

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(4)-01

УДК: 615.322:616-092.4:616.61: 577.112.386

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ НЕФРОПРОТЕКТОРНОГО ВПЛИВУ ПОЛІФЕНОЛІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК. ЗВ'ЯЗОК З СИСТЕМОЮ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ

Конюх С.А., Волощук Н.І., Мельник А.В., Денисюк О.М., Жорняк П.В.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: voloshchuk@vnm.u.edu.ua

Статтю отримано 9 серпня 2019 р.; прийнято до друку 13 вересня 2019

Анотація. У роботі наведені результати дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на основні маркери оксидативного стресу, тіол-дисульфідної рівноваги та стан системи оксиду азоту в нирках щурів після моделювання хронічної хвороби нирок (ХХН) (5/6 нефректомії єдиної нирки). Для біохімічних досліджень використовували кров та гомогенат єдиної нирки щурів. Статистичну обробку отриманих результатів проводили в програмі "STATISTICA 6.1". Результати представлені у вигляді $M \pm m$. Достовірність різниці між показниками оцінювали з використанням t -критерію Ст'юдента, або U -критерію Манна-Уїтні. Для визначення кореляції між двома незалежними показниками використовували непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена. Показано, що досліджувані сполуки, особливо, кверцетин виявляли антиоксидантну активність за ХХН, що проявлялось вірогідним зменшенням вмісту МДА, КГП та активності НАДФН-оксидази (на 21,0-40,4%), а також збільшенням активності СОД (на 29,7-38,7%) в нирках, порівняно з нелікованими тваринами. Між вмістом H_2S та показниками оксидативного стресу виникали достовірні сильні або значимі зв'язки ($r=|0,65-0,74|$). Застосування поліфенолів на тлі ХХН зменшувало тіол-дисульфідний дисбаланс в нирках щурів: вірогідно зростала активність тіоредоксинредуктази, вміст відновлених тіольних груп протеїнів (на 16,0-66,4%) та зменшувався рівень дисульфідів (на 21,1-25,3%), порівняно з нелікованими тваринами. Стабілізація тіол-дисульфідної рівноваги є одним із механізмів впливу поліфенолів на стан системи H_2S в нирках, оскільки між цими показниками та вмістом H_2S реєструвались достовірні значимі та сильні зв'язки ($r=|0,63-0,75|$). Використання ресвератролу та, особливо, геністеїну супроводжувалось зростанням в нирках активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази (на 36,3-44,7%) та зменшенням активності її індукційної ізоформи (на 15,4-20,9%), відносно нелікованих тварин. Система NO в нирках є важливою молекулярною мішенню, через яку реалізується вплив геністеїну та ресвератролу на продукцію H_2S за ХХН, оскільки між вмістом H_2S та активністю різних ізоформ NO-синтази реєструвались достовірні сильні зв'язки ($r=|0,70-0,75|$).

Ключові слова: геністеїн, ресвератрол, кверцетин, гідроген сульфід, хронічна хвороба нирок, щури.

Вступ

Молекулярні механізми ураження нирок та нефропротективної дії препаратів є предметом інтенсивних досліджень. Серед значної кількості лікарських засобів та біологічно активних сполук, які виявляють ренопротекторну дію, важливе місце займають рослинні поліфенольні сполуки. В попередніх дослідженнях нами показано, що нефропротекторні властивості таких поліфенольних сполук як геністеїн, ресвератрол та кверцетин опосередковуються через вплив на систему H_2S в нирках. Всі три речовини, а особливо, геністеїн, збільшували вміст H_2S в нирках. Однак, механізми їх впливу на систему H_2S 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. Виникає питання щодо біохімічних механізмів, які забезпечують різний вплив досліджуваних поліфенольних сполук на стан системи H_2S в нирках.

