

І. В. Романенко, А. В. Мельник

Гепато- та нефропротекторна дія донора гідроген сульфід, кверцетину та їхньої комбінації за гострого алкогольного ураження

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

Ключові слова: гостре алкогольне ураження, печінка, нирки, запалення, апоптоз, оксидативний стрес, гідроген сульфід, кверцетин, гепатопротектори, нефропротектори

Однією з актуальних проблем цивілізації є алкогольна хвороба. Згідно зі статистикою Всесвітньої організації охорони здоров'я, загальне споживання алкоголю в розрахунку на душу населення стрімко зросло протягом останнього десятиріччя [1]. Алкоголь-індукована смертність посідає третє місце в структурі причин смерті від хвороб органів травлення в світі та складає близько 3,3 млн летальних випадків [2]. Вживання алкоголю є важливим етіологічним фактором ураження печінки та нирок [3, 4]. Гепато- та нефротоксична дія алкоголю реалізується через різноманітні механізми: оксидативний стрес, запалення, апоптоз, порушення ліпідного обміну, фіброгенез та ін. [5]. Враховуючи патогенетичні ланки розвитку алкогольної хвороби, з метою фармакокорекції уражень печінки та нирок широко використовуються біофлавоноїди, зокрема кверцетин, який пригнічує продукцію активних форм кисню, посилює антиоксидантний захист, виявляє антиапоптотичні, протизапальні й ендотеліотропні властивості [6, 7].

Останнім часом проводяться інтенсивні дослідження щодо вивчення ролі сигнальної системи H_2S у регуляції функцій печінки та нирок у

нормі та за патології [8, 9]. У той самий час сьогодні існують лише поодинокі літературні дані про цитопротекторну дію донорів H_2S за хронічної алкоголізації [10–12], тоді як інформації щодо причетності системи H_2S до механізмів ураження внутрішніх органів і відповідної фармакокорекції за гострого алкогольного ураження (ГАУ) взагалі не має. Залишається також не вивченою роль донорів H_2S у модуляції гепато- та нефропротекторної дії кверцетину за ГАУ.

Мета дослідження – вивчити стан системи H_2S , рівень маркерів запалення, оксидативного стресу й апоптозу в печінці та нирках щурів за ГАУ та оцінити можливості корекції донором гідроген сульфід, кверцетином та їхньою комбінацією.

Матеріали та методи. Досліди проведени на 91 тварині – білих нелінійних щурах-самцях з масою тіла 150–250 г. Усіх лабораторних тварин утримували на стандартному харчовому раціоні віварію ВНМУ ім. М. І. Пирогова за звичайного світлового й температурного режиму. Усі етапи досліджень виконані відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), а також Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тварини були розподілені випадковим чином на п'ять груп. Щури 1 групи (контроль) утримувались за стандартних

умов віварію та протягом 7 днів вони отримували інтрагастрально за допомогою металевого зонда з оливую воду з розрахунку 20 мл/кг маси тіла та 0,9 % розчин NaCl інтраперитонеально (і/п) у дозі 0,1 мл/кг маси тіла. У тварин 2–5 груп моделювали ГАУ шляхом інтрагастрального введення 40 % етанолу в дозі 20 мл/кг протягом 7 днів [13]. З метою корекції ГАУ тваринам 3 групи вводили кверцетин («Корвітин» ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», м. Київ) у вигляді свіжоприготовленого розчину (на 0,9 % розчині NaCl) і/п в дозі 100 мг/кг маси тіла (з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси) 1 раз на добу протягом 7 днів [14]; тваринам 4 групи вводили донор гідроген сульфід $\text{NaHS} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma, США) у вигляді свіжоприготовленого розчину (на 0,9 % розчині NaCl) і/п у дозі 3 мг/кг маси (з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура) 1 раз на добу протягом 7 днів [15]; тваринам 5 групи вводили одночасно кверцетин і $\text{NaHS} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (دوزи, шляхи та тривалість введення наведені вище).

