування та на тлі введення геністеїну наведено на рисунках 4.11-4.13.

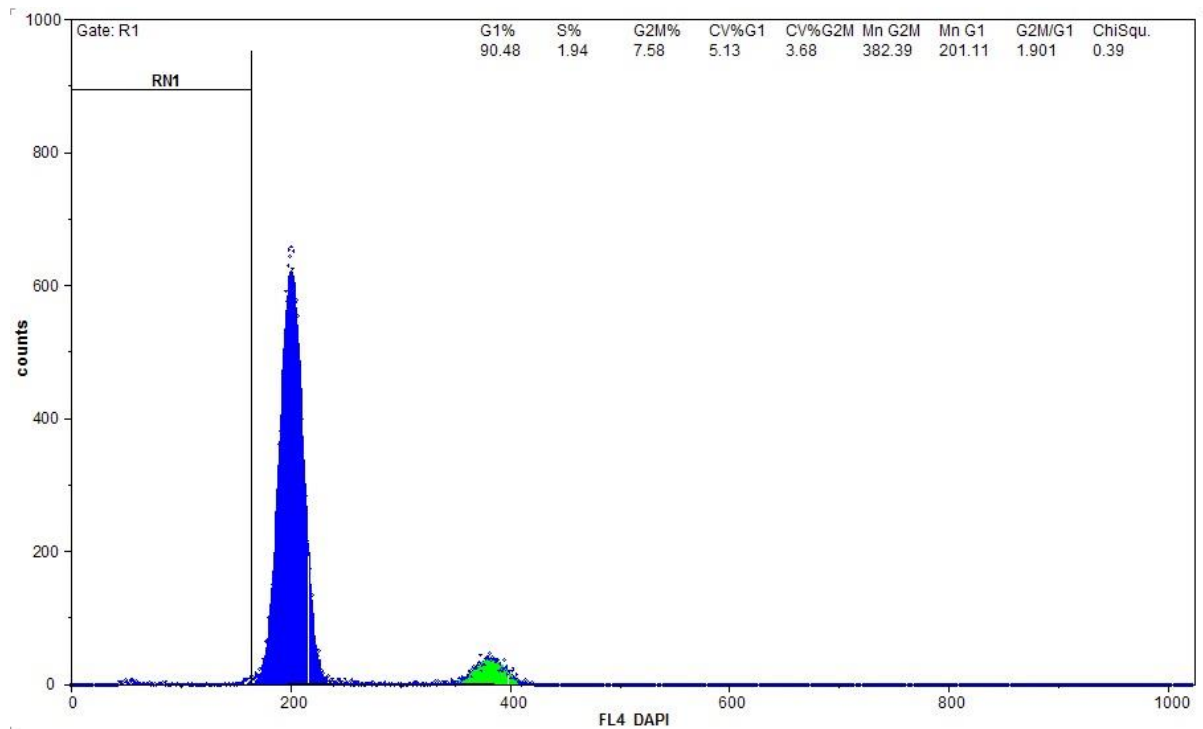


Рис. 4.11 ДНК-гістограма ядерної суспензій клітин коркової речовини нирки щура групи псевдооперованих тварин RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 1,85 %. Кількість подій 20000.

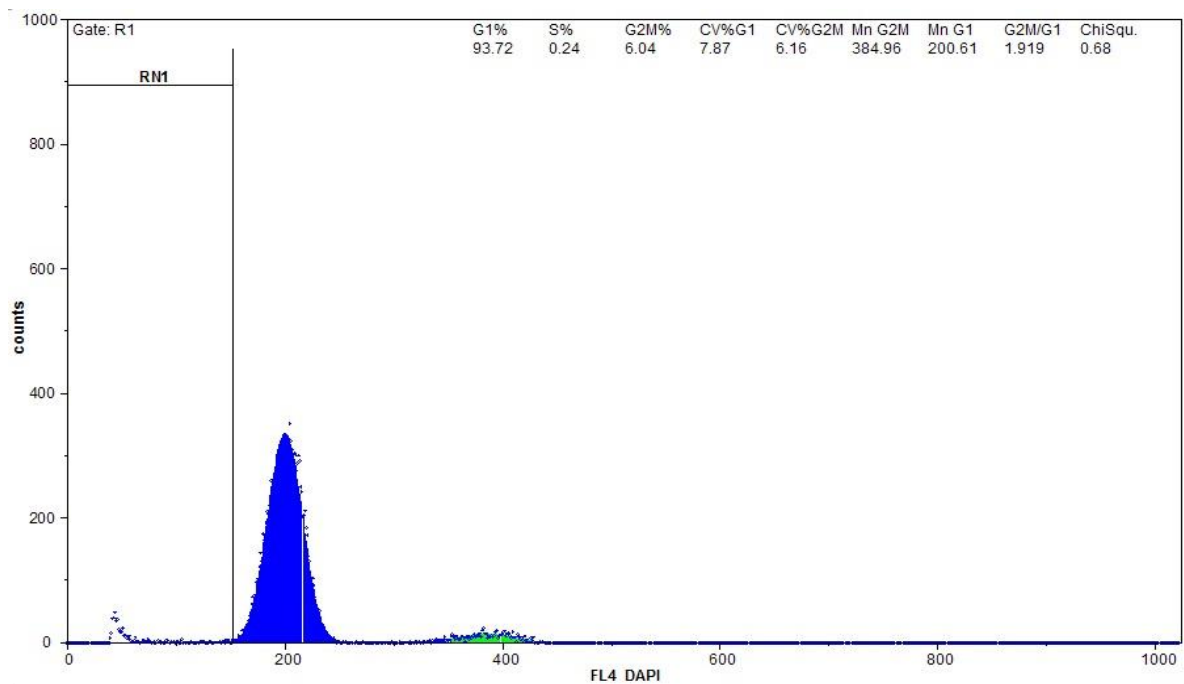


Рис. 4.12 ДНК-гістограма ядерної суспензій клітин коркової речовини нирки щура групи тварин «ХХН без лікування». RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 4,52 %. Кількість подій 20000.

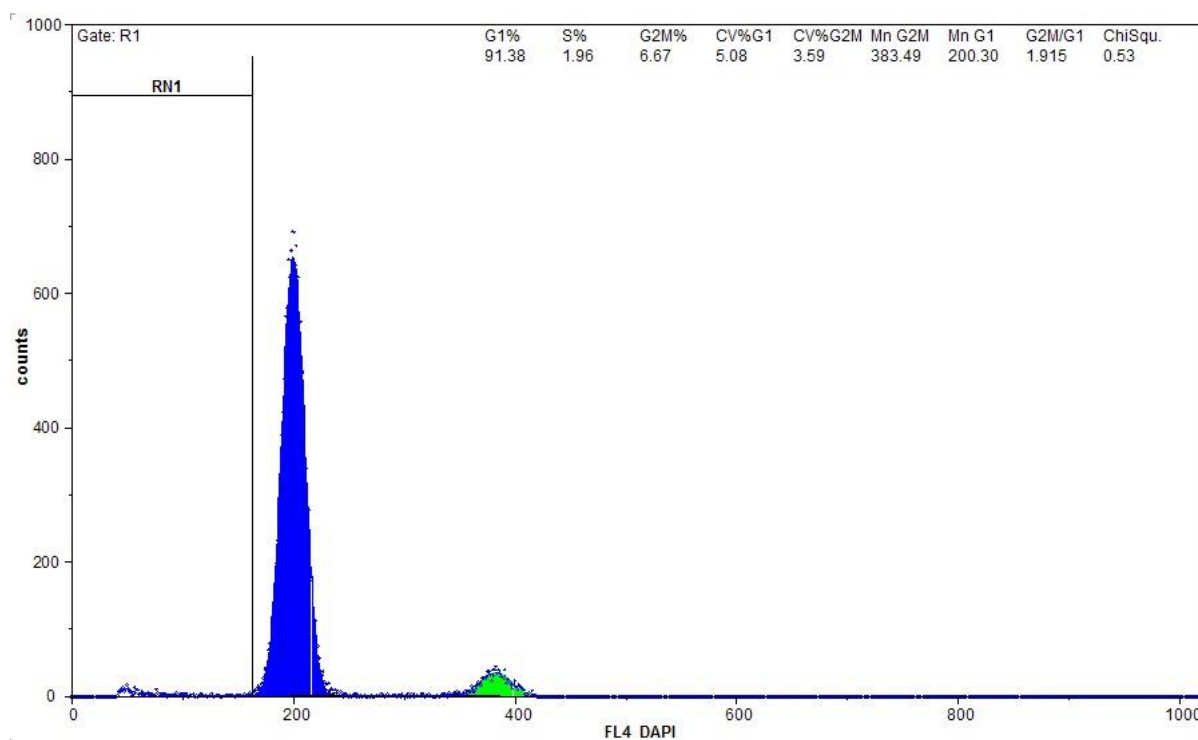


Рис. 4.13 ДНК-гістограма ядерної суспензій клітин коркової речовини нирки щура групи тварин «ХХН + геністеїн». RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 3,00 %. Кількість подій 20000.

4.5 Вплив геністеїну на морфологічний стан нирок щурів за умов експериментальної хронічної хвороби нирок

Для підтвердження описаних результатів про позитивний нефропротективний ефект геністеїну у щурів з ХХН було проведено дослідження гістологічних змін в структурі видільних органів у щурів з модельованою патологією на тлі введення геністеїну, як було описано в розділі 2.

Отриману гістологічну картину стану клубочкового апарату та тубулоінтерстиціальної зони нирок порівнювали із такою у щурів без експериментальної патології (умовно здорові тварини), а також із групою тварин з модельованою патологією без корекції.

Морфологічна будова нирки умовно здорових щурів та щурів з ХХН без лікування детально описана в розділі 3.5. Натомість макроскопічні зміни клубочкового апарату та тубулоінтерстиціальної зони у щурів, яким для лікування після 5/6 нефректомії вводили геністеїн, як і у випадку застосування NaHS, були менш виразні, ніж у тварин з ХНН без корекції. Органи м'якої консистенції. Їх поверхня горбиста, сірувато-бурого кольору, з поодинокими крововиливами під фіброзною капсулою. Сполучнотканинна оболонка потовщена, проте легко відділяється від паренхіми. Масовий коефіцієнт кульші нирки становить в середньому $0,59 \pm 0,02$. На розрізі межа між нирковою корою та мозковою речовиною чітка. Ниркові миски помірно розширені.

Мікроскопічно в ниркових клубочках виявлено ознаки дистрофічних змін (рис. 4.14-4.15). Капілярні петлі різного діаметру, помірно повнокровні. У клубочках спостерігаються варіабельні екстракапілярні простори та невелика кількість клубочкових кіст. Виявлено збільшення чисельності мезангіоцитів, деякі з них дистрофічно змінені. Частина ниркових тілець склерозована сегментарно, частина – повністю, навколо деяких з них виявлений фіброз. Однак перераховані явища були значно менше виражені в

порівнянні з такими у щурів з експериментальною ХХН єдиної нирки, яка залишилась після нефректомії без лікування в той же термін спостереження.

Епітелій в стінках проксимальних та дистальних трубочок нефронів подібний до такого у тварин, які отримували NaHS, проте мали місце ділянки вогнищевої десквамації і набрякості. Просвіт поодиноких звивистих трубочок дещо збільшений, подекуди заповнений гомогенною масою, що складалась із білка, злуценого епітелію і гіалінових або зернистих циліндрів. У сечових просторах та каналцях формені елементи крові не виявляли.

У мозковій речовині відмічене повнокров'я перитубулярних кровоносних капілярів та компактне розташування ниркових трубочок, недиференційованих трубочок не виявляли. Інтерстиційна тканина у стані помірного набряку, лімфатичні судини дещо розширені.

При дослідженні судинної системи нирки фіксували ознаки дисангіогенезу. Просвіти вен розширені, помірно повнокровні, в просвітах артерій та артеріол спостерігали поодинокі пристінкові тромби.

На фоні дистрофічних змін структур нефронів та судин кровоносного мікроциркуляторного русла виявлені ділянки лімфогістіоцитарної інфільтрації, накопичення колагенових волокон, які виявляли частіше, ніж у щурів з експериментальною ХХН єдиної нирки за умов корекції NaHS, проте рідше, ніж у щурів з експериментальною ХХН без лікування в той же термін дослідження.

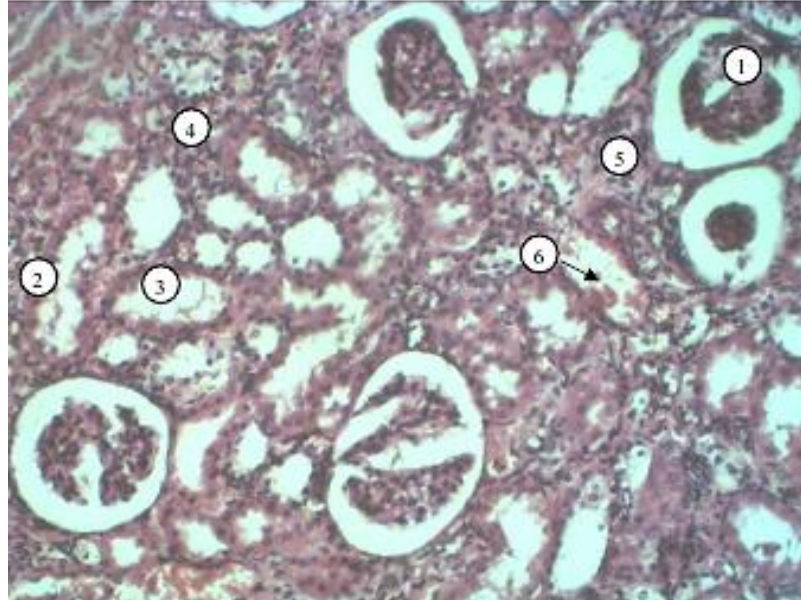


Рис. 4.14 Фрагмент кіркової речовини кукси єдиної нирки щура, яка залишилась після нефректомії при експериментальній ХХН за умов застосування геністеїну для її корекції на 41-у добу. Забарвлення гематоксилін еозин. Об'єктив x 10. Окуляр x 10. Позначення: 1 – ниркові тільця; 2 – проксимальні каналці; 3 – дистальні каналці; 4 – гістіолімфоцитарна інфільтрація; 5 – склероз інтерстицію; 6 – пристінкові тромби в артеріолах.

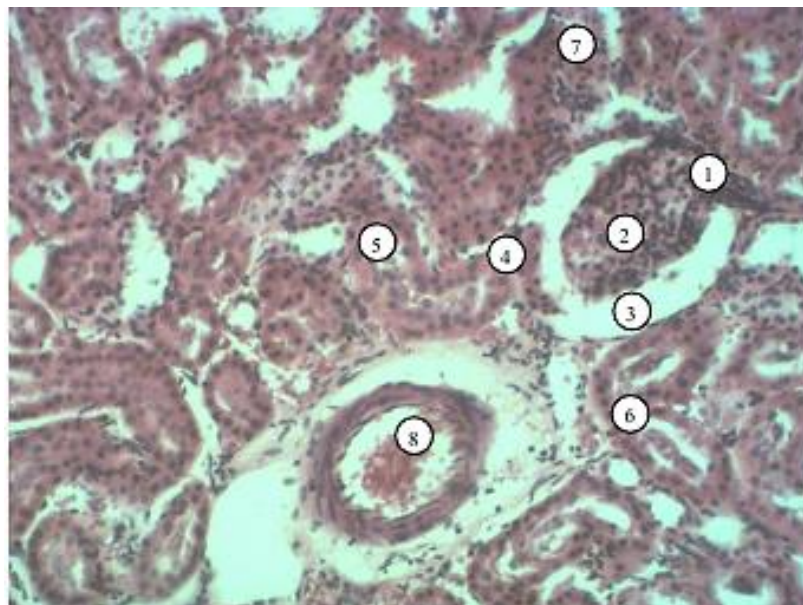


Рис. 4.15 Структура кіркової речовини кукси єдиної нирки щура, що залишилась після нефректомії при експериментальній ХХН за умов застосування геністеїну для її корекції на 41 добу. Забарвлення гематоксилін еозин. Об'єктив x 10. Окуляр x 10. Позначення: 1 – ниркові тільця; 2 – склероз клубочка; 3 – розширений сечовий простір; 4 – потовщений парієнтальний листок капсули ниркового тільця; 5 – проксимальні ниркові трубочки; 6 – дистальні ниркові трубочки; 7 – гістіолімфоцитарна інфільтрація інтерстицію; 8 – склероз інтерстицію.