З літератури відомо, що важливу роль в регуляції вмісту H_2S відіграють рівень активних форм кисню та нітрогену, активність ендотеліальної ізоформи NO-син-

тази, а також стан тіол-дисульфідного обміну [9, 13, 16]. Відомо, що швидкість утилізації гідроген сульфіду збільшується за умов оксидативного та нітрозативного стресу, адже реакційноздатні кисневі та нітрогенвісні інтермедіати викликають його окиснення з утворенням сульфатів та сульфатів [10, 12, 14]. Активні форми кисню та нітрогену також впливають на продукцію H_2S в реакції, каталізованій ЦБС. Відомо, що ензим ЦБС є редокс-чутливим 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 [13]. Останнім часом показано, що важливу роль в регуляції утворення H_2S в реакції 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 [9].

Мета дослідження - вивчити вплив природних поліфенолів (геністеїну, ресвератролу та кверцетину) на мар-

кери оксидативного стресу, стан тіол-дисульфідного обміну та активність різних ізоформ NO-синтази у щурів з експериментальною нирковою недостатністю та оцінити їх зв'язок з показниками метаболізму гідроген сульфід у нирках.

Матеріали та методи

Дослідження виконані на щурах-самцях лінії Вістар масою 300-330 г, отриманих з віварію Інституту фармакології та токсикології НАМН України, які перебували в умовах віварію ВНМУ згідно загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Страсбург, 1986). Хронічну хворобу нирок (ХХН) викликали шляхом однобічної нефректомії з подальшою субтотальною (5/6) резекцією контрлатеральної нирки [8]. Псевдооперованим тваринам проводили розрізи тканин з подальшим їх ушиванням без видалення нирки. Протягом експерименту тварини перебували в стандартних умовах віварію на 12-годинному режимі день/ніч з доступом до води та їжі *ad libitum*. Піддослідні тварини були поділені на 5 груп по 10 тварин в кожній. Групу 1 склали тварини з ХХН без лікування (контроль). Щурам трьох дослідних груп внутрішньошлунково вводили геністеїн (5 мг/кг), ресвератрол (50 мг/кг) і кверцетин (20 мг/кг) відповідно (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Псевдооперовані і контрольні щури отримували еквівалентні кількості розчинників. Функціональні та біохімічні зміни в нирках оцінювали через 40 діб. Евтаназію тварин здійснювали під тіопенталовим наркозом (30 мг/кг маси інтраперитонеально). Для біохімічних досліджень використовували кров та гомогенат єдиної нирки щурів. Вміст білка визначали мікробіуретовим методом з реактивом Бенедикта [6], малонового діальдегіду (МДА) - за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [2], карбонільних груп білків (КГ) - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразіном [7]. 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 [1].

Активність супероксиддисмутази оцінювали за відсотком гальмування окиснення кверцетину [5], НАДФН-оксидази - за ступенем поглинання НАДФН при 340 нм [11]. 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 (pH 7,0), 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 1 мМ НАДФН, 2,2 мМ L-аргініну. Для визначення активності індукцибельної 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 [3]. Вміст метаболітів оксиду азоту - нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Гріса - 0,2% на 12% розчині оцтової кислоти [4], після поперед-

нього осадження білків ацетонітрилом. Нітрати попередньо відновлювали до нітритів сумішшю, яка містила цинковий порошок та розчин аміаку. Вміст H_2S визначали спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності FeCl_3 [15].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили в програмі "STATISTICA 6.1". Отримані результати представлені у вигляді $M \pm m$. Достовірність різниці між показниками оцінювали з використанням t-критерію Ст'юдента, або U-критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали вірогідними в разі $p < 0,05$. Для визначення кореляції між двома незалежними показниками використовували непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена.

Результати. Обговорення

Першим етапом роботи було визначити вплив сполук, що досліджувались на маркери оксидативного стресу у щурів з експериментальною ХХН. Було з'ясовано, що експериментальна ХХН супроводжується ініціацією процесів оксидативного стресу з одночасним пригніченням антиоксидантного захисту. Так, у тварин з ХХН відмічається зростання активності НАДФН-оксидази на 86,5% та зниження активності СОД на 36,3% меншою ($p < 0,05$), порівняно з псевдооперованими тваринами (табл. 1).