Біохімічні та імуноферментні дослідження проведені в пост'ядерних супернатантах з гомогенату печінки та нирок. Для визначення рівня H_2S супернатант гомогенату печінки та нирок отримували наступним методом: органи промивали холодним 1,15 % розчином KCl, подрібнювали та гомогенізували в середовищі 0,01 моль/л NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). Далі до 1 мл отриманого гомогенату додавали 0,25 мл 50 % трихлороцтової кислоти, центрифугували при 1200 g 15 хв і відбирали супернатант, який одразу використовували для досліджень. З метою визначення інших біохімічних показників супернатант гомогенату печінки та нирок отримували наступ-

ним способом: органи були гомогенізовані в середовищі 0,25 моль/л сахарози та 0,01 моль/л Трис-HCl (pH 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло), далі здійснювали центрифугування впродовж 30 хв при 600 g за температури 4–6 °C. Аліквоти пост'ядерного супернатанту відбирали в мікропробірки Eppendorf і зберігали при –20 °C до проведення досліджень.

Рівень H_2S оцінювали за вмістом аніону HS^- спектрофотометричним методом у супернатанті гомогенату печінки та нирок у реакції утворення метиленового синього в присутності N,N-диметил-пара-фенілендіаміну та катіонів тривалентного заліза [16]. Активність H_2S -синтезуючого ензиму – цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) визначали в супернатанті гомогенату печінки і нирок спектрофотометричним методом за присутності гідроген сульфід [16], використовуючи адаптоване інкубаційне середовище, яке містило L-цистеїн 3,3 ммоль/л, піридоксальфосфат 0,67 ммоль/л, Трис-HCl буфер 0,08 моль/л (pH 8,5) [17]. Загальну швидкість утилізації екзогенного H_2S супернатантом гомогенату печінки та нирок оцінювали спектрофотометричним методом за зниженням рівня сульфід-аніона в інкубаційному середовищі, яке містило в кінцевих концентраціях 312 мкмоль/л Na_2S та 0,47 ммоль/л Трис-HCl буферу (pH 7,4) [18].

Уміст малонового діальдегіду (МДА) визначали спектрофотометричним методом за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [19]. Активність супероксиддисмутази (СОД, К.Ф.1.15.1.1) визначали спектрофотометричним методом за відсотком гальмування окиснення кверцетину [20]. Уміст фактору некрозу пухлин (TNFα) визначали за набором Rat

TNF α Immunoassay (ELISA Quantikine, USA) відповідно до інструкції фірми виробника на фотооптичному аналізаторі Stat Fax 303/Plus (США). Уміст білка в сечі визначали за методом Лоурі [21].

Активність апоптозу оцінювали методом протокової цитофлуориметрії на багатофункціональному науководослідному проточному цитометрі «Partec PAS» фірми Partec (Німеччина) шляхом визначення частки клітин з фрагментованою ДНК у фазі SUB-G₀G₁.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS Statistica 17.0. Результати представляли у вигляді середнього арифметичного та середньої помилки середнього ($M \pm m$). Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Шапіро-Уїлка. Достовірність різниці між показниками визначали за непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні. Порівняння трьох і більше незалежних змінних здійснювали за допомогою тесту Краскала-Уолліса в рамках аналізу one-way ANOVA. Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Спірманом. Вірогідними вважали дані при $p < 0,05$ [22].

Результати та їх обговорення. ГАУ супроводжується пертурбаціями обміну H₂S у печінці та нирках щурів (табл. 1). У групі тварин «ГАУ» реєструється вірогідне зниження вмісту H₂S у печінці та нирках відповідно на 35,1 та 28,1 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин контрольної групи. Водночас відмічається достовірне зростання загальної швидкості утилізації H₂S у печінці на 61,7 % ($p < 0,05$), а в нирках на 49,9 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. За цих умов не було виявлено вірогідних відмінностей H₂S-синтезуючої активності ЦГЛ у печінці та нирках щурів порівняно з контрольною групою.