Резюме до розділу 4

1. Поліфеноли за ХХН виявляють нефропротекторні властивості (наприклад, ШКФ достовірно зростає на 49,8-102 %, протеїнурія вірогідно зменшується на 12,4-22,8 %, $p < 0,05$), що супряжено з активацією H_2S -продукуючих ферментів (на 12,7-22,5 %, $p < 0,05$), зменшенням швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках (на 17,6-20,5 %, $p < 0,05$) та зростанням вмісту H_2S (на 16,4-30,8 %, $p < 0,05$). Серед поліфенолів саме геністеїн мав найбільш виразний коригувальний вплив на функціональні параметри нирок та стан системи H_2S за ХХН.

2. Досліджувані поліфенольні сполуки, особливо кверцетин виявляли антиоксидантну активність за ХХН, що проявлялось зменшенням вмісту МДА, КГП та активності НАДФН-оксидази (на 21,0-40,4 %, $p < 0,05$), а також збільшенням активності СОД (на 29,7-38,7 %, $p < 0,05$) у нирках, порівняно з нелікованими тваринами. В групі лікованих тварин між вмістом H_2S та показниками оксидативного стресу виникали достовірні сильні або значущі зв'язки ($r=|0,65-0,74|$; $p < 0,05$).

3. Використання ресвератролу та особливо геністеїну супроводжувалось зростанням у нирках активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази (на 36,3-44,7 %, $p < 0,05$) та зменшенням активності її індукційної ізоформи (на 15,4-20,9 %, $p < 0,05$) відносно нелікованих тварин. Система NO у нирках є важливою молекулярною мішенню через яку реалізується вплив геністеїну та ресвератролу на продукцію H_2S за ХХН: в групі тварин, лікованих геністеїном та ресвератролом, між вмістом H_2S та активністю різних ізоформ NO-синтази реєструвались достовірні сильні зв'язки ($r=|0,70-0,75|$; $p < 0,05$).

4. Застосування геністеїну для компенсації ХХН у щурів протидіяло процесам апоптозу в клітинах кіркового шару нирок, нормалізувало фази клітинного циклу, що асоціювалось зі здатністю поліфенолу поповнювати запаси H_2S у нирках. Між вмістом H_2S у нирках та кількістю клітин в фазі

SUB-G0G1 виникає достовірний обернений зв'язок ($r=-0,81$; $p < 0,05$), тоді як з кількістю клітин у фазі S – пряма кореляція ($r=0,78$; $p < 0,05$). Поряд з цим введення геністеїну стримувало розвиток структурних і дегенеративно-дистрофічних змін у нирках та сприяло активації компенсаторно-приспосувальних і регенеративних процесів, викликало нормалізацію гемодинаміки. За величиною нефропротекторної дії геністеїн практично не поступався натрій гідрогенсульфіду.

Матеріали цього розділу репрезентовані в таких публікаціях: [171, 215, 216, 217, 218, 220, 228, 229].

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Актуальність проблеми уражень нирок весь час зростає, оскільки ця патологія в світі охоплює від 10 до 16 % дорослого населення, а серед населення віком старшим 65 років її розповсюдженість становить більше 20 % і швидко зростає [1, 2]. Так, у 1990 році хронічна хвороба нирок (ХХН) займала 27 місце серед усіх причин смертності, а у 2010 р. займала 18 місце (зросла приблизно на 82 %), що становило третє місце за швидкістю приросту летальності серед 25 основних причин смерті (після ВІЛ/СНІД – 39,6 %, та діабету – 93 %) [4].

Біохімічні та патофізіологічні механізми ураження нирок є предметом інтенсивних досліджень. На сьогоднішній день не викликає сумнівів залучення таких процесів як прямий безпосередній токсичний вплив на клітинні мішені, субклітинні структури, ферментні чи транспортні білки, оксидативний та нітрозативний стрес, апоптоз та запалення, ендотеліальна дисфункція, тромбози та ін [10, 11]. Однак питання патогенезу ураження нирок залишається до кінця нез'ясованим. Тому дослідження молекулярних механізмів розвитку ХХН набуває особливої ваги з огляду на можливість виявлення нових маркерів нефротоксичності та розробки патогенетично обґрунтованих підходів до попередження і медикаментозного лікування ураження нирок.

Гідроген сульфід (H_2S), який утворюється в організмі в процесі метаболізму сірковмісних амінокислот гомоцистеїну та цистеїну, синтезується в нирках достатньо великих кількостях в реакціях, каталізованих ензимами ЦГЛ (КФ 4.4.1.1), ЦБС (КФ 4.2.1.22), 3-МСТ (ЕС 2.8.1.2) разом із ЦАТ (ЕС 2.6.1.3) [13, 14, 15]. H_2S виявляє властивості цитопротектора, антиагреганта, антикоагулянта, регулює ШКФ, реабсорбцію електролітів, має антиоксидантну, протизапальну та антиапоптотичну дію [13, 192, 193].

Дотепер залишається відкритим питання щодо ролі порушень метаболізму H_2S у нирках у патогенезі ХХН.

На сьогоднішній день існує велика кількість лікарських засобів та біологічно активних сполук, що виявляють здатність захищати нирки, серед яких окремим класом виступають рослинні засоби з політропною органопротекторною дією [16]. Багатогранна нефропротекторна активність при різних за етіологією ураженнях нирок притаманна, зокрема, флавоноїду кверцетину [16, 18], стильбеноїду ресвератролу [19], ізофлавоноу геністеїну [20]. Однак на сьогодні дуже обмеженою є інформація про їх вплив на систему H_2S у нирках щурів. Питання про те, якою мірою система H_2S залучена в реалізацію нефропротекторного потенціалу вказаних поліфенолів за умов патології видільних органів, наразі є відкритим. Тому метою роботи було експериментально обґрунтувати нові підходи до фармакотерапії хронічної хвороби нирок шляхом встановлення ролі порушень обміну гідроген сульфїду в патогенезі ХХН та можливості їх корекції препаратами рослинних поліфенольних сполук.

Для вирішення поставленої мети усі дослідження були розподілені на 3 основні етапи. **На 1 етапі** (розділ 3.1) нами вивчено стан системи H_2S у нирках та його зв'язок з функціональними параметрами нирок за ХХН (модель 5/6 нефректомії). Встановлено, що ХХН супроводжується формуванням дефіциту H_2S у нирках – вміст H_2S був меншим на 35,8 % ($p < 0,05$), порівняно з псевдооперованими тваринами (див. рис. 3.2). За цих умов реєструється зменшення активності H_2S -продукуючих ензимів ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ на 28,3-34,2 % ($p < 0,05$) відносно контрольної групи (див. табл. 3.1). Поряд з цим відмічається зростання швидкості неензиматичної утилізації екзогенного H_2S у нирках на 34,3 % ($p < 0,05$), порівняно з псевдооперованими тваринами (див. рис. 3.1). Таким чином, формування дефіциту H_2S у нирках щурів за ХХН є закономірним явищем і супряжене зі зростанням швидкості його утилізації в реакціях неензиматичного окиснення та зниженням ензиматичного утворення H_2S в реакціях, каталізованих ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ. Також ми оцінили

особливості метаболізму H_2S за гострого ураження нирок (див. табл. 3.2). Виявилось, що на моделі гострої міоглобінуричної нефропатії спрямованість змін обміну H_2S у нирках була протилежною до такої за ХХН: реєструвалось зростання вмісту H_2S на 40 % ($p < 0,05$) та активності ЦГЛ на 35 % ($p < 0,05$), порівняно з контрольною групою [195]. Отримані результати щодо особливостей обміну H_2S у нирках за гострої нефропатії та ХХН підтверджуються даними літератури. Так, на моделі ХХН у щурів було виявлено, що 5/6 нефректомія має пригнічувальний вплив на вміст H_2S та активність H_2S -синтезуючих ензимів у нирках [62]. Діабетична нефропатія у трансгенних мишей та тварин з стрептозотоцин-індукованим діабетом також супроводжується зниженням активності ЦГЛ у нирках [64, 103; 104]. Натомість, за гострого ураження нирок цисплатином та доксорубіцином відмічалось зростання вмісту H_2S та активності H_2S -синтезуючих ензимів [94], донатори H_2S поглиблювали пошкодження нирок, тоді як гальмування його синтезу пропаргілгліцином виявляло нефропротекторні властивості [94].

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які інтегровані в розвиток порушень метаболізму H_2S за гострого міоглобінуричного ураження та ХХН. Можна думати, що зростання вмісту H_2S та активності H_2S -синтезуючих ензимів за гострої нефропатії є компенсаторною реакцією у відповідь на гостре порушення фільтрації у нирках, адже H_2S викликає розслаблення гладеньких м'язів приносячої артеріоли та стимулює процеси фільтрації у нирках [14]. У той же час пригнічувальна дія ХХН на вміст H_2S та його синтез у нирках може бути пов'язана з кількома чинниками: 1) зменшенням експресії генів, відповідальних за синтез H_2S -синтезуючих ензимів [62]; 2) накопиченням активних кисневих дериватів (розділ 4), які можуть модифікувати активні центри редокс-залежного ферменту ЦБС, а також прискорювати окисну деградацію H_2S [196].

Враховуючи той факт, що за умов гострої нефропатії відмічалось зростання рівня H_2S у нирках, донатори H_2S не виявляли нефропротекторних властивостей, подальші дослідження були проведені лише на моделі ХХН (5/6

нефректомія). Нами показано, що порушення метаболізму H_2S у нирках, які виникали на тлі ХХН, тісно корелюють зі змінами функціональних параметрів нирок [197, 197]. З'ясувалось, що ХХН супроводжується падінням ШКФ (рівень креатиніну в плазмі був вищим на 51,2 %, а рівень креатиніну в сечі, ШКФ та діурез - меншим на 30,6-69,9 %, ніж у контролі, $p < 0,05$, див. табл. 3.3-3.4), порушенням екскреції з сечею електролітів (рівень іонів Na^+ та K^+ в крові був вищим на 37,9-110 %, а в сечі – меншим на 30,8-63,9 %, ніж в контролі, $p < 0,05$, див. табл. 3.5-3.6), розладами реабсорбції води, яка вірогідно зменшується порівняно з контролем (див. рис. 3.4), та тубулярною дисфункцією (вміст білка на 69,6 % перевищував показник псевдооперованих тварин, $p < 0,05$, див. рис. 3.5). Кореляційний аналіз дозволив встановити, що формування дефіциту H_2S на тлі ХХН асоціюється із зменшення ШКФ, тубулотоксичністю, порушенням реабсорбції води та елімінації Na^+ та K^+ з сечею. З метою встановлення ролі H_2S в патогенезі ХХН необхідно оцінити вплив модуляторів обміну H_2S на основні параметри функціонування нирок.

На 2 етапі (розділи 3.2-3.4) ми дослідили вплив донатору H_2S - $NaHS$ та інгібітору синтезу H_2S в реакції, яку каталізує ЦГЛ – пропаргілгліцину на функціональні, цитометричні та морфологічні параметри нирок щурів за ХХН. Показано, що застосування пропаргілгліцину за ХХН поглиблює дефіцит H_2S у нирках (рівень H_2S у нирках був на 23,9 % меншим, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), що асоціюється з достовірним зменшенням активності ЦГЛ (на 21,2 %, $p < 0,05$) та збільшенням швидкості окисної деградації H_2S (на 28,6 %, $p < 0,05$). Введення $NaHS$ спричиняло протилежні зміни: зростав вміст H_2S на 40,3 % ($p < 0,05$), що супряжено зі збільшенням активності ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ на 23,3-34 % ($p < 0,05$) та зниженням швидкості утилізації H_2S на 21 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин (див. табл. 3.7, рис. 3.6-3.7).

Модулювання обміну H_2S у нирках асоціюється зі змінами функціонального стану нирок за ХХН (див. табл. 3.8-3.11, рис. 3.8-3.10). Так, введення пропаргілгліцину поглиблює ініційовані ХХН порушення ШКФ (рівень креатиніну в плазмі був вищим на 23,1 %, а рівень креатиніну в сечі,

ШКФ та діурез - меншим на 14,3-44,4 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), елімінації електролітів (рівень іонів Na^+ та K^+ в крові був вищим на 15,7-173 %, а в сечі – меншим на 21,1-40,9 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), реабсорбції води (реабсорбція води вірогідно зменшувалась порівняно з такою у нелікованих щурів) та поглиблює тубулярну дисфункцію (вміст білка на 29,7 % перевищував показник нелікованих тварин, $p < 0,05$). У той же час, призначення натрій гідрогенсульфіду виявляє потужні нефропротекторні властивості за ХХН: покращує клубочкову фільтрація (рівень креатиніну в плазмі був нижчим на 24,2 %, а рівень креатиніну в сечі, ШКФ та діурез – вищим на 21,8-102 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), процеси реабсорбції води (вірогідно зростає порівняно з показником нелікованих щурів), електролітного обміну (рівень Na^+ та K^+ в крові був нижчим на 20,1-34,1 %, а в сечі – вищим на 21,7-99,3 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), стану тубулярного апарату (вміст білка був на 24,1 % меншим порівняно з нелікованими тваринами, $p < 0,05$). Проведені дослідження є вагомим доказом важливої ролі системи гідроген сульфід у регуляції функцій нирок в нормі та за умов ХХН [199]. Серед молекулярних механізмів впливу ендogenous H_2S та його донаторів на основні функції нирок можна виділити наступні:

- а) активація K_{ATP} -каналів гладеньких м'язів судин нирок супроводжується збільшенням ниркового кровотоку та ШКФ [200],
- б) інгібування котранспортера Na-K-2Cl у висхідній частині петлі Генле викликає зростання екскреції іонів Na^+ та K^+ з сечею [67];
- в) індукція експресії аквапорину AQP-2 стимулює реабсорбцію води в каналцях нефрона [201].

Далі нами досліджено вплив натрій гідрогенсульфіду на цитометричні параметри нирок за умов ХХН (див. табл. 3.12, рис. 3.11-3.13), адже саме донатор H_2S показав потужні нефропротекторні властивості (за функціональними показниками). Виявилось, що ХХН супроводжується збільшенням кількості клітин у фазі SUB-G0G1 (в 1,8 рази, $p < 0,05$) та зменшенням частки клітин у фазах S (в 4,8 рази, $p < 0,05$) та G2+M (на 16,2 %, $p < 0,05$).