Застосування поліфенолів за ХХН зменшувало продукцію супероксидного аніон-радикалу в реакції, каталізованій НАДФН-оксидазою та суприяло зростанню активності СОД (рис. 1). У тварин, яким вводили геністеїн, ресвератрол та кверцетин, активність НАДФН-оксидази була вірогідно на 21,7, 23,2 та 30,4% меншою, порівняно з нелікованими тваринами, а активність СОД вірогідно більшою на 29,7, 32,8 та 38,7% порівняно з групою нелікованих тварин.

Експериментальна патологія нирок супроводжується посиленням реакцій віолнорадикального окислення ліпідів та білків у нирках, про що свідчить збільшений вміст МДА та КГП у нелікованих тварин на 101,4 та 84,1%,

Таблиця 1. Вплив поліфенольних сполук на маркери оксидативного стресу та перекисного окислення білків та ліпідів в нирках щурів за умов хронічної ниркової недостатності ($M \pm m$, $n=10$).

Експериментальні групи	НАДФН-оксидаза нмоль / хв·мг протеїну	СОД ум.од. / мг протеїну	МДА нмоль / мг протеїну	КГП нмоль / мг протеїну
Псевдооперовані	1,85±0,10	4,02±0,14	4,42±0,18	2,20±0,13
ХХН	3,45±0,13*	2,56±0,09*	8,90±0,21*	4,05±0,15*
ХХН + Геністеїн	2,70±0,13**	3,32±0,09**	5,92±0,16**	3,20±0,12**
ХХН + Ресвератрол	2,65±0,14**	3,40±0,11**	5,80±0,18**	3,08±0,17**
ХХН + Кверцетин	2,40±0,10**	3,55±0,13**	5,30±0,12**	2,79±0,15**

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

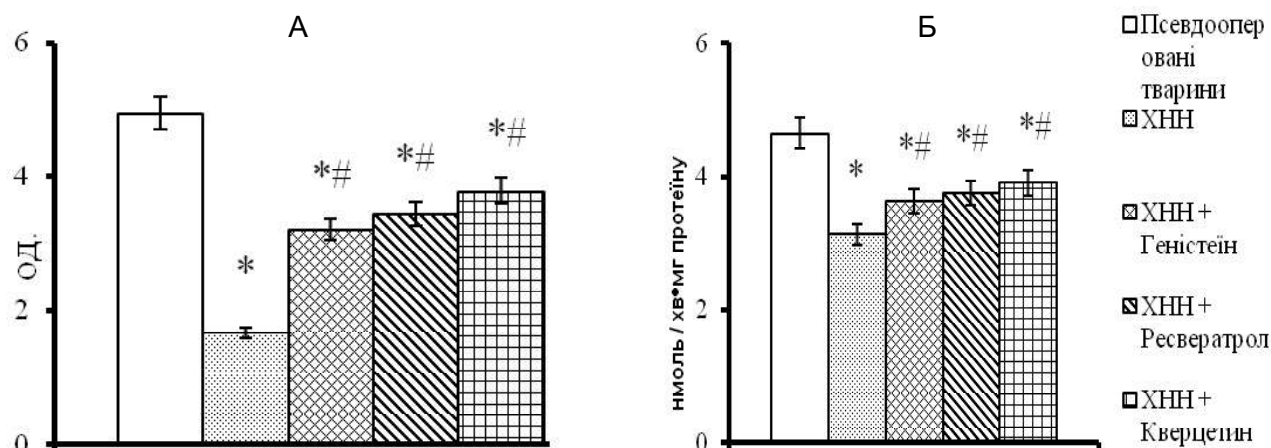


Рис. 1. Вплив поліфенолів на співвідношення вмісту тіольних та дисульфідних груп протеїнів (А) та активність тіоредоксинредуктази (Б) в нирках щурів за умов хронічної ниркової недостатності ($M \pm m$, $n=10$).

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

відповідно ($p < 0,05$), порівняно з групою контрольних тварин. Застосування поліфенольних сполук сповільнює реакції вільнорадикального окиснення ліпідів в нирках щурів. За цих умов експерименту в групах тварин, лікованих геністеїном, ресвератролом та кверцетином, вміст МДА був вірогідно нижчим на 33,5, 34,8 та 40,4%, ніж у тварин з ХХН, які не отримували поліфенолів. Аналогічна тенденція зафіксована також і щодо КГП (див. табл. 1).