Застосовані засоби корекції вірогідно зменшували порушення метаболізму H₂S у печінці та нирках щурів за ГАУ, хоча їхня ефективність була різною. Найменшу здатність коригувати метаболізм H₂S у печінці та нирках щурів виявляв кверцетин. У групі тварин «ГАУ + Кверцетин» у печінці та нирках щурів рівень H₂S був вірогідно вищим відповідно на 22,4 та 19,0 % ($p < 0,05$), активність ЦГЛ достовірно не відрізнялась, а швидкість утилізації H₂S була меншою відповідно на 16,5 та 15,9 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами з ГАУ. Застосування донора гідроген сульфід NaHS справляло більш виразний коригуючий вплив на обмін H₂S за ГАУ: у печінці та нирках щурів рівень H₂S був вірогідно вищим відповідно на 37,5 та 29,0 % ($p < 0,05$), активність ЦГЛ була вірогідно більшою відповідно на 29,1 та 19,1 % ($p < 0,05$), а швидкість утилізації H₂S була меншою відповідно на 29,4 та 27,4 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами з ГАУ. Найвища здатність нормалізувати метаболізм H₂S у печінці та нирках щурів за ГАУ була зареєстрована в разі застосування комбінації «Кверцетин + NaHS». За цих умов у печінці та нирках щурів рівень H₂S був вірогідно вищим відповідно на 50,6 та 41,1 % ($p < 0,05$), активність ЦГЛ була вірогідно більшою відповідно на 30,8 та 20,8 % ($p < 0,05$), а швидкість утилізації H₂S була меншою відповідно на 39,2 і 32,4 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами з ГАУ.

На тлі ГАУ в печінці та нирках щурів відмічаються прояви запальної реакції та активації оксидативних процесів (табл. 2). Так, у тварин на тлі ГАУ в печінці та нирках вірогідно зростає рівень TNF α відповідно в 2,72 та 2,29 рази ($p < 0,05$), МДА в 3,10 та

Стан системи гідроген сульфід у печінці та нирках щурів за гострого алкогольного ураження
й на тлі корекції ($M \pm m, n = 10-20$)

Група тварин	H ₂ S, нмоль/мг протеїну		Цистатіонін-γ-ліаза, нмоль/хв • мг протеїну		Швидкість утилізації H ₂ S, нмоль S ²⁻ /хв • мг протеїну	
	печінка	нирки	печінка	нирки	печінка	нирки
Контрольна група, n = 10	6,12 ± 0,49	3,45 ± 0,20	3,15 ± 0,17	1,84 ± 0,09	1,20 ± 0,08	0,754 ± 0,036
Гостре алкогольне ураження, n = 20	3,97 ± 0,21*	2,48 ± 0,14*	3,02 ± 0,19	1,78 ± 0,08	1,94 ± 0,11*	1,13 ± 0,06*
Гостре алкогольне ураження + кверцетин, n = 12	4,86 ± 0,25*,&	2,95 ± 0,17*,&	3,05 ± 0,16	1,81 ± 0,10	1,62 ± 0,09*,&	0,950 ± 0,042*,&
Гостре алкогольне ураження + NaHS, n = 12	5,46 ± 0,35*,&	3,20 ± 0,18*,&	3,90 ± 0,15*,&,#	2,12 ± 0,07*,&,#	1,37 ± 0,07*,&,#	0,820 ± 0,038*,&,#
Гостре алкогольне ураження + кверцетин + NaHS, n = 12	5,98 ± 0,40*,&,#	3,50 ± 0,20*,&,#	3,95 ± 0,18*,&,#	2,15 ± 0,09*,&,#	1,18 ± 0,06*,&,#	0,764 ± 0,031*,&,#

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: *Статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) порівняно з показником контрольної групи, &статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) порівняно з показником групи тварин з ГАУ, #статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) порівняно з показником групи тварин з ГАУ, *статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) порівняно з показником групи тварин з ГАУ + Кверцетин.

Показники активності запалення й оксидативного стресу в печінці та нирках щурів за гострого алкогольного ураження та на тлі корекції ($M \pm m$, $n = 10-20$)