$p < 0,05$), порівняно з псевдооперованими тваринами. Отримані результати засвідчують, що за ХХН реєструється індукція апоптозу, сповільнення процесів синтезу ДНК та зменшення кількості мітозів у клітинах кіркового шару нирок. У той же час застосування NaHS за ХХН нормалізувало кількість мітозів та активність синтезу ДНК (частка клітин у фазах $G2+M$ та S вірогідно не відрізнялась від псевдооперованих тварин), а також зменшувало інтенсивність апоптозу клітин кіркового шару нирок (кількість клітин у фазі SUB-G0G1 була на 34,8 % менша, ніж у нелікованих тварин). Антиапоптотична дія H_2S реалізується через різноманітні механізми: 1) сульфгідрування $\text{NF-}\kappa\text{B}$ викликає його транслокацію в ядро, що супроводжується зменшенням синтезу проапоптотичного білку Bax , збільшенням синтезу антиапоптотичного білку Bcl-2 та інгібіторних білків, які блокують апоптоз, опосередкований через рецептори TNFR 1 і Apo 3 [202, 202]; 2) сульфгідрування K^+_{ATP} -каналів веде до фосфорилування протеїнкінази C , яка активує Ca^{2+} - ATP -азу ендоплазматичного ретикулуму, що супроводжується зменшенням цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} та стабілізацією мітохондріальної пори [203].

Також нами оцінено вплив натрій гідрогенсульфіду на морфологію нирок за умов ХХН (див. рис. 3.14-3.20). З'ясувалось, що за хронічного ураження нирок реєструються порушення гістоструктури нирок: гіпо- та атрофія ниркових тілець, мезангіальна проліферація (є ознакою хронічної ендотоксемії), руйнування подоцитів (свідчить про порушення фільтраційного бар'єру), вогнища склерозування клубочків або всього ниркового тільця. В інтерстиції виявлено набряк, розширення лімфатичних судин, значні за розмірами ділянки склерозу, а також вогнищеву інфільтрацію лімфоцитами, моноцитами та макрофагами, що вказує про вогнищевий інтерстиційний лімфоцитарний нефрит. Відмічаються також зміни в судинах: стінки артеріол потовщені, частина просвітів звужена, в просвітах спостерігаються пристінкові тромби, ендотеліальний шар судинної стінки як артерій, так і вен місцями не суцільний з ділянками десквамації клітин, подекуди ендотеліоцити

випинаються в просвіт судин, гладкі міоцити в медії з ознаками зернистої дистрофії, що свідчить про розвиток ендотеліальної дисфункції та тромбозу. Використання NaHS за ХХН сприяло зменшенню запалення, дегенеративно-дистрофічних змін у нирках, фібропластичних процесів, гемодинамічних розладів та виявляло ендотеліо- та епітеліопротекторну дію. Антифібротична дія H_2S пов'язана з його здатністю збільшувати експресію TGF- β , що супроводжується активацією білків родини Smad, які пригнічують проліферацію фібробластів та їх трансформацію в міофібробласти [207, 208]. Протизапальні властивості H_2S асоціюються з його здатністю блокувати сигналінг, опосередкований NF- κ B (нуклеарним фактором каппа-B) та MAPK (мітогенактивованою протеїнкіназою), що супроводжується зменшенням синтезу прозапальних цитокінів TNF- α , IL-1 β та ін [14, 207, 208]. Ендотеліопротекторні ефекти H_2S супряжені з його антиоксидантними властивостями та здатністю впливати на продукцію нітроген монооксиду. Антиоксидантна дія цього газотрансміттера реалізується через вплив на активність транскрипційних факторів, таких як Nrf2, які активують близько 200 генів білків, залучених до антиоксидантного захисту [209]. Вплив H_2S на тонус судин та агрегацію тромбоцитів реалізується через стимуляцію K^+ _{ATФ}-каналів гладеньких м'язів судин та активацію ендотеліальної ізоформи NO-синтази й продукції NO [13, 210].

Таким чином, у ході проведених досліджень нами отримані переконливі докази того, що за умов ХХН донатор H_2S – NaHS виявляє потужні нефропротекторні властивості, які асоціюються з посиленням клубочкової фільтрації, покращенням процесів реабсорбції води та електролітів, антиоксидантною, антиапоптозною, протизапальною, антифіброгенною та ендотеліопротекторною діями.

За даними літератури потужні нефропротекторні властивості виявляють природні поліфенольні сполуки, а саме флавоноїд кверцетин, ізофлавоноїд геністеїн та стильбеноїд ресвератрол. Здатність покращувати функціональний стан нирок за гострого та хронічного ураження супряжено з їх

протизапальними, антиоксидантними, антиапоптозичними властивостями, здатністю покращувати кровопостачання нирок, посилювати діурез, клубочкову фільтрацію [146, 158, 159, 187, 211-214]. В той же час дуже обмеженою є інформація щодо впливу природних поліфенольних сполук на стан системи гідроген сульфїду в організмі щурів. Показано, що фітоестроген геністеїн збільшує продукцію H_2S у слизовій оболонці шлунка тварин за диклофенак-індукованої гастротоксичності [214]. Застосування геністеїну збільшує вміст H_2S в серцево-судинній системі, зменшує швидкість утилізації H_2S та збільшує активність H_2S -продукуючих ензимів в міокарді та аорті за умов гіпергомоцистеїнемії. За цих умов введення кверцетину також супроводжувалось збільшенням вмісту H_2S та зменшенням швидкості його утилізації в серцево-судинній системі, але не впливало на активність H_2S -продукуючих ензимів [190]. На моделі пірогалол-індукованого оксидативного стресу у мишей показано, що застосування ресвератролу зменшує пригнічувальний вплив активних кисневих дериватів на вміст H_2S в аорті [191].

Тому **на 3 етапі** дослідження ми оцінили вплив природних рослинних сполук кверцетину, геністеїну та ресвератролу на метаболізм гідроген сульфїду у нирках та його зв'язок з показниками функціонування нирок у тварин з експериментальною ХХН (розділи 4.1-4.5). Виявилось, що обрані поліфенольні сполуки зменшували дефіцит H_2S у нирках щурів за ХХН (рис. 4.2). За цих умов найбільш виразний вплив на рівень H_2S виявляв саме геністеїн: вміст H_2S у нирках перевищував на 30,8 % ($p < 0,05$) такий показник в групі нелікованих тварин з ХХН. Порівняно з геністеїном, поліфенол ресвератрол виявляв менш виразний вплив на вміст H_2S у нирках щурів за ХХН. В групі тварин «ХХН + Ресвератрол» рівень H_2S у нирках був вищим на 22,9 % ($p < 0,05$), відносно групи тварин з ХХН, які не отримували поліфеноли. Найменшу здатність відновлювати запаси ендогенного H_2S у нирках за ХХН виявляв кверцетин. У групі тварин «ХХН + Кверцетин» рівень H_2S у нирках

був вищим на 16,4 % ($p < 0,05$), відносно групи тварин з ХХН, які не отримували поліфеноли [215, 216].

Вплив поліфенолів на рівень H_2S у нирках асоціювався зі змінами активності ензиматичного утворення та швидкості окисної деградації. Застосовані поліфеноли збільшували активність H_2S -синтезуючих ферментів у нирках щурів за ХХН, причому цей ефект залежав від обраного поліфенолу (див. табл. 4.1). Так, застосування геністеїну за ХХН виявляло найбільш потужний вплив на синтез H_2S у нирках. За цих умов активність ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ у нирках перевищувала відповідно на 18,7; 18,0 та 22,5 % ($p < 0,05$) такі показники в групі нелікованих тварин. Введення ресвератролу виявляло менш виразний вплив на активність H_2S -продукуючих ензимів у нирках щурів за ХХН, порівняно з геністеїном. За цих умов активність ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ у нирках перевищувала відповідно на 12,7; 13,9 та 15,6 % ($p < 0,05$) такі показники в групі тварин з ХХН, які не отримували поліфенольних коректорів. Кверцетин виявляв найменш потужний вплив на процеси ензиматичного утворення H_2S у нирках щурів за ХХН: застосування цього поліфенолу супроводжувалось достовірним зростанням активності ЦБС у нирках на 21,6 % ($p < 0,05$), тоді як активність продукції H_2S в реакціях, каталізованих ЦГЛ та ЦАТ, статистично достовірно не відрізнялась від таких показників у групі тварин з ХХН, які не отримували поліфенольних коректорів.

Досліджувані поліфеноли зменшували індуковане ХХН прискорення неензиматичної деградації H_2S у нирках щурів (див. рис. 4.1). Показано, що призначення тваринам з ХХН геністеїну виявляло найменш потужний вплив на процеси утилізації H_2S у нирках щурів: середній показник швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках був на 18,9 % меншим ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН», однак залишався достовірно вищим, ніж в контролі. За здатністю сповільнювати окисну деградацію H_2S у нирках щурів ресвератрол дещо поступався геністеїну: швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках була на 17,6 % меншою ($p < 0,05$), порівняно з групою «ХХН». У той же час кверцетин виявляв найбільший вплив на процеси утилізації H_2S у

нирках виявляв кверцетин. У групі тварин «ХХН + Кверцетин» середній показник швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках був на 20,5 % меншим ($p < 0,05$) порівняно з групою «ХХН» [215, 218].

Також досліджено вплив поліфенолів на стан системи гідроген сульфід у нирках умовно здорових щурів [171]. В інтактних тварин ці сполуки викликали збільшення ензиматичної продукції H_2S у нирках (див. табл. 4.2). Серед досліджуваних поліфенолів лише геністеїн та ресвератрол сприяли посиленню синтезу H_2S за участі ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ. Так, у групі тварин, які отримували геністеїн та ресвератрол, активність ЦГЛ у нирках перевищувала показники інтактних тварин відповідно на 15,1 та 11,7 % ($p < 0,05$), активність ЦБС – на 14,4 та 13,1, активність ЦАТ – на 17,7 та 13,3 %, порівняно з умовно здоровими щурами. В той же час у тварин, лікованих кверцетином, достовірних відмінностей активності ЦГЛ та ЦАТ не зареєстровано, а активність ЦБС на 17,5 % ($p < 0,05$) перевищувала показник інтактних тварин. Проведені дослідження засвідчили, що спрямованість впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на метаболізм H_2S у нирках інтактних щурів співпадала з такою за ХХН.

Виникає питання щодо механізмів впливу досліджуваних поліфенольних коректорів на стан системи H_2S у нирках. З літератури відомо, що важливу роль в регуляції вмісту H_2S відіграють рівень активних форм кисню та нітрогену, активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази, а також стан тіол-дисульфідного обміну [13, 196]. Швидкість утилізації гідроген сульфід збільшується за умов оксидативного та нітрозативного стресу, адже реакційноздатні кисневі та нітрогенвмісні інтермедіати викликають його окиснення з утворенням сульфідів та сульфатів [221-224]. Активні форми кисню та нітрогену також впливають на продукцію H_2S в реакції, каталізованій ЦБС, який є редокс-чутливим ензимом, і його активність залежить від співвідношення тіольних та дисульфідних груп в активному центрі. Тому, всі чинники, які спричиняють окиснення тіольних груп з утворенням дисульфідів, зокрема, активні форми кисню та нітрогену, спричиняють зменшення

активності ЦБС [196]. Враховуючи той факт, що досліджувані поліфеноли мають потужні антиоксидантні властивості [153, 159, 225], можна думати, що цей механізм є одним із важливих чинників їх впливу на метаболізм H_2S у нирках. Також показано, що геністеїн, ресвератрол і, особливо, кверцетин виявляли антиоксидантну активність за ХХН, що виявлялось зменшенням вмісту МДА, КГП та активності НАДФН-оксидази (на 21,0-40,4 %, $p < 0,05$), а також збільшенням активності СОД (на 29,7-38,7 %, $p < 0,05$) у нирках порівняно з показниками нелікованих тварин (див. рис. 4.7-4.10). За результатами кореляційного аналізу встановлено, що в групі лікованих тварин між вмістом H_2S та показниками оксидативного стресу виникали достовірні сильні або значущі зв'язки ($r=|0,65-0,74|$; $p < 0,05$).

Останнім часом показано, що важливу роль в регуляції утворення H_2S у процесі гідролітичного розщеплення цистеїну за участі ЦГЛ відіграє активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази. Показано агоністичні відношення між активностями цих двох ензимів: нітроген монооксид (NO), який утворюється в процесі функціонування ендотеліальної NO-синтази, є активатором продукції H_2S в реакції, каталізованій ЦГЛ. Крім того NO стимулює експресію ЦГЛ в ендотеліальних клітинах [219]. Ймовірно, вплив на систему NO у нирках є ще одним біохімічним механізмом через який реалізується стимулювальна дія поліфенолів на стан системи H_2S . Нами встановлено, що використання ресвератролу та особливо геністеїну супроводжувалось зростанням у нирках активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази (на 36,3-44,7 %, $p < 0,05$) та зменшенням активності її індукційної ізоформи (на 15,4-20,9 %, $p < 0,05$), відносно нелікованих тварин (див. табл. 4.7). Кореляційний аналіз показав, що в групі тварин, лікованих геністеїном та ресвератролом, між вмістом H_2S та активністю різних ізоформ NO-синтази реєструвались достовірні сильні зв'язки ($r=|0,70-0,75|$; $p < 0,05$). [220].

Не виключено, що вплив досліджуваних природних поліфенолів на метаболізм H_2S у нирках реалізується на генетичному рівні через індукцію

експресії генів H_2S -синтезуючих ферментів. Показано, що ресвератрол стимулює експресію ЦГЛ в різних тканинах за умов експериментального цукрового діабету [226]. На тлі застосування кверцетину реєструвалось вірогідне зростання експресії ЦГЛ та ЦБС в печінці тварин, які отримували дієту збагачену метіоніном [227]. Даних щодо впливу геністеїну на експресію H_2S -синтезуючих ферментів немає.

Далі ми оцінили вплив геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники функціонального стану нирок та їх зв'язок з вмістом H_2S у нирках за ХХН (розділ 4.2). Застосовані поліфенольні сполуки виявляли здатність покращувати основні функції нирок, хоча ефекти залежали від обраної сполуки. Найбільш потужні нефропротекторні властивості виявляв геністеїн (див. табл. 4.3-4.6, рис. 4.4-4.6). За ХХН використання геністеїну покращувало клцбчкову фільтрацію (рівень креатиніну в плазмі був нижчим на 24,8 %, а ШКФ та діурез - вищими відповідно на 102 та 23,1 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), процеси реабсорбції води, яка вірогідно зростала порівняно з показником нелікованих щурів), електролітного обміну (рівень іонів Na^+ та K^+ в крові був нижчим на 17,9-30,3 %, а в сечі – вищим на 17,5-84,1 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), стану тубулярного апарату (вміст білка був на 22,8 % меншим порівняно з нелікованими тваринами, $p < 0,05$). Ресвератрол та кверцетин поступались геністеїну за нефропротекторними властивостями. Так, наприклад, у тварин групи «ХХН + Ресвератрол» діурез був більшим на 19,1 % ($p < 0,05$), а ШКФ – більшою на 72,1 % ($p < 0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. За умов введення кверцетину відмічалось зростання діурезу та ШКФ відповідно на 14,2 та 49,8 % ($p < 0,05$) [215, 228]. Отримані нами результати підтверджуються чисельними дані літератури щодо нефропротекторної активності досліджуваних поліфенольних сполук [146, 153, 187, 211]. Поряд з цим в наших дослідженнях розкриті нові механізми їх захисного впливу на нирки. Так, за результатами кореляційного аналізу нами отримані вагомі докази ролі H_2S у нефропротекторному потенціалі геністеїну.

Показано, що між вмістом H_2S у нирках та маркерами функціонального стану нирок виникали достовірні тісні зв'язки ($r=|0,52-0,72|$; $p < 0,05$).