Таким чином, використання поліфенолів за ХХН зменшувало дисбаланс в системі про- та антиоксидантів, що супроводжувалось депримуєчим впливом на процеси пероксидації ліпідів та окисної модифікації протеїнів. За цим ефектом кверцетин випереджав усі інші поліфеноли.

При дослідженні впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на маркери тіол-дисульфідного обміну у щурів з експериментальною ХХН було показано, що їх застосування викликало відновлювало порушений тіол-дисульфідний дисбаланс в нирках (табл. 2). ХХН супроводжується посиленням процесів окиснення тіольних груп білків з утворенням дисульфідів (зменшення в нирках рівня відновлених тіольних груп (SH-) білків на 49,7% та збільшення дисульфідів (-S-S-) на 47,9%), відносно псевдооперованих тварин. Введення геністеїну та ресвератролу викликало збільшення тіольних груп протеїнів відповідно на 49,3 та 56,6% та зменшення рівня дисульфідів на 21,1 та 22,9 %. Найбільш потужним впливом на тіол-дисульфідну рівновагу за ХХН володів кверцетин: на тлі його прийому рівень відновлених тіолів вірогідно зростав на 66,4%, а дисульфідних груп зменшувався на 25,3%, порівняно з тваринами групи "ХХН".

Важливим маркером редокс-статусу протеїнів є співвідношення вмісту відновлених тіолів та дисульфідів (SH- / -S-S-) в білках. Тому, далі нами оцінено вплив ХХН та коректорів на цей показник в нирках (рис. 1). Показано, що на тлі ХХН відмічалось різке зменшення цього співвідношення на 66,2% ($p < 0,05$), відносно показників контрольної групи. Введення геністеїну та ресвератролу

Таблиця 2. Вплив поліфенолів на вміст тіольних та дисульфідних груп протеїнів в нирках щурів за умов хронічної ниркової недостатності ($M \pm m$, $n=10$).

Групи тварин	SH- групи протеїнів, нмоль / мг протеїну	-S-S- групи протеїнів, нмоль / мг протеїну
Псевдооперовані тварини	30,2 \pm 1,05	6,12 \pm 0,16
ХХН	15,2 \pm 1,04*	9,05 \pm 0,20*
ХХН + Геністеїн	22,7 \pm 0,61*#	7,14 \pm 0,26*#
ХХН + Ресвератрол	23,8 \pm 0,65*#	6,98 \pm 0,28*#
ХХН + Кверцетин	25,3 \pm 0,51*#	6,76 \pm 0,26*#

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

за ХХН викликало збільшення співвідношення SH- / -S-S- в білках нирок, проте найбільш помітний вплив на цей показник мав кверцетин: на тлі його прийому співвідношення SH- / -S-S- в білках нирок зростало на 127% ($p < 0,05$), порівняно з тваринами групи "ХХН".

Важливим ферментом, який регулює редокс-статус білків є тіоредоксинредуктаза. Тому, в подальшому нами оцінено зміни його активності на тлі ХХН та застосування коректорів (див. рис. 1). З'ясувалось, що ХХН асоціюється зі зменшенням активності тіоредоксинредуктази в нирках щурів на 32,9% ($p < 0,05$), відносно псевдооперованих тварин. Це є важливим чинником порушення процесів редокс-регуляції функціонального стану білків та ферментів в нирках щурів на тлі ХХН. Сполуки, які вивчалися, зменшували депримуєчий вплив ХХН на процеси відновлення окиснених білкових тіолів в нирках щурів: активність тіоредоксинредуктази перевищувала відповідно на 16,0 та 20,2% ($p < 0,05$) такі показники в групі нелікованих тварин. Найбільш потужний стабілізуючий вплив на процеси відновлення білкових дисульфідів за ХХН виявляв кверцетин.