Група тварин	TNF α , нг/мг протеїну		Малоновий діальдегід, мкмоль/мг протеїну		Супероксиддисмутаза, у. о./мг протеїну	
	печінка	нирки	печінка	нирки	печінка	нирки
Контрольна група, n = 10	1,25 \pm 0,10	0,520 \pm 0,031	12,60 \pm 0,22	2,75 \pm 0,18	86,20 \pm 2,64	41,50 \pm 1,35
Гостре алкогольне ураження, n = 20	3,40 \pm 0,18*	1,19 \pm 0,10*	39,10 \pm 0,44*	5,51 \pm 0,32*	56,0 \pm 1,48*	29,10 \pm 0,49*
Гостре алкогольне ураження + кверцетин, n = 12	2,50 \pm 0,15*,&	0,926 \pm 0,075*,&	30,10 \pm 0,40*,&	4,42 \pm 0,28*,&	70,50 \pm 1,53*,&	34,60 \pm 0,56*,&
Гостре алкогольне ураження + NaHS, n = 12	2,14 \pm 0,14*,&	0,845 \pm 0,060*,&	23,20 \pm 0,32*,&,#	3,60 \pm 0,24*,&,#	76,20 \pm 1,74*,&,#	37,70 \pm 0,68*,&,#
Гостре алкогольне ураження + кверцетин + NaHS, n = 12	1,73 \pm 0,12*,&,#	0,738 \pm 0,045*,&,#	18,80 \pm 0,29*,&,#	3,35 \pm 0,21*,&,#	82,50 \pm 2,20*,&,#	39,60 \pm 1,30*,&,#

2,0 разу ($p < 0,05$), а також зменшення активності СОД на 35,0 та 29,8 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Запропонована терапія виявляла протизапальну та антиоксидантну активності за ГАУ, хоча ефективність залежала від обраного коректора. За протизапальною та антиоксидантною активністю NaHS перевершував кверцетин, а найбільшу ефективність виявляла комбінація «Кверцетин + NaHS». У групі тварин «ГАУ + Кверцетин» у печінці та нирках реєструється вірогідне зменшення рівнів TNF α відповідно на 26,5 та 22,2 % ($p < 0,05$), МДА на 23,0 та 19,8 % ($p < 0,05$), а також збільшення активності СОД на 25,9 та 18,9 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами. У тварин, які отримували NaHS, у печінці та нирках відмічається вірогідне зменшення рівнів TNF α відповідно на 37,1 та 29,0 % ($p < 0,05$), МДА на 40,6 та 34,7 % ($p < 0,05$), а також збільшення активності СОД на 36,1 та 29,6 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами. За умов застосування кверцетину разом з NaHS у печінці та нирках зафіксоване вірогідне зменшення рівнів TNF α відповідно на 49,1 та 38,0 % ($p < 0,05$), МДА на 51,9 та 39,2 % ($p < 0,05$), а також збільшення активності СОД на 47,3

та 36,1 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами.

ГАУ супроводжується індукцією апоптозу в тканині печінки та нирок, про що доказово свідчить вірогідне зростання частки клітин з фрагментованою ДНК у фазі SUBG $_0$ G $_1$ відповідно на 37,9 та 32,0 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою (табл. 3). Застосування кверцетину, NaHS та їхньої комбінації у тварин на тлі ГАУ відрізнялось за антиапоптотичною активністю. За умов застосування монотерапії кверцетином відмічалось зменшення частки клітин у фазі SUBG $_0$ G $_1$ відповідно на 15,1 та 13,5 % ($p < 0,05$), а за використання NaHS – на 21,0 та 17,3 % ($p < 0,05$) порівняно з нелікованими тваринами. Найвища антиапоптотична активність за ГАУ зафіксована в комбінації «Кверцетин + NaHS»: частка клітин у фазі SUBG $_0$ G $_1$ була меншою відповідно на 26,1 та 23,0 % ($p < 0,05$) порівняно з тваринами, які не отримували лікування.

Проведені дослідження показали, що в патогенез ГАУ печінки та нирок до певної міри інтегруються порушення обміну H $_2$ S. Нами встановлено, що за даного патологічного стану в органах формується дефіцит H $_2$ S на тлі збільшення загальної швидкості його деградації. У літературі нами не

Таблиця 3

Активність апоптозу в клітинах печінки та нирок щурів за гострого алкогольного ураження та на тлі корекції (M \pm m, n = 5)