За результатами досліджень показано, що саме ізофлавоноїд геністеїн виявляв найбільш потужний захисний потенціал щодо нирок на тлі ХХН. Тому далі нами досліджено вплив геністеїну на показники клітинного циклу (див. табл. 4.8; рис. 4.11-4.13) та морфологічний стан (див. рис. 4.14-4.15) нирок за ХХН [229]. Показано, що застосування геністеїну за ХХН нормалізувало кількість мітозів та активність синтезу ДНК (частка клітин у фазах G_2+M та S вірогідно не відрізнялась від псевдооперованих тварин), а також зменшувало інтенсивність апоптозу клітин кіркового шару нирок (кількість клітин у фазі $SUB-G_0G_1$ була на 16,6 % менша, ніж у нелікованих тварин). Кореляційний аналіз показав, що на тлі лікування між вмістом H_2S у нирках та кількістю клітин в фазі $SUB-G_0G_1$ виникають достовірні обернені зв'язки ($r=-0,81$; $p < 0,05$), тоді як з кількістю клітин у фазі S – прямі кореляції ($r=0,78$; $p < 0,05$). Вплив геністеїну на клітинний цикл асоціюється з його здатністю поповнювати запаси H_2S у нирках, про що свідчать результати кореляційного аналізу. Так, на тлі лікування між вмістом H_2S у нирках та кількістю клітин в фазі $SUB-G_0G_1$ виникають достовірні обернені зв'язки ($r=-0,81$; $p < 0,05$), тоді як з кількістю клітин у фазі S – прямі кореляції ($r=0,78$; $p < 0,05$). Додаткові докази нефропротекторної дії геністеїну отримані в ході морфологічних досліджень. Показано, що введення цієї сполуки стримувало розвиток структурних і дегенеративно-дистрофічних змін у нирках та сприяло активації компенсаторно-приспосувальних і регенеративних процесів, викликало нормалізацію гемодинаміки. Досить цікавими виявились дані щодо змін масових коефіцієнтів кульші нирок у нелікованих тварин та за умов корекції ХХН натрій гідроген сульфідом та геністеїном. Виявилось, що хірургічна модель ниркової патології супроводжувалась зменшенням масового коефіцієнта лише на 23,9%, очевидно, за рахунок гіпертрофії нефронів та розростання сполучної тканини. Натомість за умов корекції її донором гідроген сульфідом та геністеїном нами не було виявлено суттєвих змін цього

показника, хоча і морфологічні і біохімічні параметри значно покращувались. Це, на нашу думку, є наслідком того, що за умов корекції суттєво покращилось кровопостачання нирок, їх кровонаповнення, а відтак – і масові коефіцієнти органа не зазнали суттєвих змін. За величиною нефропротекторної дії геністеїн практично не поступався натрій гідрогенсульфіду.

За результатами власних досліджень та даними літератури нами запропоновано схему, на якій продемонстровано механізми нефропротекторної дії рослинних поліфенолів (рис. 5.1)

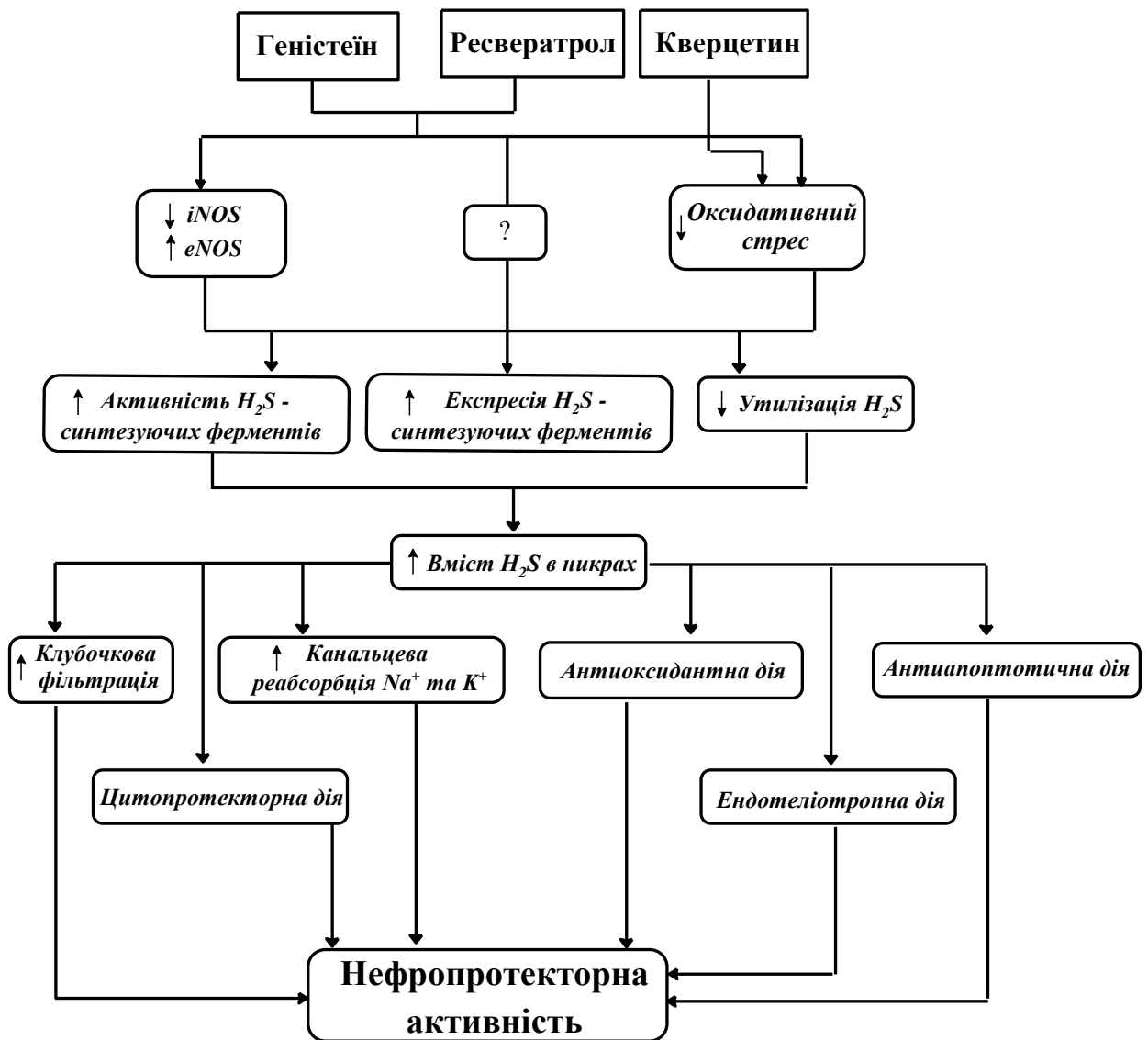


Рис. 5.1 Роль системи гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дії поліфенольних сполук

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено нове розв'язання актуального завдання фармакології, що полягає в експериментальному обґрунтуванні нових підходів до фармакотерапії хронічної хвороби нирок шляхом встановлення ролі порушень обміну гідроген сульфїду в патогенезі хронічної хвороби нирок та можливості їх корекції препаратами рослинних поліфенольних сполук.

1. Експериментальна хронічна хвороба нирок у щурів супроводжується порушенням метаболізму гідроген сульфїду у нирках, на що вказує зменшення активності H_2S -продукуючих ферментів на 28,3-34,2 % ($p < 0,05$), зростання швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках на 34,3 % ($p < 0,05$) та зниження вмісту H_2S на 35,8 % ($p < 0,05$), відносно контролю. За умов хронічної хвороби нирок відмічається зростання (на 30-70 %, $p < 0,05$) концентрації креатиніну, іонів Na^+ та K^+ в крові, елімінації білка з сечею, а також зменшення (в 1,4-2,1 рази, $p < 0,05$) діурезу, швидкості клубочкової фільтрації, екскреції Na^+ та K^+ з сечею порівняно з контролем. Вказані гломеруло-тубулярні порушення за хронічної хвороби нирок тісно корелюють з вмістом H_2S у нирках ($r=|0,54-0,85|$, $p < 0,05$).

2. Модулювання обміну H_2S асоціюється зі змінами функціонального стану нирок за моделі їх хронічної хвороби. Так, введення пропаргілгліцину поглиблює порушення клубочкової фільтрації (рівень креатиніну в плазмі був вищим на 23,1 %, а рівень креатиніну в сечі, швидкість клубочкової фільтрації та діурез - меншим на 14,3-44,4 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), елімінації електролітів (рівень Na^+ та K^+ в крові був вищим на 15,7-173 %, а в сечі – меншим на 21,1-40,9 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), реабсорбції води, яка була вірогідно меншою порівняно з показником нелікованих щурів, та поглиблює тубулярну дисфункцію (вміст білка на 29,7 % перевищував показник нелікованих тварин, $p < 0,05$). Введення натрію гідрогенсульфїду виявляє потужні нефропротекторні властивості за хронічної хвороби нирок:

покращує клубочкову фільтрацію (рівень креатиніну в плазмі був нижчим на 24,2 %, а рівень креатиніну в сечі, ШКФ та діурез - вищим на 21,8-102 %, ніж у нелікованих тварин, $p < 0,05$), процеси реабсорбції води, електролітного обміну (рівень Na^+ та K^+ в крові тварин, $p < 0,05$), стану тубулярного апарату (вміст білка був на 24,1 % меншим порівняно з нелікованими тваринами, $p < 0,05$).

3. Рослинні поліфеноли за експериментальної хронічної хвороби нирок виявляють нефропротекторні властивості (наприклад, ШКФ достовірно зростає на 49,8-102 %, протеїнурія вірогідно зменшується на 12,4-22,8 %, $p < 0,05$), що супряжено з активацією H_2S -продукуючих ферментів (на 12,7-22,5 %, $p < 0,05$), зменшенням швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках (на 17,6-20,5 %, $p < 0,05$) та зростанням вмісту H_2S (на 16,4-30,8 %, $p < 0,05$). Серед поліфенолів геністеїн мав найбільш виразний коригувальний вплив на функціональні параметри нирок та стан системи.

4. Досліджувані поліфенольні сполуки, особливо кверцетин виявляють антиоксидантну активність за хронічної хвороби нирок, що виявляється зменшенням вмісту МДА, КГП та активності НАДФН-оксидази (на 21,0-40,4 %, $p < 0,05$), а також збільшенням активності СОД (на 29,7-38,7 %, $p < 0,05$) у нирках порівняно з нелікованими тваринами. В групі лікованих тварин між вмістом H_2S та показниками оксидативного стресу виникали достовірні сильні або значущі зв'язки ($r=|0,65-0,74|$; $p < 0,05$). Використання ресвератролу та особливо геністеїну супроводжується зростанням у нирках активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази (на 36,3-44,7 %, $p < 0,05$) та зменшенням активності її індукцйбельної ізоформи (на 15,4-20,9 %, $p < 0,05$) відносно показників нелікованих тварин. Система NO у нирках є важливою молекулярною мішенню, через яку реалізується вплив геністеїну та ресвератролу на продукцію H_2S за хронічної хвороби нирок: у групі тварин, лікованих геністеїном та ресвератролом, між вмістом H_2S та активністю різних ізоформ NO-синтази реєструвались достовірні сильні зв'язки ($r=|0,70-0,75|$; $p < 0,05$).

5. Застосування донатору H_2S – натрію гідрогенсульфіду та геністеїну за експериментальної хронічної хвороби нирок сприяє зменшенню дегенеративно-дистрофічних змін у нирках, фібропластичних процесів, гемодинамічних розладів та виявляє ендотеліо- та епітеліопротекторну дію, а також зменшує процеси апоптозу і нормалізує показники клітинного циклу в клітинах кіркового шару нирок. Нефропротекторна дія ізофлавону асоціюється із його здатністю поповнювати запаси H_2S у нирках (між вмістом H_2S у нирках та кількістю клітин в фазі SUB-G0G1 виникають достовірні обернені зв'язки ($r=-0,81$; $p < 0,05$), тоді як з кількістю клітин у фазі S – прямі кореляції ($r=0,78$; $p < 0,05$)). За величиною нефропротекторної дії геністеїн практично не поступається натрію гідрогенсульфіду.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Global Facts About Kidney Disease. National Kidney Foundation; Oct 22, 2017. Retrieved from <https://www.kidney.org/kidneydisease/global-facts-about-kidney-disease>, 2015.
2. Chevalier, R. L. (2019). Evolution, kidney development, and chronic kidney disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 91, 119-131.
3. Dienemann, T., Fujii, N., Orlandi, P., Nessel, L., Furth, S. L., Hoy, W. E. ... Feldman, H. I. (2016). International network of chronic kidney disease cohort studies (iNET-CKD): A global network of chronic kidney disease cohorts. *BMC Nephrol.*, 7(1), 121.
4. Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V. ... Memish, Z. A. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2095-2128.
5. Пиріг, Л. А., Іванов, Д. Д., & Таран, О. І. (2014). *Нефрологія: Національний підручник*. Донецьк: Видавець Заславський О.Ю.
6. Державний експертний центр МОЗ України (2016). *Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах «Надання медичної допомоги хворим на хронічну хворобу нирок V стадії, які лікуються гемодіалізом*. Київ. Взято з http://www.dec.gov.ua/mtd/_per_dializ_dor.html
7. Пентюк, О. О., Волощук, Н. І. & Машевська, О. В. (2009). Нефротоксичність лікарських засобів: клінічні прояви, патофізіологічні механізми та підходи до лікування. *Рациональная фармакотерапия*, 1(10), 21-28.
8. Sabolić, I. Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals. (2006). *Nephron. Physiol.*, 104(3), 107-114.
9. Han, S. Y., Chang, E. J., Choi, H. J., Kwak, C. S., Park, S. B., Kim, H. C., & Mun, K. C. (2006). Apoptosis by cyclosporine in mesangial cells. *Transplant. Proc.*, 38(7), 2244-2246.

10. Liu, B. C., Tang, T. T., Lv, L. L., & Lan, H. Y. (2018). Renal tubule injury: A driving force toward chronic kidney disease. *Kidney International*, 93, 568-579.
11. Li, L., Tang, W., & Yi, F. (2019). Role of Inflammasome in Chronic Kidney Disease. Liu, B.-C., Lan, H.-Y., & Lv, L.-L. (Eds.) *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*. (407-421). Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-13-8871-2_19.
12. Guzzi, F., Cirillo, L., Roperto, R. M., Romagnani, P., & Lazzeri, E. (2019). Molecular mechanisms of the acute kidney injury to chronic kidney disease transition: An updated view. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4941.
13. Zaichko, N. V., Melnik, A. V., Yoltukhivskyy, M. M., Olhovskiy, A. S., & Palamarchuk, I. V. (2014). Hydrogen sulfide: Metabolism, biological and medical role. *Ukr. Biochem. J.*, 86(5), 5-25.
14. Feliers, D., Lee, H. J., & Kasinath, B. S. (2016). Hydrogen sulfide in renal physiology and disease. *Antioxid. Redox Signal*. 25(13), 720-731.
15. Xu, C., & Jin-Song, B. (2016). The role of hydrogen sulfide in renal system. *Front. Pharmacol.*, 7, 385-392.
16. Штриголь, С. Ю. (2010). Біологічно активні речовини та препарати рослинного походження з нефропротекторною активністю. *Фармаком.*, 1, 140-155.
17. Безпалько, Л. В., Шаламай, А. С., Зупанець, І. А., Мойбенко, О. О., Пархоменко, О. О., Маслова, Н. Ф. ... Сова, Є. О. (2011). Пат. України 93707. Київ: Державне патентне відомство України.
18. Abdel-Raheem, I. T., Abdel-Ghany, A. A., & Mohamed, G. A. (2009). Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 32(1), 61-67.
19. Yuan, D. (2018). Protective effect of resveratrol on kidney in rats with diabetic nephropathy and its effect on endoplasmic reticulum stress. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22(5), 1485-1493.