Отже, використання поліфенольних коректорів за умов ХХН зменшує прояви тіол-дисульфідного дисбалансу, покращує процеси редокс-регуляції функцій білків та

Таблиця 3. Вплив поліфенолів на активність ендотеліальної та індукційної ізоформ NO-синтази в нирках щурів за умов хронічної ниркової недостатності ($M \pm m$, $n=10$).

Групи тварин	eNOS, пмоль NO ₂ / хв·мг протеїну	iNOS, пмоль NO ₂ / хв·мг протеїну
Псевдооперовані тварини	6,25±0,13	1,24±0,06
ХХН	3,42±0,17*	2,15±0,08*
ХХН + Геністеїн	4,95±0,13**	1,70±0,04**
ХХН + Ресвератрол	4,66±0,12**	1,82±0,07**
ХХН + Кверцетин	3,70±0,15*	2,33±0,08*

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

Таблиця 4. Коефіцієнти кореляції між рівнем H₂S в нирках і біохімічними маркерами стану нирок на тлі введення поліфенольних сполук у тварин з експериментальною ХХН.

Біохімічні маркери ушкодження нирок	Рівень H ₂ S в нирках
НАДФН-оксидаза	-0,71*
СОД	0,65*
МДА	-0,74*
КГП	-0,77*
SH- / -S-S-	0,75*
Тіоредоксинредуктаза	0,72*

відновлює активність тіоредоксинредуктази. За здатністю стабілізувати тіол-дисульфідну рівновагу в нирках кверцетин випереджає всі інші сполуки.

Важливу роль в регуляції утворення H₂S у нирках мають ендотеліальна та індукційна ізоформи NO-синтази (eNOS та iNOS). Тому, ми дослідили вплив ХХН та досліджуваних коректорів на активність різних ізоферментів NO-синтази в нирках щурів та оцінили можливий зв'язок з рівнем H₂S (табл. 3). Встановлено, що ХХН у щурів супроводжується зменшенням активності eNOS на 45,3% ($p < 0,05$) та збільшення активності її індукційної ізоформи на 73,4% ($p < 0,05$), відносно псевдооперованих тварин.

Використання поліфенольних сполук геністеїну та ресвератролу супроводжувалось зменшенням дисбалансу в системі різних ізоформ NO-синтази в 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. Тобто, найбільш потужний вплив на систему нітроген монооксиду в нирках за ХХН мав ізофлавогеністеїн. У

той же час, застосування кверцетину за ХХН не викликало вірогідних змін активності ендотеліальної та індукційної ізоформ NO-синтази в нирках щурів.

Проведений кореляційний аналіз довів наявність вірогідних зв'язків між рівнем H₂S в нирках в групах тварин з ХХН, які отримують поліфеноли, та маркерами ушкодження нирок. Так, вміст цього газотрансмітера позитивно корелював з активністю антиоксидантного фермента СОД, та маркерами тіол-дисульфідного обміну, тоді як з активністю НАДФН-оксидази, МДА та КГП, які відображають процеси оксидативного стресу, зв'язок був негативний (табл. 4).

Водночас, кореляційний аналіз показав, що між рівнем H₂S та активністю eNOS в нирках виникав сильний прямий зв'язок в групах "ХХН + Геністеїн" та "ХХН + Ресвератрол" ($r=0,72-0,75$; $p < 0,05$). Поряд з цим між рівнем H₂S та активністю iNOS в нирках виникав сильний обернений зв'язок в групах "ХХН + Геністеїн" та "ХХН + Ресвератрол" ($r=-0,70-0,73$; $p < 0,05$). У той же час, в групі "ХХН + Кверцетин" достовірного зв'язку між рівнем H₂S та активностями eNOS, iNOS в нирках не виявлено. Отримані дані є доказом того, що механізм впливу геністеїну та ресвератролу на рівень гідроген сульфід у нирках за ХХН у більшій мірі, ніж кверцетину, реалізується через вплив на систему нітроген монооксиду.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Встановлено, що серед механізмів позитивного впливу рослинних поліфенолів на роботу нирок за умов експериментальної ХХН можна виділити наступні: 1) зменшення тіол-дисульфідного балансу за рахунок активності тіоредоксинредуктази; 2) зменшення активності вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів на тлі відновлення рівноваги в системі про- та антиоксидантів; 3) зменшення активності індукційної ізоформи та збільшення активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази в нирках (за винятком кверцетину, який достовірно не впливав на ці показники). Виявлено зв'язок між цими механізмами та станом системи гідроген сульфід у нирках за ХХН.