Група тварин	Відсоток клітин з фрагментованою ДНК у фазі SUBG $_0$ G $_1$	
	печінка	нирки
Контрольна група	4,14 \pm 0,22	2,41 \pm 0,08
Гостре алкогольне ураження	5,71 \pm 0,17*	3,18 \pm 0,15*
Гостре алкогольне ураження + кверцетин	4,85 \pm 0,16*,&	2,75 \pm 0,13*,&
Гостре алкогольне ураження + NaHS	4,51 \pm 0,14&	2,63 \pm 0,12&
Гостре алкогольне ураження + кверцетин + NaHS	4,22 \pm 0,24&,#	2,45 \pm 0,10&,#

знайдено даних щодо причетності системи H_2S до механізмів ураження нирок і печінки за ГАУ. Однак існують літературні повідомлення щодо ролі H_2S у патогенезі ураження печінки та нирок іншої етіології (неалкогольна жирова хвороба, цироз печінки, цукровий діабет та ін.) [8, 23].

За умов ГАУ в печінці та нирках щурів реєструється індукція запалення, оксидативного стресу та апоптозу, що тісно асоціюється з недостатнім рівнем H_2S у цих органах. Доказом цього є результати кореляційного аналізу, які показали наявність достовірних обернених кореляцій між рівнем H_2S в органах і вмістом $TNF\alpha$, МДА та часткою клітин у фазі $SUBG_0G_1$: $r_s = -(0,54-0,75)$, $p < 0,05$. Отримані результати не суперечать даним літератури, в яких повідомляється про розвиток запалення, активацію апоптозу та процесів пероксидації на тлі дефіциту ендogenous H_2S за різних патологічних станів [24, 25].

Застосування кверцетину та NaHS за ГАУ з різною ефективністю стримує формування пертурбацій метаболізму H_2S , індукцію запалення, оксидативного стресу й апоптозу в печінці та нирках. Нами встановлено, що за вказаними ефектами NaHS випереджував кверцетин, причому використання комбінації «Кверцетин + NaHS» виявляло найвираженіший гепато- та нефропротекторний ефект. У літературі нами знайдені поодинокі повідомлення щодо гепато- та кардіопротекторної дії NaHS за хронічного алкогольного ураження

[10, 12] і зовсім відсутні дані щодо впливу на гепато- та нефропротекторні властивості кверцетину за ГАУ.

Таким чином, проведені дослідження обґрунтовують можливість використання комбінації кверцетину та NaHS з метою фармакотерапії ГАУ печінки та нирок, що є перспективним для подальших досліджень.

Висновки

ГАУ супроводжувалось порушенням обміну H_2S у печінці та нирках: відмічалось вірогідне зниження вмісту H_2S на 28,1 і 35,1 % ($p < 0,05$) та зростання загальної швидкості його утилізації на 49,9 і 61,7 % ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контролем. У печінці та нирках щурів за ГАУ реєстрували також індукцію запалення (збільшувався рівень $TNF\alpha$ в 2,29 і 2,72 рази відносно контролю, $p < 0,05$), оксидативного стресу (збільшувався вміст МДА в 2,0 і 3,1 рази, $p < 0,05$) та апоптозу (збільшувалась частка клітин у фазі $SUBG_0G_1$ на 32,0 і 37,9 % відповідно, $p < 0,05$), що тісно асоціювалось з формуванням дефіциту H_2S ($r_s = -(0,54-0,75)$, $p < 0,05$). Запропонована терапія ГАУ зменшувала порушення обміну H_2S , виявляла протизапальну, антиоксидантну й антиапоптотичну активність, хоча її ефективність залежала від обраних засобів корекції. За умов ГАУ найвиразнішу гепато- та нефропротекцію забезпечувала комбінація «Кверцетин + NaHS», їй поступалась монотерапія NaHS, а найменшу ефективність виявляв кверцетин.

1. Rate of alcohol consumption in the daily life of adolescents and emerging adults. R. W. Carpenter, H. Treloar Padovano, N. N. Emery, R. Jr. Miranda. *Psychopharmacology*. 2019. V. 236 (11). P. 3111–3124. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05262-8>.
2. Relationship of alcohol consumption to all-cause, cardiovascular, and cancer-related mortality in U. S. adults. B. Xi, S. P. Veeranki, M. Zhao et al. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017. V. 70 (8). P. 913–922. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.06.054>.
3. Alcohol-related liver disease: areas of consensus, unmet needs and opportunities for further study. M. Thursz, P. S. Kamath, P. Mathurin et al. *Journal of hepatology*. 2019. V. 70 (3). P. 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.041>.