20. Palanisamy, N., & Venkataraman, C. (2013). Beneficial effect of genistein on lowering blood pressure and kidney toxicity in fructose-fed hypertensive rats. *A. Br. J. Nutr.*, 109(10), 1806-1812
21. Шилов, Е. М. (Ред.). (2012). *Хроническая болезнь почек и нефропротективная терапия: Методическое руководство для врачей*. Москва.
22. Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease (2013). *Kidney International Supplements*, 3 (1), 3-163.
23. Vallianou, N. G., Mitesh, S., Gkogkou, A., & Geladari, E. (2019). Chronic kidney disease and cardiovascular disease: Is there any relationship? *Curr. Cardiol. Rev.*, 15(1), 55-63.
24. Пентюк, А. А., Пентюк, Н. А., Хаврель, А. И., & Заичко, Н. В. (2002). Нефротоксичность нестероидных противовоспалительных препаратов: Современное состояние проблемы. *Соврем. проблемы токсикологии*, 3, 65-71.
25. Steenkamp, V., & Stewart, M. J. (2005). Nephrotoxicity associated with exposure to plant toxins, with particular reference to Africa. *Ther. Drug Monit.*, 3, P.270-277.
26. Briguori, C., & Marenzi, G. (2006). Contrast-induced nephropathy: Pharmacological prophylaxis. *Kidney Int. Suppl.*, 100, 30-38.
27. Perazella, M. A. (2019). Drug-induced acute kidney injury: Diverse mechanisms of tubular injury. *Curr. Opin. Crit. Care.*, 25(6), 550-557.
28. Гоженко, А. И. (2013). *Патофизиология почек. От эксперимента к клинике*. Одесса: ООО «АРТ-В».
29. Barnett, L. M. A., & Cummings, B. S. (2018). Nephrotoxicity and renal pathophysiology: a contemporary perspective. *Toxicol. Sci.*, 164(2), 379-390.
30. Barnett, L. M. A., & Cummings, B. S. (2019). Cellular and molecular mechanisms of kidney toxicity. *Semin. Nephrol.*, 39(2), 141-151.
31. Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.*, 57(3-4), 145-155.

32. Zhang, L., & Hanigan, M. H. (2003). Role of cysteine S-conjugate beta-lyase in the metabolism of cisplatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306(3), 988-994.
33. Haeussler, U., Riedel, M., & Keller, F. (2004). Free reactive oxygen species and nephrotoxicity of contrast agents. *Kidney Blood Press. Res.*, 27(3), 167-171.
34. Kawai, Y., Nakao, T., Kunimura, N., Kohda, Y., & Gemba, M. (2006). Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J. Pharmacol. Sci.*, 100(1), 65-72.
35. Jeong, B. Y., Lee, H. Y., Park, C. G., Kang, J., Yu, S. L., Choi, D. R. ... Yoon, S. H. (2018). Oxidative stress caused by activation of NADPH oxidase 4 promotes contrast-induced acute kidney injury. *PLoS One*, 13(1). Retrieved from <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0191034>.
36. González, R., Romay, C., Borrego, A., Hernández, F., Merino, N., Zamora, Z., & Rojas, E. (2005). Lipid peroxides and antioxidant enzymes in cisplatin-induced chronic nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm.*, 3, 139-143.
37. Aleksa, K., Matsell, D., Krausz, K., Gelboin, H., Ito, S., & Koren, G. (2005). Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: Implications for ifosfamide nephrotoxicity. *Pediatr. Nephrol.*, 20(7), 872-885.
38. Lee, H. C., Yen, H. W., & Sheu, S. H. (2006). Effects of different contrast media on glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in the heart and kidneys of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Formos. Med. Assoc.*, 105(7), 530-535.
39. Гоженко, А. І., Роговий, Ю. Є., & Федорук, О. С. (2001). “Приховане” ушкодження проксимального відділу нефрону. *Одес. мед. журн.*, 5, 16-19.
40. Пішак, В. П., Білокий, В. В., & Роговий, Ю. Є. (2005). Універсальність ушкодження проксимального відділу канальця при захворюваннях нирок. *Бук. мед. вісник*, 1, 72-76.
41. Nagai, J., Taogoshi, T., Tokunaga, A., Nishikawa, H., Murakami, T., & Takano, M. (2006). Characterization of prostaglandin E1 transport in rat renal brush-border membrane. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21(3), 186-193.

42. Hucke, A., & Ciarimboli, G. (2016). The Role of transporters in the toxicity of chemotherapeutic drugs: Focus on transporters for organic cations. *J. Clin. Pharmacol.*, 56(7), 157-172.
43. Price, P. M., & Hodeify, R. A. (2012). Possible mechanism of renal cell death after ischemia/reperfusion. *Kidney Int.*, 81(8), 720-721.
44. Simon, N., Morin, C., Urien, S., Tillement, J. P., & Bruguerolle, B. (2003). Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria. *Br. J. Pharmacol.*, 138(2), 369-376.
45. Kohda, Y., & Gemba, M. (2005). Cephaloridine induces translocation of protein kinase C delta into mitochondria and enhances mitochondrial generation of free radicals in the kidney cortex of rats causing renal dysfunction. *J. Pharmacol. Sci.*, 98(1), 49-57.
46. Van de Water, B., de Graauw, M., Le Dévédec, S., & Alderliesten, M. (2006). Cellular stress responses and molecular mechanisms of nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.*, 162(1), 83-93.
47. Ромаданова, О. І. (2010). Індикатори стану клітинних механізмів прогресування хронічної хвороби нирок у пацієнтів з гіпертонічною хворобою. *Вісник проблем біології і медицини*, 4, 141-147.
48. Vaidya, V. S., Bobadila, N. A., & Bonventre, J. V. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: A sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2, 517-529.
49. Li, W. X., Chen, H. D., Wnag, X. W., Zhao, S., Chen, X., Zheng, Y., & Song, Y. (2009). Predictive value of RIFLE classification on prognosis of critically ill patients with acute kidney injury treated with continuous renal replacement therapy. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 122(9), 1020-1025.
50. Гоженко, А. І., Ковалевська, Л. А., & Телятников, О. В. (2015). У пошуках універсального біомаркери гострого ушкодження нирок при гострому коронарному синдромі (огляд літератури). *Актуальные проблемы транспортной медицины*, 4(42-41), 33-44.

51. Zhang, Z.-H., Chen, H., Vaziri, N. D., Mao, J.-R., Zhang, L., Bai, X., & Zhao, Y.-Y. (2016). Metabolomic signatures of chronic kidney disease of diverse etiologies in the rats and humans. *Journal of Proteome Research*, 15(10), 3802-3812.
52. Abe, K., & Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.*, 16, 1066-1071.
53. Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.*, 16, 1792-1798.
54. Lowicka, E., & Beltowski, J. (2007). Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*, 59, 4-24.
55. Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide: Its production, release and functions. *Amino Acids*, 41, 113-121.
56. Xu, C., & Jin-Song, B. (2016). The Role of Hydrogen Sulfide in Renal System. *Front. Pharmacol.*, 7, 385.
57. Мельник, А. В., Пентюк, О. О. (2009). Активність ензимів синтезу гідрогенсульфіду у нирках щурів. *Укр. біохім. журнал*, 81(4), 12-22.
58. Liu, Y. H., Lu, M., Hu, L. F., Wong, P. T., Webb, G. D., & Bian, J. S. (2012). Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxid. Redox. Signal.*, 17, 141-185.
59. Szabo, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6, 917-935.
60. Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara Y. ... Kimura, H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat. Commun.*, 4, 1366.
61. Tripatara, P., Patel, N. S., Brancalone, V., Renshaw, D., Rocha, J., Sepodes, B. ... Thiemermann, C. (2009). Characterisation of cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulphide pathway in ischaemia/reperfusion injury of the mouse kidney: an in vivo study. *Eur. J. Pharmacol.*, 606(1-3), 205-209.

62. Aminzadeh, M. A., & Vaziri, N. D. (2012). Downregulation of the renal and hepatic hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzymes and capacity in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 27(2), 498-504.

63. Bos, E. M., Wang, R., Snijder, P. M., Boersema, M., Damman, J., Fu, M. ... Goor, H. (2013). Cystathionine gamma-lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24(5), 759-770.

64. Yamamoto, J., Sato, W., Kosugi, T., Yamamoto, T., Kimura, T., Taniguchi, S. ... Niki, I. (2013). Distribution of hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzymes and the roles of the H₂S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy. *Clin. Exp. Nephrol.*, 17, 32-40.

65. Lee, H. J., Mariappan, M. M., Feliars, D., Cavaglieri, R. C., Sataranatarajan, K., Abboud, H. E. ... Kasinath, B. S. (2012). Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced matrix protein synthesis by activating AMP-activated protein kinase in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 287(7), 4451-4461.

66. Xia, M., Chen, L., Muh, R. W., Li, P. L., & Li, N. (2009). Production and actions of hydrogen sulfide, a novel gaseous bioactive substance, in the kidneys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329(3), 1056-1062.

67. Ge, S. N., Zhao, M. M., Wu, D. D., Chen, Y., Wang, Y., Zhu, J. H, ... Zhu, Y. C. (2014). Hydrogen sulfide targets EGFR Cys797/Cys798 residues to induce Na⁺/K⁺-ATPase endocytosis and inhibition in renal tubular epithelial cells and increase sodium excretion in chronic salt-loaded rats. *Antioxid. Redox. Signal.*, 21(15), 2061-2082.

68. Roy, A., Khan, A. H., Islam, M. T., Prieto, M. C., & Majid, D. S. (2012). Interdependency of cystathione γ -lyase and cystathione β -synthase in hydrogen sulfide-induced blood pressure regulation in rats. *Am. J. Hypertens.*, 25(1), 74-81.

69. Liu, Y. H., & Bian, J. S. (2010). Bicarbonate-dependent effect of hydrogen sulfide on vascular contractility in rat aortic rings. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 299(4), 866-872.

70. Lee, S. W., Cheng, Y., Moore, P. K., & Bian, J. S. (2007). Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358(4), 1142-1147.
71. Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O., & Kurtz, A. (2007). Renin release. *Physiology (Bethesda)*, 22, 310-319.
72. Lim, J. J., Liu, Y. H., Khin, E. S., & Bian, J. S. (2008). Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 295(5), 1261-1270.
73. Lu, M., Liu, Y. H., Goh, H. S., Wang, J. J., Yong, Q. C., Wang, R., & Bian, J. S. (2010). Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21(6), 993-1002.
74. Lu, M., Liu, Y. H., Ho, C. Y., Tiong, C. X., & Bian, J. S. (2012). Hydrogen sulfide regulates cAMP homeostasis and renin degranulation in As4.1 and rat renin-rich kidney cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 302(1), 59-66.
75. Xue, H., Yuan, P., Ni, J., Li, C., Shao, D., Liu, J. ... Limin, L. (2013). H₂S inhibits hyperglycemia-induced intrarenal renin-angiotensin system activation via attenuation of reactive oxygen species generation. *PLoS One.*, 8(9). Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074366>.
76. Olson, K. R. (2015). Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Antioxid. Redox. Signal.*, 22(5), 377-397.
77. Koning, A. M., Frenay, A. R., Leuvenink, H. G., & van Goor, H. (2015). Hydrogen sulfide in renal physiology, disease and transplantation - the smell of renal protection. *Nitric Oxide*, 46, 37-49.
78. Teng, H., Wu, B., Zhao, K., Yang, G., Wu, L., & Wang, R. (2013). Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(31), 12679-12684.
79. Beltowski, J. (2010). Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334(2), 358-363.

80. Hu, H., Shi, Y., Chen, Q., Yang, W., Zhou, H., Chen, L. ... Zheng, Y. (2008). Endogenous hydrogen sulfide is involved in regulation of respiration in medullary slice of neonatal rats. *Neuroscience*, 156(4), 1074-1082.

81. Dombkowski, R. A., Naylor, M. G., Shoemaker, E., Smith, M., DeLeon, E. R., Stoy, G. F. ... Olson, K. R. (2011). Hydrogen sulfide (H₂S) and hypoxia inhibit salmonid gastrointestinal motility: Evidence for H₂S as an oxygen sensor. *J. Exp. Biol.*, 214, 4030-4040.

82. Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. *Nat. Med.*, 17, 1391-1401.

83. Xu, Z., Prathapasinghe, G., Wu, N., Hwang, S. Y., Siow, Y. L., & Oh, K. (2009). Ischemia-reperfusion reduces cystathionine-beta-synthase-mediated hydrogen sulfide generation in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 297, 27-35.

84. Han, S. J., Kim, J. I., Park, J. W., & Park, K. M. (2015). Hydrogen sulfide accelerates the recovery of kidney tubules after renal ischemia/reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 30, 1497-1506.

85. Ahmad, A., Olah, G., Szczesny, B., Wood, M. E., Whiteman, M., & Szabo, C. (2016). AP39, a mitochondrially targeted hydrogen sulfide donor, exerts protective effects in renal epithelial cells subjected to oxidative stress in vitro and in acute renal injury in vivo. *Shock*, 45, 88-97.

86. Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W. ... Moore, P. K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117, 2351-2360.

87. Meng, G., Wang, J., Xiao, Y., Bai, W., Xie, L., Shan, L. ... Yong, J. (2015). GYY4137 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating oxidative stress and apoptosis in rats. *J. Biomed. Res.*, 29(3), 203-213.

88. Boor, P., Ostendorf T., & Floege, J. (2010). Renal fibrosis: Novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat. Rev. Nephrol.*, 6, 643-656.

89. Song, K., Wang, F., Li, Q., Shi, Y. B., Zheng, H. F., Peng, H. ... Hu, L. F. (2014). Hydrogen sulfide inhibits the renal fibrosis of obstructive nephropathy. *Kidney Int.*, 85(6), 1318-1329.

90. Dursun, M., Otunctemur, A., Ozbek, E., Sahin, S., Besiroglu, H., Ozsoy, O. D. ... Ozbay, N. (2015). Protective effect of hydrogen sulfide on renal injury in the experimental unilateral ureteral obstruction. *Int. Braz. J. Urol.*, 41, 1185-1193.

91. Lin, S., Visram, F., Liu, W., Haig, A., Jiang, J., Mok, A. ... Sener, A. (2016). GYY4137, a slow-releasing hydrogen sulfide donor, ameliorates renal damage associated with chronic obstructive uropathy. *J. Urol.*, 196(6), 1778-1787.

92. Pabla, N., & Dong, Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.*, 73, 994-1007.

93. Йолтухівський, М. М. (2012). *Патогенетична роль порушень метаболізму сірковмісних амінокислот у розвитку цисплатинової нефронатії*. (Дис. канд. мед. наук). Луганський державний медичний університет, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Луганськ.

94. Francescato, H. D. C., Cunha, F. Q., Costa R. S., Barbosa, F. Jr., Boim, M. A., Arnoni, C. P. ... Coimbra, T. M. (2011). Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 26(2), 479-488.

95. Ahangarpour, A., Abdollahzade, F. A., Gharibnaseri, M. K., Jalali, T., & Rashidi, I. (2014). Hydrogen sulfide ameliorates the kidney dysfunction and damage in cisplatin-induced nephrotoxicity in rat. *Vet. Res. Forum.*, 5(2), 121-127.

96. Liu, M., Jia, Z., Sun, Y., Zhang, A., Yang, T. (2016). A H₂S donor GYY4137 exacerbates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Mediators Inflamm.*, 2016, 8145785. doi: 10.1155/2016/8145785.