Отримані дані дають можливість вважати систему гідроген сульфід додатковим маркером ураження видільних органів та водночас мішенню для дії сполук із нефропротекторною активністю, в тому числі і природного походження.

Список посилань

- Вережкин, 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 Орехович В. Н. (Ред.). Современные методы в биохимии. М.: Медицина.
- Владимиров, Ю. В., & Арчаков, А. И. (1972). Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва: Наука.
- 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 стрептозотозинідукованим діабетом. Український біохімічний журнал, 79(5), 153-158.
- Коренман, И. М. (1975). Методы определения органических соединений. Москва: Химия.
- Костюк, В. А., Потапович, А. И., & Ковалева, Ж. В. (1990). Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопросы медицинской химии, 2, 88-9.

6. Кочетов, Г. А. (1980). *Практическое руководство по энзимологии*. Москва: Высшая школа.
7. Шевчук, С. В., Пентюк, О. О., Мусін, Р. А., & Заїчко, Н. В. (2003). Спосіб визначення карбонільних сполук в сироватці крові. Патент України на винахід №58110А, МПК 7 А61К35/16. № 2002107890. Київ: Державне патентне відомство України.
8. 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.
9. 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. doi: 10.1111/jcmm.12077.
10. Filipovic, M. R., Miljkovic, J. L., Nauser, T., Royzen, M., Klos, K., Shubina, T. ... Ivanovic-Burmazovic, I. (2012). Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(29), 12016-1227. doi: 10.1021/ja3009693.
11. Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J. B., Capers, Q., Taylor, W. R. ... Griendling, K. K. (1997). p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ. Res.*, 80(1), 45-51.
12. Kimura, H. (2017). Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. *Antioxid Redox Signal.*, 27(10), 619-621. doi: 10.1089/ars.2017.7076.
13. Kopecka, J., Krijt, J., Rakova, K., & Kozich, V. (2011). Restoring assembly and activity of cystathionine β-synthase mutants by ligands and chemical chaperones. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 34(1), 39-48. doi: 10.1007/s10545-010-9087-5.
14. Stein, A., & Bailey, Sh. M. (2013). Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biology*, 1, 32-39. doi: 10.1016/j.redox.2012.11.006.
15. Wilinski, B., Wilinski, J., Somogyi, E., Piotrowska, J., & Goralska, M. (2011). Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. *Folia Med. Cracov.*, 51(1-4), 29-35. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/230670023_Amlodipine_affects_endogenous_hydrogen_sulfide_tissue_concentrations_in_different_mouse_organs.
16. 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.
- Generation in Aorta and Heart of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes]. *Ukrayins'kij bi'okhi'mi'chnij zhurnal - Ukrainian Biochemical Journal*, 79(5), 153-158.
4. Korenman, I. M. (1975). *Metody' opredeleniya organicheskikh soedinenij [Methods for determining of organic compounds]*. M.: Khimiya.
5. Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., & Kovaleva, Zh. V. (1990). Prostoy i chuvstvitel'ny'j metod opredeleniya aktivnosti superoksiddismutazy', osnovanny' na reakcii okisleniya kvercizitina [A Simple and Sensitive Method for Determining Superoxide Dismutase Activity Based on Quercetin Oxidation Reaction]. *Voprosy' mediczinskoj khimii - Medical chemistry issues*, 2, 88-89.
6. Kochetov, G. A. (1980). *Prakticheskoe rukovodstvo po e'nzimologii [Practical Guide to Enzymology]*. Moskva: Vy'sshaya shkola.
7. Shevchuk, S. V., Pentiuk, O. O., Musin, R. A., & Zaichko, N. V. (2003). Sposib vyznachennia karbonilnykh spolk v syrovatci krvi. Patent Ukrainy na vynakhid №58110A, MPK 7 A61K35/16. № 2002107890. Kyiv: Derzhavne patentne vidomstvo Ukrainy [Method for determination of carbonyl compounds in serum. Patent of Ukraine for invention No. 58110A, IPC 7 A61K35 / 16. No. 2002107890. Kiev: State Patent Office of Ukraine.].
8. Strygol, S. Yu., Lisoviy, V. M., Zupanets, I. A., Shebeko, S. K., Maslova, N. F., Gozenko, A. I. ... Kharchenko, D. S. (2009). *Metody eksperymentalnoho urazhennya nirok dlya farmakolohichnykh doslidzhen [Methods of experimental renal involvement for pharmacological studies]*. Metodicheskie rekomendaczii - Guidelines. Kiyiv, 36.
9. 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. doi: 10.1111/jcmm.12077.
10. Filipovic, M. R., Miljkovic, J. L., Nauser, T., Royzen, M., Klos, K., Shubina, T. ... Ivanovic-Burmazovic, I. (2012). Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(29), 12016-1227. doi: 10.1021/ja3009693.
11. Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J. B., Capers, Q., Taylor, W. R. ... Griendling, K. K. (1997). p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ. Res.*, 80(1), 45-51.
12. Kimura, H. (2017). Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. *Antioxid Redox Signal.*, 27(10), 619-621. doi: 10.1089/ars.2017.7076.
13. Kopecka, J., Krijt, J., Rakova, K., & Kozich, V. (2011). Restoring assembly and activity of cystathionine β-synthase mutants by ligands and chemical chaperones. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 34(1), 39-48. doi: 10.1007/s10545-010-9087-5.
14. Stein, A., & Bailey, Sh. M. (2013). Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biology*, 1, 32-39. doi: 10.1016/j.redox.2012.11.006.
15. Wilinski, B., Wilinski, J., Somogyi, E., Piotrowska, J., & Goralska, M. (2011). Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. *Folia Med. Cracov.*, 51(1-4), 29-35. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/230670023_Amlodipine_affects_endogenous_hydrogen_sulfide_tissue_concentrations_in_different_mouse_organs.
16. 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.