4. Експериментальна модель алкогольної нефропатії у щурів. В. М. Земляний, В. Б. Брін, Е. М. Гаглоєва, Н. В. Соколовський. *Вісник нових медичних технологій*. 2020. V. 27 (4). P. 79–81.
5. Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease. L. Z. Kong, N. Chandimali, Y. H. Han et al. *International journal of molecular sciences*. 2019. V. 20 (11). P. 2712. <https://doi.org/10.3390/ijms20112712>.
6. Natural compounds: a potential treatment for alcoholic liver disease? J. Yan, Y. Nie, M. Luo et al. *Frontiers in pharmacology*. 2021. V. 12. P. 694475. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.694475>.
7. Quercetin attenuates chronic ethanol-induced hepatic mitochondrial damage through enhanced mitophagy. X. Yu, Y. Xu, S. Zhang et al. *Nutrients*. 2016. V. 8 (1). P. 27. <https://doi.org/10.3390/nu8010027>.
8. Hydrogen sulfide as a novel regulatory factor in liver health and disease. D. D. Wu, D. Y. Wang, H. M. Li et al. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019. V. 3831713. <https://doi.org/10.1155/2019/3831713>.
9. Roles of hydrogen sulfide donors in common kidney diseases. E. E. Ngowi, M. Sarfraz, A. Afzal et al. *Frontiers in pharmacology*. 2020. V. 11. P. 564281.
10. Hydrogen sulfide alleviates myocardial fibrosis in mice with alcoholic cardiomyopathy by downregulating autophagy. B. Liang, T. Xiao, J. Long et al. *International journal of molecular medicine*. 2017. V. 40 (6). P. 1781–1791. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3191>.
11. Read E., Zhu J., Yang G. Disrupted H₂S signaling by cigarette smoking and alcohol drinking: evidence from cellular, animal, and clinical studies. *Antioxidants*. 2021. V. 10 (1). P. 49.
12. Diallyl trisulfide attenuates ethanol-induced hepatic steatosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis. L. Y. Chen, Q. Chen, Y. F. Cheng et al. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016. V. 79. P. 35–43.
13. Рукало Н. А., Романенко І. В. Визначення показників оксидативного стресу та антиоксидантної системи в сироватці крові щурів при гострому алкогольному гепатиті та за умов його медикаментозної корекції. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2017. Т. 17, Вип. 4 (1). С. 51–54.
14. The effects of quercetin on seizure, inflammation parameters and oxidative stress in acute on chronic tramadol intoxication. S. Nakhaee, K. Farrokhfall, E. Miri-Moghaddam et al. *BMC pharmacology & toxicology*. 2021. V. 22 (1). P. 59. <https://doi.org/10.1186/s40360-021-00532-8>.
15. Hydrogen sulphide treatment prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the expression of ICAM-1 and NF-κB concentration in normotensive and hypertensive rats. S. F. Hashmi, H. A. Rathore, M. A. Sattar et al. *Biomolecules*. 2021. V. 11 (10). <https://doi.org/10.3390/biom11101549>.
16. Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. B. Wiliński J. Wiliński E. Somogyi et al. *Folia Med Cracov*. 2011. V. 51 (1–4). P. 29–35.
17. Мельник А. В., Пентюк О. О. Активність ензимів синтезу гідроген сульфїду в нирках щурів. *Укр. біохім. журнал*. 2009. Т. 81 (4). С. 12–22. URL: <http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/journalarchive/2009ad/qq4/2608>.
18. Мельник А. В., Волощук Н. І. Вплив біофлавоноїдів на індуковані гіпергомоцистеїнемією зміни метаболізму гідроген сульфїду в міокарді та аорті самців та самок щурів. *Мир медицини и биологии*. 2017. Т. 13, № 1 (59). С. 129–133.
19. Лушак В. І., Багнюкова Т. В., Лушак О. В. Показники оксидативного стресу. Тіобарбітурактивні продукти і карбонільні групи білків. *Укр. біохім. журнал*. 2004. Т. 26. С. 136–141.
20. Байляк М. М., Семчишин Г. М., Лушак В. І. Участь каталази і супероксиддисмутазу у відповіді *Saccharomyces cerevisiae* на дію пероксиду водню в експоненційній фазі росту. *Укр. біохім. журн*. 2006. Т. 78 (2). С. 79–85.
21. Protein measurement with the Folin phenol reagent. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. *The Journal of biological chemistry*. 1951. V. 193 (1). P. 265–275. URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf).
22. Біостатистика: підручник; за заг. ред. Т. С. Грузевої. Т. С. Грузева, В. М. Лехан, В. А. Огнев та ін. Вінниця : Нова Книга, 2020.
23. Струтинська О. Б., Мельник А. В. Роль модуляторів обміну гідроген сульфїду в модифікації нефропротекторної дії метформіну за стрептозотозин-індукованого діабету. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 16 (6). С. 387–396. <https://doi.org/10.33250/16.06.387>.
24. Feliars D., Lee H. J., Kasinath B. S. Hydrogen sulfide in renal physiology and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2016. V. 25 (13). P. 720–731. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6596>.
25. Hydrogen sulfide: recent progression and perspectives for the treatment of diabetic nephropathy. H. J. Sun, Z. Y. Wu, L. Cao et al. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019. V. 24 (15). P. 2857. <https://doi.org/10.3390/molecules24152857>.