97. Lee, V. W. S., & Harris, D. C. H. (2011). Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*, 16, 30-38.

98. Francescato, H. D. C., Marin, E. C. S., Cunha, F. Q., Costa, R. S., Silva, C. G. A., & Coimbra, T. M. (2011). Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. *Arch. Toxicol. Dec.*, 85(12), 1597-1606.
99. Levey, A. S., & Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease. *Lancet*, 379, 165-180.
- 100 Li, H., Feng, S.-J., Zhang, G.-Z., & Wang, S.-X. (2014). Correlation of lower concentrations of hydrogen sulfide with atherosclerosis in chronic hemodialysis patients with diabetic nephropathy. *Blood Purif.*, 38(3-4), 188-94.
101. Van den Born, J. C, Hammes, H. P., Greffrath, W., van Goor, H., & Hillebrands, J. L. (2016). Gasotransmitters in vascular complications of diabetes. *Diabetes.*, 65(2), 331-345.
102. Liu, Y., Zhao, H., Qiang, Y., Qian, G., Lu, S., Chen, J. ... Fu, Y. (2015). Effects of hydrogen sulfide on high glucose-induced glomerular podocyte injury in mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 8, 6814-6820.
103. Kundu, S., Pushpakumar, S. B., Tyagi, A., Coley, D., & Sen, U. (2013). Hydrogen sulfide deficiency and diabetic renal remodeling: role of matrix metalloproteinase-9. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 304(12), 1365-1378.
104. Yuan, P., Xue, H., Zhou, L., Qu, L., Li, C., Wang, Z. ... Lu, L. (2011). Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 26, 2119-2126.
105. Safar, M. M., & Abdelsalam, R. M. (2015). H₂S donors attenuate diabetic nephropathy in rats: modulation of oxidant status and polyol pathway. *Pharmacol. Rep.*, 67, 17-23.
106. Xue, R., Hao, D.-D., Sun, J.-P., Li, W.-W., Zhao, M.-M., Li, X.-H. ... Zhu, Y.-C. (2013). Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes. *Antioxid. Redox Signal.*, 19(1), 5-23.

107. Zhou, X., Feng, Y., Zhan, Z., & Chen, J. (2014). Hydrogen sulfide alleviates diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *J. Biol. Chem.*, 289, 28827-28834.
108. Kaur, M., Sachdeva, S., Bedi, O., Kaur, T., & Kumar, P. (2015). Combined effect of hydrogen sulphide donor and losartan in experimental diabetic nephropathy in rats. *J. Diabetes Metab. Disord.*, 14, 6310.
109. Hart, P. D., & Bakris, G. L. (2010). Hypertensive nephropathy: prevention and treatment recommendations. *Expert Opin. Pharmacother.*, 11, 2675-2686.
110. Tang, G., Yang, G., Jiang, B., Ju, Y., Wu, L., & Wang, R. (2013). H₂S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 1634-1646.
111. Lu, M., Liu, Y. H., Goh, H. S., Wang, J. J., Yong, Q. C., Wang, R. ... Bian, J.-S. (2010). Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21, 993-1002.
112. Ahmad, F. U., Sattar, M. A., Rathore, H. A., Tan, Y. C., Akhtar, S., Jin, O. H. ... Johns, E. J. (2014). Hydrogen sulphide and tempol treatments improve the blood pressure and renal excretory responses in spontaneously hypertensive rats. *Ren. Fail.*, 36, 598-605.
113. Al-Magableh, M. R., Kemp-Harper, B. K., & Hart, J. L. (2015). Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice. *Hypertens. Res.*, 38, 13-20.
114. Holwerda, K. M., Burke, S. D., Faas, M. M., Zsengeller, Z., Stillman, I. E., Kang, P. M. ... Lely, A. T. (2014). Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 25, 717-725.
115. Wang, Q., Song, B., Jiang, S., Liang, C., Chen, X., Shi, J., ... Ma, H.-P. (2015). Hydrogen sulfide prevents advanced glycation end-products induced activation of the epithelial sodium channel. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 976848, 1-10.

116. Мельник, А. В. (2010). *Процеси транссульфування, метилування та утворення гідроген сульфїду у нирках у нормі та при гіпергомоцистеїнемії: зв'язок з функціональним станом нирок та можливості корекції (експериментальне дослідження)*. (Дис. канд. мед. наук). ДЗ «Луганський державний медичний університет», Луганськ.

117. Заїчко, Н. В. (2010). Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфїду в плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 4, 35-41.

118. Morris, M. S., Wang, Y., Shi, S., Dong, S., Wu, J., Song, M., ... Liu, Y. (2015). Sodium hydrosulfide attenuates hyperhomocysteinemia rat myocardial injury through cardiac mitochondrial protection. *Mol. Cell. Biochem.*, 399, 189-200.

119. Sen, U., Basu, P., Abe, O. A., Givvimani, S., Tyagi, N., Metreveli, N. ... Tyagi, S. C. (2009). Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 297, 410-419.

120. Мельник, А. В., Заїчко, Н. В., Ходаківський, О. А., & Ходаківська, О. В. (2018). Статеві особливості впливу сірководню на перебіг ішемії-реперфузії в міокарді щурів. *Фізіол. журн.*, 1, 40-46.

121. Chang, L., Geng, B., Yu, F., Zhao, J., Jiang, H., Du, J., & Tang, C. (2008). Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids.*, 34, 573-585.

122. Kamat, P. K., Kalani, A., Tyagi, S. C., & Tyagi, N. (2015). Hydrogen sulfide epigenetically attenuates homocysteine-induced mitochondrial toxicity mediated through NMDA receptor in mouse brain endothelial (bEnd3) cells. *J. Cell. Physiol.*, 230, 378-394.

123. Wallace, J. L., & Wang, R. (2015). Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 14, 329-345.

124. Revenko, O., Zaichko, N., Wallace, J., & Zayachkivska, O. (2020). Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(2), 86-97.
125. Нечипорук, В. М., Заїчко, Н. В., Мельник, А. В., Остренюк, Р. С., & Корда, М. М. (2019). Вплив хронічної гіпергомоцистеїнемії на метаболізм сірковмісних амінокислот у нирках щурів при гіпер-та гіпотиреозі. *Вісник наукових досліджень*, (1), 97-102.
126. Волощук, Н. І. (2012). Судинні механізми формування гендерних відмінностей нефротоксичності диклофенаку у щурів. *Буковинський медичний вісник*, 3(63), 73-77.
127. Товчига, О. В., Штриголь, С. Ю., & Загорський, І. І. Нефропротектори. Фармацевтична енциклопедія. Взято з <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/5841/nefroprotektori>.
128. Смирнов, А. В., Каюков, И. Г., Есаян, А. М., Добронравов, В. А., Кучер, А. Г., & Тугушева, Ф. А. (2004). Превентивный подход в современной нефрологии. *Нефрология*, 8(3), 7-14.
129. Товчига, О. В., Ролік, С. М., & Штриголь, С. Ю. (2011). Препарати з нефропротекторною дією: огляд фармацевтичного ринку України. *Український біофармацевтичний журнал*, 2(13), 29-36.
130. Анохин, С. И. & Горчаков, В. Н. (2011). Сравнительный анализ структур почки при почечной недостаточности в условиях фитокоррекции и без нее. *Фундаментальные исследования*, 11(3), 472-476.
131. Подплетня, О. А., Хомяк, Н. В., Соколова, К. В., Кайдаш, С. П., & Хомяк, О. В. (2017). Фітотерапевтичні лікарські засоби з нефропротекторною активністю (огляд). *Медичні перспективи*, 1, 10-19.
132. Yarnell, E. L. (2012). Botanical medicines used for kidney disease in the United States. *Iran J. Kidney Dis.*, 6(6), 407-418.

133. Ghorbani, A., Amiri, M. S., & Hosseini, A. (2019). Pharmacological properties of *Rheum turkestanicum*. *Janisch Heliyon.*, 5(6), e01986. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01986.
134. Chinnappan, S. M., George, A., Thaggikuppe, P., Choudhary, Y. K., Choudhary, V. K., Ramani, Y., & Dewangan, R. (2019). Nephroprotective effect of herbal extract *eurycoma longifolia* on paracetamol-induced nephrotoxicity in rats. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 13, Article ID 4916519. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2019/4916519>.
135. Mahi-Birjand, M., Yaghoubi, S., Abdollahpour-Alitappeh, M., Keshtkaran, Z., Bagheri, N., Pirouzi, A., ... Karimzadeh, I. (2020). Protective effects of pharmacological agents against aminoglycoside-induced nephrotoxicity: A systematic review. *Expert Opinion Drug Saf.*, 19(2), 167-186.
136. Горошко, О. М., & Заморський, І. І. (2008). Вплив препарату кверцетину “корвітин” на показники функції нирок у щурів. *Бук. мед. вісник.*, 4, 123-125.
137. Харченко, Д. С., Зупанець, І. А., Шебеко, С. К., & Отрішко, І. А. (2009). Вплив кверцетину при парентеральному введенні на функціональні показники нирок щурів з нирковою недостатністю на тлі хронічного гломерулонефриту. *Клінічна фармація*, 2, 50-53.
138. Посохова, К. А., Зозуляк, Н. Б., & Черняшова, В. В. (2014). Порівняльна активність водорозчинної і ліпосомальної форм кверцетину при експериментальному цукровому діабеті 2 типу. *Вісник проблем біології і медицини*, 3(109), 179-182.
139. Загайко, А. Л., & Кравченко, Г. Б. (2016). Порівняльна дія галової кислоти та кверцетину на показники функціонального стану нирок щурів за умов експериментального діабету 2 типу. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, 27(3), 31-33.
140. D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 106, 256-271.

141. Liu, X., Sun, N., Mo, N., Lu, S., Song, E., Ren, C., & Li, Z. (2019). Quercetin inhibits kidney fibrosis and the epithelial to mesenchymal transition of the renal tubular system involving suppression of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Food Funct.*, 10(6), 3782-3797.
142. Yang, H., Song, Y., Liang, Y. N., & Li, R. (2018). Quercetin treatment improves renal function and protects the kidney in a rat model of adenine-induced chronic kidney disease. *Med. Sci. Monit.*, 24, 4760-4766.
143. Dos Santos, M., Poletti, P. T., Favero, G., Stacchiotti, A., Bonomini, F., Montanari, C. C. ... Veronese, F. V. (2018). Protective effects of quercetin treatment in a pristane-induced mouse model of lupus nephritis. *Autoimmunity*, 51(2), 69-80.
144. Zhu, Y., Teng, T., Wang, H., Guo, H., Du, L., Yang, B., ... Sun, Y. (2018). Quercetin inhibits renal cyst growth in vitro and via parenteral injection in a polycystic kidney disease mouse model. *Food Funct.*, 9(1), 389-396.
145. Guo, S., Sun, J., & Zhuang, Y. (2020). Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by up-regulation miR-124 in human renal tubular epithelial cell line HK-2. *Biofactors*, 46(3), 402-410.
146. Штрыголь, С. Ю., Товчига, О. В., Койро, О. О., Щёкина, Е. Г., Штрыголь, В. С., Бондарев, Е. В., & Домар, Н. А. (2012). Новые перспективы нефропротекции. *Буковинський медичний вісник*, 3(63), 35-37.
147. Breuss, J. M., Atanasov, A. G., & Uhrin, P. (2019). Resveratrol and its effects on the vascular system. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(7), 1523.
148. Зайченко, Г. В., **Горчакова, Н. О.**, Савченко, Н. В., & Стрига, О. А. (2020). Механізми кардіо- та вазопротекторної дії ресвератролу. *Pharmacology and Drug Toxicology*, 14 (4), 223–234.
149. Li, H., Xia, N., Hasselwander, S., & Daiber, A. (2019). Resveratrol and vascular function. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(9), 2155.
150. Malaguarnera, L. (2019). Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients*, 11(5), 946.
151. Xue, H.-Y., Yuan, L., Cao, Y.-J., Fan, Y.-P., Chen, X.-L., & Huang, X.-Z. (2016). Resveratrol ameliorates renal injury in spontaneously hypertensive rats

by inhibiting renal micro-inflammation. *Biosci. Rep.*, 36(3), e00339. doi: 10.1042/BSR20160035.

152. Jang, I. A., Kim, E. N., Lim, J. H., Kim, M. Y., Ban, T. H., Yoon, H. E. ... Choi, B. S. (2018). Effects of Resveratrol on the Renin-Angiotensin System in the Aging Kidney. *Nutrients*, 10(11), 1741.

153. Den Hartogh, D. J., & Tsiani, E. (2019). Health benefits of resveratrol in kidney disease: Evidence from in vitro and in vivo studies. *Nutrients*, 11(7), 1624.

154. Ramalingam, A., Santhanathas, T., Shaukat, A. S., & Zainalabidin, S. (2019). Resveratrol supplementation protects against nicotine-induced kidney injury. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 16(22), 4445.

155. Wang, Y., Wang, B., Qi, X., Zhang, X., & Ren, K. (2019). Resveratrol protects against post-contrast acute kidney injury in rabbits with diabetic nephropathy. *Front. Pharmacol.*, 10, 833.

156. Chu, C., Lu, F.-J., Yeh, R.-H., Li, Z.-L., & Chen, C.-H. (2016). Synergistic antioxidant activity of resveratrol with genistein in high-glucose treated Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Biomed. Rep.*, 4(3), 349-354.

157. Левицкий, А. П., Макаренко, О. А., & Сукманский, О. И. (2002). *Фитоэстрогены (биохимия, фармакология, применение в медицине)*. Одесса: Моряк.

158. Волощук, Н. І. (2008). Порівняльна оцінка нефротоксичної дії диклофенаку натрію, німесуліді та целекоксибу у самців та самок щурів та нефропротективна дія препаратів флавоноїдів та ізофлавоноїдів. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 5-6, 68-74.

159. Javanbakht, M. H., Sadria, R., Djalali, M., Derakhshanian, H., Hosseinzadeh, P., Zarei, M. ... Mirshafiey, A. (2014). Soy protein and genistein improves renal antioxidant status in experimental nephrotic syndrome. *Nefrologia*, 34(4), 483-490.

160. Hou, J., Chen, W., Lu, H., Zhao, H., Gao, S., Liu, W. ... Guo, Z. (2018). Exploring the Therapeutic Mechanism of *Desmodium styracifolium* on Oxalate

Crystal-Induced Kidney Injuries Using Comprehensive Approaches Based on Proteomics and Network Pharmacology. *Front. Pharmacol.*, 9, 620.

161. Jia, Q., Yang, R., Liu, X. F., Ma, S. F., & Wang, L. (2019). Genistein attenuates renal fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Med. Rep.*, 19(1), 423-431.

162. Imai-Sumida, M., Dasgupta, P., Kulkarni, P., Shiina, M., Hashimoto, Y., Shahryari, V. ... Yamamura, S. (2020). Genistein Represses HOTAIR/Chromatin Remodeling Pathways to Suppress Kidney Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.*, 54(1), 53-70.

163. Gholampour, F., Mohammadi, Z., Karimi, Z., & Owji, S. M. (2020). Protective effect of genistein in a rat model of ischemic acute kidney injury. *Gene*, 753, 144789.

164. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. (1986). Strasbourg: Council of Europe, 123.

165. Кожем'якін, Ю. М., Хромов, О. С., Філоненко, М. А., & Сайфетдінова, Г. А. (2002). *Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними*. Київ: Державний фармакологічний центр МОЗ України.

166. Западнюк, И. П., Западнюк, Б. В., Западнюк, В. И., & Захария, Е. А. (1983). *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте*. Київ: Вища школа.

167. Штриголь, С. Ю., Лісовий, В. М., Зупанець, І. А., Шебеко, С. К., Маслова, Н. Ф., Гоженко, А. І. ... Харченко, Д. С. (2009). *Методи експериментального ураження нирок для фармакологічних досліджень. Методичні рекомендації*. Київ.

168. Singh, A. P., Junemann, A., Muthuraman, A., Jaggi, A. S., Singh, N., Grover, K., & Dhawan, R. (2012). Animal models of acute renal failure. *Pharm. Rep.*, 64, 31-44.

169. Wang, D., Chen, J., Liu, X., Zheng, P, Song G., Yi T, & Li S. (2017). A Chinese herbal formula, Jian-Pi-Yi-Shen decoction, improves muscle atrophy via regulating mitochondrial quality control process in 5/6 nephrectomised rats. *Scientific Reports*. 7(1), 9253.