References

1. Verevkin, I. V. Tochkilkin, A. I., Popova, N. A. (1977). *Kolorimetriceskij metod opredeleniya SH-grupp i S-S-svyazey v belkakh pri pomoshhi 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoinoj kisloty) kisloty' [Colorimetric method for determining SH-groups and S-S-bonds in proteins using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) acid]*. V Orekhovich V. N. (red.). *Sovremennyye metody' v biokhimii [Modern methods in biochemistry]*. M.: Meditsina.
2. Vladimirov, Yu. V., & Archakov, A. I. (1972). *Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh [Lipid peroxidation in biological membranes]*. M.: Nauka.
3. Gula, N. M., Kosyakova, G. V., & Berdishev, A. G. (2007). Vpliv N-stearoyiletanolami'nu na NO-sintaznij shlyakh generaczi'yi oksidu azotu v aorti' ta serczi' shhuri'v iz streptozotocini'ndukovanim di'abetom [Effect of N-Stearoyl ethanolamine on NO Synthesis of Nitric Oxide

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕФРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК. СВЯЗЬ В СИСТЕМОЙ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА

Конюх С.А., Волощук Н.И., Мельник А.В., Денисюк О.Н., Жорняк П.В.

Аннотация. В работе приведены результаты исследования влияния генистеина, ресвератрола и кверцетина на основные