I. В. Романенко, А. В. Мельник

Гепато- та нефропротекторна дія донора гідроген сульфїду, кверцетину та їхньої комбінації за гострого алкогольного ураження

Мета дослідження – вивчити стан системи H_2S , рівень маркерів запалення, оксидативного стресу й апоптозу в печінці та нирках щурів за гострого алкогольного ураження (ГАУ) й оцінити можливості корекції донором гідроген сульфїду, кверцетином та їхньою комбінацією.

Досліди проведені на 91 тварині – білих нелїнійних статевозрілих щурах-самцях, які були поділені на п'ять груп. Тваринам 2–5 груп моделювали ГАУ шляхом інтрагастрального введення 40 % етанолу в дозі 20 мл/кг протягом 7 днів. З метою корекції ГАУ тваринам 3 групи вводили кверцетин (100 мг/кг, внутрішньоочеревинно, 1 раз/добу, 7 дїб), 4 групи – донор гідроген сульфїду $NaHS \cdot H_2O$ (3 мг/кг, внутрішньоочеревинно, 1 раз/добу, 7 дїб), 5 групи – одночасно кверцетин та $NaHS \cdot H_2O$ у вищенаведених дозах. Тварини 1 групи (контроль) отримували еквівалентну кількість розчинників. Для біохімічних досліджень готували пост'ядерні супернатанти печінки та нирок, в яких спектрофотометричними методами визначали вміст H_2S , швидкість його утилізації, рівень малонового діальдегіду (МДА), активність супероксиддисмутази (СОД), а також рівень TNF α імуноферментним методом. Для визначення частки клітин печінки та нирок з фрагментованою ДНК (маркер апоптозу) використовували метод протокової цитофлуориметрії.

Виявилось, що ГАУ супроводжувалось порушенням обміну H_2S у печінці та нирках: відмічалось вірогідне зниження вмісту H_2S на 28,1 і 35,1 % ($p < 0,05$) та зростання загальної швидкості його утилізації на 49,9 і 61,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. У печінці та нирках щурів за ГАУ реєструвалась індукція запалення (збільшувався рівень TNF α в 2,29–2,72 разу відповідно порівняно з контролем, $p < 0,05$), оксидативного стресу (збільшувався вміст МДА в 2,0–3,1 разу, а також зменшувалась активність СОД – на 29,8 і 35,0 % відповідно, $p < 0,05$) та апоптозу (збільшувалась частка клітин у фазі $SUBG_0G_1$ на 32,0 і 37,9 %, $p < 0,05$), що тісно асоціювалось з формуванням дефіциту H_2S ($r_s = - (0,54-0,75)$, $p < 0,05$).