170. Волощук, Н. І., & Таран, І. В. (2011). Гостра токсичність гідроген сульфїду та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті. *Медична хімія*, 4 (49), 88-91.

171. Волощук, Н. І., Конюх, С. А., Денисюк, О. М., & Саєнко, А. В. (2019). Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфїду у нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів. *Pharmacology and Drug Toxicology*, 13 (3), 187-196.

172. Wiliński, B., Wilinski, J., Somogyi, E., Góralaska, M., & Piotrowska, J. (2011). Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. *Folia Med. Cracov.*, 51(1-4), 29-35.

173. Заїчко, Н. В., Мельник, А. В., Ольховський, О. С., & Заїчко, К. О. (2012). Патент України 75683. Київ: Державне патентне відомство України.

174. Dombkowski, R., Russell, M., & Olson, K. (2004). Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, 678-685.

175. Заїчко, Н. В., Ольховський, О. С., Юрченко, П. О., Мельник, А. В., & Штатько, О. І. Патент України 87884. Київ: Державне патентне відомство України.

176. Меньшиков, В. В. (Ред.). (1987). *Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник*. Москва: Медицина.

177. Кочетов, Г. А. (1980). *Практическое руководство по энзимологии*. Москва: Высшая школа.

178. Владимиров, Ю. В., & Арчаков, А. И. (1972). *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. Москва: Наука.

179. Шевчук, С. В., Пентюк, О. О., Мусін, Р. А., & Заїчко, Н. В. Патент України на винахід 58110А. Київ: Державне патентне відомство України.
180. Веревкина, И. В., Точилкин, А. И., & Попова, Н. А. (1977). Колориметрический метод определения SH-групп и S-S-связей в белках при помощи 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) кислоты. В. Н. Орехович (Ред.), *Современные методы в биохимии*. Москва: Медицина.
181. Костюк, В. А., Потапович, А. И., & Ковалева, Ж. В. (1990). Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцитина. *Вопр. мед. химии*, 2, 88-91.
182. Fukui, T., Ishizaka, N., & Rajagopalan, S. (1997). p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ. Res.* 1, 45-51.
183. Гула, Н. М., Косякова, Г. В., & Бердишев, А. Г. (2007). Вплив N-стеароїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом. *Укр. біохім. журн.*, 5, 153-158.
184. Коренман, И. М. (1975). *Методы определения органических соединений*. Москва: Химия.
185. Саркисова, Д. С., & Перова, Ю. Л. (Ред.). (1996). *Микроскопическая техника: руководство*. Москва: Медицина.
186. Мушкамбаров, Н. Н. & Кузнецов, С. Л. (2007). *Молекулярная биология: Учебное пособие для студентов медицинских вузов*. Москва: Медицинское информ агенство.
187. Li, W. F., Yang, K., Zhu, P., Zhao, H.Q., Song, Y. H., Liu, K. C., & Huang, W. F. (2017). Genistein Ameliorates Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury in a SIRT1-Dependent Manner. *Nutrients*, 9(4), 403.
188. Albertoni, G., & Schor, N. (2015). Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease-mini-review. *J. Bras. Nefrol.*, 37(1),106-114.

189. Волощук, Н. І., & Таран, І. В. (2014). Вираженість гастротоксичної дії диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфїду в експерименті. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 4-5(40), 17-24.

190. Мельник, А. В., & Волощук, Н. І. (2017). Вплив природних поліфенолів на індуковані гіпергомоцистеїнемією зміни метаболізму гідроген сульфїду в міокарді та аорті самців та самок щурів. *Світ медицини та біології*, 1(59), 129-133.

191. Yetik-Anacak, G., Sevin, G., Ozzayım, O., Dereli, M. V., & Ahmed, A. (2016). Hydrogen sulfide: A novel mechanism for the vascular protection by resveratrol under oxidative stress in mouse aorta. *Vascul. Pharmacol.*, 87, 76-82.

192. Voloshchuk, N. I., Taran, I. V., & Melnik, A. V. (2015). Vascular mechanism in the diclophenac induced gastrototoxicity: the association with the level of hydrogen sulfide. *Curierul medical*, 1, 7-11.

193. Конюх, С. А. (2018). *Участь системи гідроген сульфїду в фізіології та патології нирок*, Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку - 2018» (стор. 447). Вінниця: Друкарня ВНМУ ім. М.І. Пирогова

194. Волощук, Н. І., Конюх, С. А., & Мельник, А. В. (2017). Участь системи гідроген сульфїду в патогенезі експериментальної ниркової недостатності. *Вісник морфології*, 2, 252-256.

195. Волощук, Н. І. & Конюх, С. А. (2016). *Вплив донатору гідроген сульфїду на зміни клітинного циклу та фрагментацію ДНК у нирках щурів з гострою нирковою недостатністю*, Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», присвячена 100-річчю Дніпропетровської (Катеринославської) школи морфологів (стор. 29-30). Дніпро.

196. Kopecká, J., Krijt, J., Raková, K., & Kožich, V. (2011). Restoring assembly and activity of cystathionine β -synthase mutants by ligands and chemical chaperones. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 34(1), 39-48.

197. Koniukh, S., Voloshchuk, N., Melnyk, A., & Domin, I. (2020). Hydrogen sulfide metabolism and its role in kidney function in a rat model of chronic kidney disease. *Health Prob Civil*. Retrieved from <https://doi.org/10.5114/hpc.2020.95763>.

198. Волощук, Н. І., & Конюх, С. А. (2016). *Зміни рівнів гідроген сульфід у тварин з експериментальною нирковою недостатністю*, Матеріали VIII Національного конгресу фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (стор. 17). Харків: НФаУ.

199. Волощук, Н. І., & Конюх, С. А. (2019). *Вплив модуляторів обміну гідроген сульфід на метаболізм гідроген сульфід у нирках та їх функціональний стан за умов експериментальної хронічної хвороби нирок*, Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, присвяченого 165-й річниці від дня народження І. Я. Горбачевського (с.169). Тернопіль: редакція ТДМУ ім. І.Я. Горбачевського.

200. Kasinath, B. S., Feliers, D., & Lee, H. J. (2018). Hydrogen sulfide as a regulatory factor in kidney health and disease. *Biochem. Pharmacol.*, 149, 29-41.

201. Luo, R., Hu, S., Liu, Q., Han, M., Wang, F., Qiu, M. ... Li, C. (2019). Hydrogen sulfide upregulates renal AQP-2 protein expression and promotes urine concentration. *FASEB J.*, 33(1), 469-483.

202. Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R. ... Snyder, S.H. (2012). Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell*, 45(1), 13-24.

203. Varfolomeev, E., Goncharov, T., & Vucic, D. (2015). Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF- κ B signaling. *Methods Mol. Biol.*, 1280, 269-282.

204. Barr, L. A., & Calvert, J. W. (2014). Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic. *Circ. J.*, 78(9), 2111-2118.

205. Huang, Y., Zhang, Z., Huang, Y., Mao, Z., Yang, X., Nakamura, Y. ... Yao, J. (2018). Induction of inactive TGF-beta1 monomer formation by hydrogen sulfide contributes to its suppressive effects on Ang II- and TGF-beta1-induced

EMT in renal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 501, 534-540.

206. Guo, L., Peng, W., Tao, J., Lan, Z., Hei, H., Tian, L. ... Zhang, X. (2016). Hydrogen sulfide inhibits transforming growth Factor-Beta1-induced EMT via Wnt/Catenin pathway. *PLoS ONE*, 11, e0147018.

207. Sun, H. J., Wu, Z. Y., Cao, L., Zhu, M. Y., Liu, T. T., Guo, L. ... Bian, J. S. (2019). Hydrogen Sulfide: Recent Progression and Perspectives for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *Molecules*, 24(15), 2857.

208. Askari, H., Seifi, B., Kadkhodae, M., Sanadgol, N., Elshiekh, M., Ranjbaran, M., & Aghari, P. (2018). Protective effects of hydrogen sulfide on chronic kidney disease by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. *EXCLI J.*, 17, 14-23.

209. Zhou, X., An, G., & Lu, X. (2015). Hydrogen sulfide attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *Clin. Sci.*, 128, 325-335.

210. Shirazi, M. K., Azarnezhad, A., Abazari, M. F., Poorebrahim, M., Ghoraeian, P., Sanadgol, N. ... Askari, H. (2019). The role of nitric oxide signaling in renoprotective effects of hydrogen sulfide against chronic kidney disease in rats: Involvement of oxidative stress, autophagy and apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, 234(7), 11411-11423.

211. El-Sheikh, A. A., Morsy, M. A., & Al-Taher, A. Y. (2016). Protective mechanisms of resveratrol against methotrexate-induced renal damage may involve BCRP/ABCG2. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 30(5), 406-418.

212. Qiufa, H., Xiaoyan, X., Junhui, Z., Jinbo, F., Chun, S., Bei, J., & Zhao, H. (2016). Resveratrol attenuates acute kidney injury by inhibiting death receptor-mediated apoptotic pathways in a cisplatin-induced rat model. *Mol. Med. Rep.*, 14(4), 3683-3689.

213. Albertoni, G., & Schor, N. (2015). Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease-mini-review. *J. Bras. Nefrol.*, 37(1), 106-114.

214. Волощук, Н. І. (2010). Оцінка впливу препарату ЕКСО на терапевтичну активність та гастротоксичність нестероїдних протизапальних засобів у самців та самок щурів. *Biomedical and biosocial anthropology*, 14, 83-87.

215. Voloshchuk, N., Konjuch, S., Melnyk, A., & Denysiuk, O. (2020). The influence of genistein, resveratrol and quercetin on functional state of kidney in rats with experimental chronic kidney disease. Connection with hydrogen sulfide system. *Modern Science. Moderní věda*, 2, 82-93.

216. Волощук, Н. І., Конюх, С. А., & Пашинська, О. С. (2017). Вплив рослинних поліфенольних сполук на основні показники роботи нирок у щурів, Матеріали ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини» (стор.145-147). Вінниця: ТОВ «ТВОРИ».

217. Конюх, С. А., & Таран, І. В. (2017). Вплив природних поліфенолів на рівень гідроген сульфїду у нирках щурів, Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України (стор. 66). Київ: ТОВ «Видавничий дїм «Авіцена».

218. Конюх, С. А., Волощук, Н. І., & Вашкеба, К. Ю. (2019). Вплив природних поліфенолів на метаболїзм гідроген сульфїду у тварин з експериментальною хронїчною хворобою нирок, Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Хїмїя природних сполук» (стор. 85-86). Тернопіль: Видавництво ТДМУ.

219. Altaany, Z., Yang, G., & Wang, R. (2013). Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 17(7), 879-888.

220. Конюх, С. А., Волощук, Н. І., Мельник, А. В., Денисюк, О. М., & Жорняк, П. В. (2019). Молекулярні механїзми нефропротекторного впливу поліфенолів за експериментальної хронїчної хвороби нирок. Зв'язок з системою гідроген сульфїду. *Вїсник Вінницького національного медичного університету*, 4(23), 561-566.

221. Kimura, H. (2017). Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, 27(10), 619-621.

222. Stein A., & Bailey, Sh. M. (2013). Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biology*, 1, 32-39.

223. Jackson, M. R., Melideo, S. L., & Jorns, M. S. (2012). Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry*, 51(34), 6804-6815.

224. Filipovic, M. R., & Ivanovic-Burmazovic, I. (2012). The kinetics and character of the intermediates formed in the reaction between sodium nitroprusside and hydrogen sulfide need further clarification. *Chemistry*, 18(42), 13538-13540.

225. Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L. (2019). Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*, 24(6), 1123.

226. Wang, Z., Yan, Y., Wang, Y., & Tong, F. (2019). The interaction between CSE/H₂S and the iNOS/NO-mediated resveratrol/poly(ethylene glycol)-poly(phenylalanine) complex alleviates intestinal ischemia/reperfusion injuries in diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.*, 112, 108736.

227. Meng, B., Gao, W., Wei, J., Pu, L., Tang, Z., & Guo, C. (2015). Quercetin Increases Hepatic Homocysteine Remethylation and Transsulfuration in Rats Fed a Methionine-Enriched Diet. *Biomed. Res. Int.*, 2015, 815210.

228. Волощук, Н. І., Конюх, С. А., Мельник, А. В., Орленко, О. Б. (2019). Молекулярні механізми впливу природних поліфенолів на метаболізм гідроген сульфїду у нирках щурів за експериментальної хронїчної хвороби нирок, Матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалїстів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профїлактиці захворювань з позицій доказової медицини» (стор. 50-54). Вінниця: ТОВ «ТВОРИ».

229. Конюх, С. А., Король, А. П. (2020). Вплив генїстейну на морфологїчну будову єдиної нирки у щурів з експериментальною хронїчною хворобою нирок, Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю,

присвяченої 70-річчю з дня народження професора В.М. Бобирьова (стор. 12-13). Полтава: додаток до науково-практичного журналу «Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії».

ДОДАТКИ

Додаток А

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ
РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Волощук Н. І. Участь системи гідроген сульфїду в патогенезї експериментальної ниркової недостатності / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, А. В. Мельник // Вісник морфології. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 252-256. *(Дисертант виконав аналіз літературних джерел, виконання експериментів, статистичну обробку отриманих даних, приймав участь в аналізі результатів і формулюванні висновків).*

2. Молекулярні механізми нефропротекторного впливу поліфенолів за експериментальної хронічної хвороби нирок. Зв'язок з системою гідроген сульфїду / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, А. В. Мельник, О. М. Денисюк, П. В. Жорняк // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2019. – № 4 (23). – С. 561-566. *(Дисертант проводив аналіз літературних джерел, постановку експерименту, обробка та описання одержаних даних, підготовку статті до друку).*

3. Дослідження впливу генїстеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфїду у нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко // Pharmacology and Drug Toxicology. – 2019. – № 13 (3). – С. 187-196. *Здобувач здійснив опрацювання літературних джерел, моделювання та проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, формування висновків та узагальнення, підготовка, оформлення та подача статті до друку).*

4. The influence of genistein, resveratrol and quercetin on functional state of kidney in rats with experimental chronic kidney disease. Connection with hydrogen sulfide system / N. Voloshchuk, S. Konjuch, A. Melnyk, O. Denysiuk // *Modern Science – Moderní věda*. – 2020. – № 2. – P.82-93. *(Здобувач здійснював відтворення модельної патології, проводив дослідження, статистичну обробку отриманих даних, формував загальний висновок, оформлення і подачу статті до друку).*

5. Hydrogen sulfide metabolism and its role in kidney function in a rat model of chronic kidney disease / S. Koniukh, N. Voloshchuk, A. Melnyk, I. Domin // *Health Prob Civil*. – 2020 - №14(4). – P. 289-297. Online publish date: 2020-06-19. *(Дисертант виконав аналіз літературних джерел, виконання експериментів, статистичну обробку отриманих даних, приймав участь в аналізі результатів і формулюванні висновків, корекцію статті відповідно до рекомендацій рецензентів).*

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Волощук Н. І. Зміни рівнів гідроген сульфід у тварин з експериментальною нирковою недостатністю / Н. І. Волощук, С. А. Конюх // *Матеріали VIII Національного конгресу фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (13-16 вересня 2016 р., м. Харків): у 2 т. - Харків: НФаУ, 2016. – Т. 2. – С. 17 (Здобувачу належить аналіз літературних джерел, проведення експерименту, участь в біохімічних дослідженнях, обробка отриманих даних. Форма участі – публікація тез).*

2. Конюх С. А. Вплив природних поліфенолів на рівень гідроген сульфід у нирках щурів // С. А. Конюх, І. В. Таран // *Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. – С. 66. (Здобувачу належить аналіз даних літератури, постановка експерименту, статистична обробка та описання отриманих результатів, оформлення та подача тез до друку. Форма участі:*

усна доповідь, публікація тез).