маркеры оксидативного стресса, тиол-дисульфидного равновесия и состояние системы оксида азота в почках крыс после моделирования хронической болезни почек (ХБП) (5/6 нефрэктомии единственной почки). Для биохимических исследований использовали кровь и гомогенат единственной почки крыс. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе "STATISTICA 6.1". Результаты представлены в виде $M \pm m$. Достоверность различий между показателями оценивали с использованием t -критерия Стьюдента, или U -критерия Манна-Уитни. Для определения корреляции между независимыми показателями использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена. Показано, что исследуемые вещества, особенно, кверцетин выявляли антиоксидантную активность при ХБП, что проявлялось достоверным уменьшением содержания МДА, КГП и активности НАДФН-оксидазы (на 21,0-40,4%), а также увеличением активности СОД (на 29,7-38,7%) в почках, по сравнению с нелечеными животными. Между содержанием H_2S и показателями оксидативного стресса возникали достоверные сильные связи ($r=|0,65-0,74|$). Использование полифенолов при ХБП уменьшало тиол-дисульфидный дисбаланс в почках крыс: достоверно повышалась активность тиоредоксинредуктазы, содержание восстановленных тиольных групп протеинов (на 16,0-66,4%) и снижался уровень дисульфидов (на 21,1-25,3%), по сравнению с нелечеными животными. Стабилизация тиол-дисульфидного равновесия является одним из механизмов влияния полифенолов на систему H_2S в почках, поскольку между этими показателями и содержанием H_2S регистрировали достоверные значимые и сильные корреляционные связи ($r=|0,63-0,75|$). Введение ресвератрола и, особенно, генистеина, сопровождалось повышением в почках активности эндотелиальной изоформы NO-синтазы (на 36,3-44,7%) и уменьшением активности ее индуцибельной изоформы (на 15,4-20,9%), относительно нелеченных животных. Система NO в почках является важной молекулярной мишенью, через которую реализуется влияние генистеина и ресвератрола на продукцию H_2S при ХБП, поскольку между содержанием H_2S и активностью изоформ NO-синтазы регистрировались достоверные сильные связи ($r=|0,70-0,75|$).

Ключевые слова: генистеин, ресвератрол, кверцетин, гидроген сульфид, хроническая болезнь почек крысы.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE NEPHROPROTECTIVE ACTION OF POLYPHENOLS IN EXPERIMENTAL CHRONIC KIDNEY DISEASE. ASSOCIATION WITH HYDROGEN SULFIDE SYSTEM

Konjuch S.A., Voloshchuk N.I., Melnyk A.V., Denysiuk O.M., Zhorniak P.V.

Annotation. The results of a study of the effects of genistein, resveratrol and quercetin on the main markers of oxidative stress, thiol disulfide equilibrium and the state of the nitric oxide system in rat kidneys after modelling chronic kidney disease (CKD) (5/6 of a single kidney nephrectomy) is shown. Blood and single rat kidney homogenate were used for biochemical studies. Statistical processing of the obtained results was performed in the program "STATISTICA 6.1". The results are presented as $M \pm m$. The significance of the difference between the scores was evaluated using the Student's t -test or the Mann-Whitney U -test. A nonparametric Spearman correlation coefficient was used to determine the correlation between two independent indicators. It was shown that the studied substances, especially quercetin, caused antioxidant activity in CKD, which was manifested by a significant decrease of MDA, CGP and NADPH oxidase activity (by 21.0-40.4%), as well as an increase in SOD activity (by 29.7-38.7%) in kidney compared with untreated animals. Reliable strong correlation ($r=|0.65-0.74|$) between the H_2S content and oxidative stress markers was established. The use of polyphenols in CKD reduced the thiol-disulfide imbalance in rat kidneys: the activity of thioredoxin reductase significantly increased, the content of reduced thiol groups of proteins (by 16.0-66.4%) and the level of disulfides decreased (by 21.1-25.3%), in comparison with untreated animals. Stabilization of the thiol disulfide equilibrium is one of the mechanisms of the effect of polyphenols on the H_2S system in the kidneys, since significant and strong correlation relationships were recorded between these indicators and the H_2S content ($r=|0.63-0.75|$). The administration of resveratrol, and especially genistein, was accompanied by an increase in the activity of the eNOS (by 36.3-44.7%) and a decrease in the activity of iNOS (by 15.4-20.9%), in comparison with untreated animals. The NO system in the kidneys is an important molecular target for influence of genistein and resveratrol on the production of H_2S during CKD is realized, since reliable strong correlation were recorded between the H_2S content and the activity of NO synthase isoforms ($r=|0.70-0.75|$).

Keywords: genistein, resveratrol, quercetin, hydrogen sulfide, chronic kidney disease, rats.