Запропонована терапія ГАУ зменшувала порушення обміну H_2S , виявляла протизапальну, антиоксидантну й антиапоптотичну дію, хоча її ефективність залежала від обраних засобів корекції. Найвиразнішу гепато- та нефропротекцію за ГАУ забезпечувала комбінація «Кверцетин + $NaHS$ », їй поступалась монотерапія $NaHS$, а найменшу ефективність виявляв кверцетин.

За результатами проведених досліджень обґрунтовано нові підходи до фармакотерапії ГАУ печінки та нирок з використанням комбінації кверцетину та $NaHS$, що є перспективними для подальших досліджень.

Ключові слова: гостре алкогольне ураження, печінка, нирки, запалення, апоптоз, оксидативний стрес, гідроген сульфїд, кверцетин, гепатопротектори, нефропротектори

I. V. Romanenko, A. V. Melnyk

Hepato- and nephroprotective action of hydrogen sulfide donor, quercetin and their combination in acute alcohol injury

The aim of the study was to investigate the state of the H_2S system, the level of markers of inflammation, oxidative stress and apoptosis in the liver and kidneys of rats with acute alcohol injury (AAI) and to evaluate the possibility of correction with a hydrogen sulfide donor, quercetin and their combination.

The experiments were conducted on 91 white nonlinear sexually mature male rats, which were divided into five groups. Animals of groups 2–5 were modeled AAI by intragastric administration of 40% ethanol at a dose of 20 ml/kg for 7 days. In order to correct the AAI, animals of group 3 were administered quercetin (100 mg/kg, intraperitoneally, once/day, for 7 days), group 4 – the hydrogen sulfide donor $NaHS \cdot H_2O$ (3 mg/kg, intraperitoneally, once/day, for 7 days), group 5 – both quercetin and $NaHS \cdot H_2O$ in the above doses. Animals of group 1 (control) received an equivalent amount of solvents. For biochemical studies, postnuclear supernatants of liver and kidney homogenates were prepared, in which the H_2S content, rate of its utilization, malondialdehyde (MDA) level, superoxide dismutase (SOD) activity were determined by spectrophotometric methods and TNF α level by enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, flow cytometry was used to determine the proportion of liver and kidney cells with fragmented DNA (apoptosis marker).

It was found that AAI was accompanied by impaired H_2S metabolism in the liver and kidneys: a significant decrease in H_2S content by 28.1 and 35.1% ($p < 0.05$) and an increase in the overall rate of its utilization by 49.9 and 61.7% ($p < 0.05$) respectively were observed compared to the control. In the liver and kidneys of rats with AAI, induction of inflammation (TNF α level increased by 2.29 and 2.72 times compared to control, $p < 0.05$), oxidative stress (MDA content increased by 2.0 and 3.1 times, and SOD activity decreased by 29.8 and 35.0%, $p < 0.05$) and apoptosis (the proportion of cells in the $SUBG_0G_1$ phase increased by 32.0 and 37.9% respectively, $p < 0.05$), which was closely associated with H_2S deficiency ($r_s = -(0.54-0.75)$, $p < 0.05$) were shown.

The proposed therapy reduced H_2S metabolism disorders, showed anti-inflammatory, antioxidant and antiapoptotic activities, although its effectiveness depended on the selected correctors. The most pronounced hepato- and nephroprotection in terms of AAI was provided by the combination «Quercetin + $NaHS$ », inferior to $NaHS$ monotherapy, and the least effective was quercetin.

Based on the results of our studies, new approaches to pharmacotherapy of liver and kidneys damage under AAI by the use of a combination of quercetin and NaHS have been substantiated, which are promising for further research.

Key words: acute alcohol injury, liver, kidneys, inflammation, apoptosis, oxidative stress, hydrogen sulfide, quercetin, hepatoprotectors, nephroprotectors

ORCID ID авторів:

Романенко І. В. (ORCID ID 0000-0003-3747-8983);

Мельник А. В. (ORCID ID 0000-0003-1315-7958).

Надійшла: 31 серпня 2023 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2023 р.

Контактна особа: Мельник Андрій Володимирович, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, буд. 56, вул. Пирогова, м. Вінниця, 21018. Тел.: + 30 0 93 970 27 08.
Електронна пошта: anderneting@gmail.com