

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 МОЗ України, 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 геністеїну, 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 разу, $p < 0,05$) 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 їнтактних щурів співпадала з такою за експериментального хронїчного ураження.

Вперше показано, що вплив поліфенолів на стан системи гїдроген сульфїду у нирках за ХХН асоціюється зі зменшенням активності вільнорадикального окиснення лїпїдів 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 лїкованих 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 їзоформи NO-синтази (на 36,3-44,7 %, $p < 0,05$) та зменшенням активності її їндуцибельної їзоформи (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 амінотрансфераза, нефропротекторна дія, рослинні поліфеноли, геністеїн, ресвератрол, кверцетин, щури.

Список публікацій здобувача.

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Волощук Н. І. Участь системи гідроген сульфід у патогенезі 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 сульфід / 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 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 // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 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:

6. 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).*

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. *(Здобувачу належить аналіз даних літератури, постановка експерименту, статистична обробка та описання отриманих результатів, оформлення та подача тез до друку).*

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 IX 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).*

9. Конюх С. А. Участь системи гідроген сульфід в 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. *(Здобувачу належить аналіз даних літератури, виконання експерименту, статистична обробка та описання одержаних даних).*

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. *(Здобувачу належить виконання експерименту, статистична обробка отриманих даних, аналіз та описання одержаних результатів).*

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. *(Здобувачу належить аналіз даних літератури, виконання експерименту, статистична обробка та описання одержаних даних).*

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. *(Здобувачу належить*

аналіз літератури, виконання експерименту, обробка та описання одержаних даних, формулювання загального висновку).