3. Волощук Н. І. Вплив рослинних поліфенольних сполук на основні показники роботи нирок у щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. С. Пашинська // Матеріали ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини» (16-17 листопада 2017 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2017. – С. 145-147. *(Здобувачу належить моделювання експериментальної патології, проведення функціональних та біохімічних досліджень обробка та аналіз отриманих результатів. Форма участі: усна доповідь, публікація тез).*

4. Конюх С. А. Участь системи гідроген сульфід у фізіології та патології нирок / С. А. Конюх // Збірник матеріалів XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку - 2018» (18-20 квітня 2018 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2018. – С. 447. *(Форма участі: усна доповідь, публікація тез).*

5. Молекулярні механізми впливу природних поліфенолів на метаболізм гідроген сульфід у нирках щурів за експериментальної хронічної хвороби нирок / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, А. В. Мельник, О. Б. Орленко // Матеріали Х Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини» (7-8 листопада 2019 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2019. - С. 50-54. *(Здобувачу належить аналіз даних літератури, виконання експерименту, статистична обробка та описання одержаних даних. Форма участі: усна доповідь, публікація тез).*

6. Конюх С. А. Вплив природних поліфенолів на метаболізм гідроген сульфід у тварин з експериментальною хронічною хворобою нирок / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, К. Ю. Вашкеба // Тези доп. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Хімія природних сполук» (30-31 травня 2019 р., м. Тернопіль). – Тернопіль, 2019. – С. 85-86. *(Здобувачу належить виконання експерименту, статистична обробка отриманих даних, аналіз та описання*

одержаних результатів. Форма участі: усна доповідь, публікація тез).

7. Волощук Н. І. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфідом на метаболізм гідроген сульфідом у нирках та їх функціональний стан за умов експериментальної хронічної хвороби нирок / Н. І. Волощук, С. А. Конюх // Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, присвяченого 165-й річниці від дня народження І. Я. Горбачевського (30 вересня – 4 жовтня 2019 р., м. Тернопіль). – Тернопіль, 2019. – С. 169. *(Здобувачу належить аналіз даних літератури, виконання експерименту, статистична обробка та описання одержаних даних. Форма участі: публікація тез).*

8. Конюх С. А. Вплив геністеїну на морфологічну будову єдиної нирки у щурів з експериментальною хронічною хворобою нирок / С. А. Конюх, А. П. Король // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 70-річчю з дня народження професора В.М. Бобирьова (7-8 травня 2020 р., м. Полтава). – Полтава, 2020. – С. 12-13. *(Здобувачу належить аналіз літератури, виконання експерименту, обробка та описання одержаних даних, формулювання загального висновку. Форма участі: публікація тез).*

ДОДАТОК Б

АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної (навчальної)
роботи Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова
проф. Гумінський Ю.Й.



„товшча” 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційного дослідження аспіранта кафедри фармакології
Конюх Сергія Анатолійовича

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** Нейропротекторні властивості рослинних поліфенольних сполук за умов хронічної хвороби нирок та їх зв'язок з системою гідроген сульфід (експериментальне дослідження)
- 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Конюх Сергій Анатолійович, професор Волощук Наталія Іванівна.
- 3. Джерела інформації:**
 1. Волощук Н.І., Конюх С.А., Мельник А.В. Участь системи гідроген сульфід у патогенезі експериментальної ниркової недостатності // Вісник морфології, 2017, №2, Т.23. С. 252-256.
 2. Волощук Н. І. Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфід в нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко // Pharmacology and Drug Toxicology, 2019, 13 (3), 187-196.
 3. Молекулярні механізми нейропротекторного впливу поліфенолів за експериментальної хронічної хвороби нирок. Зв'язок з системою гідроген сульфід / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, А. В. Мельник, О. М. Денисюк, П. В. Жорняк // Вісник Вінницького національного медичного університету, 2019, 4 (23). 561-566.
- 4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова з „10” 10 2019 р.
- 5. Результат впровадження:** отримана інформація свідчить про в механізмах нейропротекторної дії поліфенольних сполук за ХХН лежить потужний вплив на метаболізм H₂S у нирках, а саме здатність стимулювали ензиматичну продукцію H₂S, сповільнювати неензиматичну утилізацію H₂S і збільшувати його запаси в нирках. Зазначені ефекти асоціювались зі зростанням діурезу, ШКФ, реабсорбції води, елімінації креатиніну, екскреції натрію та калію з сечею, а також зменшенням вмісту креатиніну, натрію, калію в крові, протеїнурії. Інформація щодо H₂S-залежних механізмів ренотропної дії поліфенолів доповнить існуючі уявлення в цьому напрямку та сприятиме кращій підготовці студентів при вивченні нейропротекторних засобів.
- 6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, протокол № 2 від „10” товшча 2019 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри фармакології
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова
д.мед.н., проф.

Н.І. Волощук

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перша проректорка Івано-Франківського
національного медичного університету
Д.біол.н., професор Ерстенюк Г.М.

„19” 06 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯРезультатів дисертаційного дослідження аспіранта кафедри фармакології
Конюха Сергія Анатолійовича

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Нефропротекторні властивості рослинних поліфенольних сполук при хронічній нирковій недостатності за різної насиченості організму гідроген сульфідом (експериментальне дослідження)
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Конюх Сергій Анатолійович, професор Волощук Наталія Іванівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Волощук Н.І., Конюх С.А., Мельник А.В. Участь системи гідроген сульфід у патогенезі експериментальної ниркової недостатності // Вісник морфології, 2017, №2, Т.23. С. 252-256.
 2. Волощук Н. І. Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфід у нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко // Pharmacology and Drug Toxicology, 2019, 13 (3), 187–196.
 3. Молекулярні механізми нефропротекторного впливу поліфенолів за експериментальної хронічної хвороби нирок. Зв'язок з системою гідроген сульфід / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, А. В. Мельник, О. М. Денисюк, П. В. Жорняк // Вісник Вінницького національного медичного університету, 2019, 4 (23). 561-566.
4. **Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармакології Івано-Франківського національного медичного університету з червня 2019 р.
5. **Результат впровадження:** отримана інформація свідчить про в механізмах нефропротекторної дії поліфенольних сполук за ХХН лежить потужний вплив на метаболізм H₂S у нирках, а саме здатність стимулювати ензиматичну продукцію H₂S, сповільнювати неензиматичну утилізацію H₂S і збільшувати його запаси в нирках. Зазначені ефекти асоціювались зі зростанням діурезу, ШКФ, реабсорбції води, елімінації креатиніну, екскреції натрію та калію з сечею, а також зменшенням вмісту креатиніну, натрію, калію в крові, протеїнурії. Інформація щодо H₂S-залежних механізмів ренотропної дії поліфенолів доповнить існуючі уявлення в цьому напрямку та сприятиме кращій підготовці студентів при вивченні нефропротекторних засобів.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Івано-Франківського національного медичного університету, протокол № 10 від „18” червня 2019 р.

Відповідальний за впровадження:завідувач кафедри фармакології
Івано-Франківського національного медичного
університету д.мед.н., проф.


Л.М. Шеремета

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Перший проректор з науково-педагогічної
роботи Національного фармацевтичного
університету
доцент Федосов А.І.

03 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Дослідження впливу природних поліфенолів на показники обміну гідроген сульфідом в нирках і маркери функціонального стану видільних органів в умовно здорових щурів та тварин з експериментальною хронічною хворобою нирок.

1. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Конюх Сергій Анатолійович, професор Волощук Наталія Іванівна.

2. **Джерела інформації:**

1. Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфідом в нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко. *Pharmacology and Drug Toxicology*. 2019. 13 (3). С. 187–196.
2. Молекулярні механізми нефропротекторного впливу поліфенолів за експериментальної хронічної хвороби нирок. Зв'язок з системою гідроген сульфідом / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, А. В. Мельник, О. М. Денисюк, П. В. Жорняк. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2019. № 4 (23). С. 561–566.
3. The influence of genistein, resveratrol and quercetin on functional state of kidney in rats with experimental chronic kidney disease. Connection with hydrogen sulfide system / N. Voloshchuk, S. Konjuch, A. Melnyk, O. Denysiuk. *Modern Science – Moderní věda*. 2020. № 2. P. 82–93.

3. **Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного фармацевтичного університету з „12” березня 2020 р.

5. **Результат впровадження:** отримана інформація свідчить про в механізмах нефропротекторної дії поліфенольних сполук за ХХН лежить потужний вплив на метаболізм H₂S у нирках, а саме здатність стимулювати ензиматичну продукцію H₂S, сповільнювати неензиматичну утилізацію H₂S і збільшувати його запаси в нирках. Зазначені ефекти асоціювались зі зростанням діурезу, ШКФ, реабсорбції води, елімінації креатиніну, екскреції натрію та калію з сечею, а також зменшенням вмісту креатиніну, натрію, калію в крові, протеїнурії. Інформація щодо H₂S-залежних механізмів ренотропної дії поліфенолів доповнить існуючі уявлення в цьому напрямку та сприятиме кращій підготовці фахівців при вивченні нефропротекторних засобів.

6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного фармацевтичного університету, протокол № 13 від „12” березня 2020 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри клінічної фармакології
та клінічної фармації НФаУ,
д.мед.н., проф.

І.А. Зупанець

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

д.м.н., професор Гудар'ян О.О.

2020 р.



[Handwritten signature]
Л.О.С.С.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Дослідження ролі системи гідроген сульфід у функціонуванні нирок в фізіологічних умовах та за експериментальної гострої і хронічної хвороби нирок.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Конюх Сергій Анатолійович, професор Волошук Наталія Іванівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Волошук Н.І., Конюх С.А., Мельник А.В. Участь системи гідроген сульфід у патогенезі експериментальної ниркової недостатності // Вісник морфології, 2017, №2, Т.23. С. 252-256.
 2. Волошук Н.І., Конюх С.А. Вплив донору гідроген сульфід на зміни клітинного циклу та фрагментацію ДНК в нирках щурів з гострою нирковою недостатністю // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», присвячена 100-річчю Дніпропетровської (Катеринославської) школи морфологів. 5-7 жовтня 2016 року. – С.29-30
 3. Волошук Н.І., Конюх С.А. Зміни рівнів гідроген сульфід у тварин з експериментальною нирковою недостатністю Матеріали VIII Національного конгресу фармацевтів України "Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи"(Харків, 13-16 вересня 2016 року): у 2 т.- Харків:НФаУ. - 2016. -Т.2. - С. 17
4. **Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри біохімії та медичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» з „2” 03 2020 р.
5. **Результат впровадження:** Отримана інформація свідчить, що система гідроген сульфід залучена до функціонування як каналцевого, так і клубочкового апарату нирок. H_2S погіршував стан видільних органів за умов гострого ураження нирок гентаміцином та цисплатином, виявив захисну дію при: ішемії-реперфузії нирок у щурів, НПЗЗ-індукованій нефротоксичності. За умов ХНН, підвищення рівня гідроген сульфід у нирках корелювало із покращенням функціонального стану нирок, а зниження його кількості – навпаки, погіршувало роботу видільних органів. За цих умов донатори гідроген сульфід ($NaHS$) проявляли захисну дію, а інгібітори його синтезу (PPG) – погіршували показники роботи нирок.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри зав. кафедри біохімії та медичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», протокол № 7 від „28” лютого 2020 р.

Відповідальний за впровадження:
зав. кафедри біохімії та медичної хімії
ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
д.б.н., Маслак Г.С.

[Handwritten signature]



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Програду з наукової роботи Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України,

проф. І. М. Кліш

AS 05 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфїду в нирках і маркери функціонального стану видільних органів в умовно здорових щурів та тварин з експериментальною хронічною хворобою нирок.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Конюх Сергій Анатолійович, професор Волощук Наталія Іванівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Волощук Н. І. Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфїду в нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів / Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко // Pharmacology and Drug Toxicology, 2019, 13 (3), 187–196.
 2. Молекулярні механізми нефропротекторного впливу поліфенолів за експериментальної хронічної хвороби нирок. Зв'язок з системою гідроген сульфїду / С. А. Конюх, Н. І. Волощук, А. В. Мельник, О. М. Денисюк, П. В. Жорняк // Вісник Вінницького національного медичного університету, 2019, 4 (23). 561-566.
 3. Voloshchuk N. The influence of genistein, resveratrol and quercetin on functional state of kidney in rats with experimental chronic kidney disease. Connection with hydrogen sulfide system / N. Voloshchuk, S. Konjuch, A. Melnyk, O. Denysiuk // Modern Science - Moderní věda. - 2020. №2. – P.82-93.
4. **Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського з „15” травня 2020 р.
5. **Результат впровадження:** отримана інформація доводить участь H₂S-залежних процесів у нирках в механізмах нефропротекторного впливу поліфенольних сполук за ХХН. Використання геністеїну, і дещо в меншій мірі ресвератролу та кверцетину сприяло нормалізації обміну гідроген сульфїду та асоціювалось із зростанням діурезу, ШКФ, реабсорбції води, елімінації креатиніну, екскреції натрію та калію з сечею, а також зменшенням вмісту креатиніну, натрію, калію в крові, протеїнурії. Викладена інформація доповнить існуючі уявлення з цього питання та сприятиме кращій підготовці фахівців при вивченні рослинних нефропротекторів.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Завідувачка кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України, д. фарм. наук, професор

С. М. Марчишин

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора з наукової роботи
Фізико-хімічного інституту
ім. О.В.Богатського НАН України,
д.б.н., професор
І.І. Романовська
_____ 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Дослідження ролі системи гідроген сульфід у функціонуванні нирок в фізіологічних умовах та за експериментальної гострої і хронічної хвороби нирок.
 2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Конюх Сергій Анатолійович, професор Волощук Наталія Іванівна.
 3. **Джерела інформації:**
 1. Волощук Н.І., Конюх С.А., Мельник А.В. Участь системи гідроген сульфід у патогенезі експериментальної ниркової недостатності // Вісник морфології, 2017, №2, Т.23. С. 252-256.
 2. Волощук Н.І., Конюх С.А. Вплив донору гідроген сульфід на зміни клітинного циклу та фрагментацію ДНК в нирках щурів з гострою нирковою недостатністю // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», присвячена 100-річчю Дніпропетровської (Катеринославської) школи морфологів. 5-7 жовтня 2016 року. – С.29-30
 3. 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. <https://doi.org/10.5114/hpc.2020.95763>
 4. **Де і коли впроваджено:** у науковий процес лабораторії фізико-хімічної фармакології Фізико-хімічного інституту ім. О.В.Богатського НАН України з 20 06 2020 р.
 5. **Результат впровадження:** Отримана інформація свідчить, що система гідроген сульфід залучена до функціонування як каналцевого, так і клубочкового апарату нирок. H_2S погіршував стан видільних органів за умов гострого ураження нирок гентаміцином та цисплатином, виявив захисну дію при: ішемії-реперфузії нирок у щурів, НПЗЗ-індукованій нефротоксичності. За умов ХНН, підвищення рівня гідроген сульфід у нирках корелювало із покращенням функціонального стану нирок, а зниження його кількості – навпаки, погіршувало роботу видільних органів. За цих умов донатори гідроген сульфід ($NaHS$) проявляли захисну дію, а інгібітори його синтезу (PPG) – погіршували показники роботи нирок.
 6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3):** Поглиблення знань про залученість системи гідроген сульфід у гомеостазі органів видільної системи, процесів її функціонування у нормі та за умов експериментальної патології, підвищення ефективності методів її дослідження та пошуку нових лікарських засобів для корекції її роботи.
 6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
- Обговорено та затверджено на засіданні лабораторії фізико-хімічної фармакології, протокол № 2 від „19” червня 2020 р.

Відповідальний за впровадження
Завідувач
лабораторії фізико-хімічної фармакології д.б.н.

В.Б.Ларіонов