

Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко

Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфїду в нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

Ключові слова: геністеїн, ресвератрол, кверцетин, гідроген сульфїд, умовно здорові щури, нирки

Важливу роль у фізіології та патології видільних органів відіграє система гідроген сульфїду (H_2S) у нирках. Ця сигнальна молекула утворюється в організмі в процесі метаболізму сірковмісних амінокислот [1]. У нирках H_2S утворюється в реакціях, що каталізуються ензимами цистатіонін-гамма-ліазою (ЦГЛ) (КФ 4.4.1.1), цистатіонін-бета-синтазою (ЦБС) (КФ 4.2.1.22) і 3-меркапто-піруватсульфур-трансферазою (3-МСТ) (ЕС 2.8.1.2) разом з цистеїнамінотрансферазою (ЦАТ) (ЕС 2.6.1.3) [1, 3, 4] у значних кількостях. Серед його ефектів найважливішими є вазодилатуючий, нейромедіаторний, антиоксидантний, цитопротекторний, антиагрегантний, протизапальний та антиапоптотичний [1, 2]. H_2S відіграє важливу роль у функціонуванні як каналцевого, так і клубочкового апарату видільних органів [5] у нормі та за патології нирок. Так, за фізіологічних умов H_2S регулює екскреторну функцію нирок (підвищує клубочкову фільтрацію та екскрецію Na^+ і K^+) шляхом інгібування білків-транспортерів натрію в клітинах ниркових каналців. H_2S знижує активність реніну [6], виявляє пряму інгібуючу дію на активність АПФ [7], викликає блокаду внутрішньоклітинного каскаду передачі сигналу (МАРК-шлях) від АТ-рецепторів, знижує їхню спорідненість до АТ II [8], проявляє депримууючий вплив на активність ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, підвищує експресію

білка Klotho, який виявляє нефропротекторну дію [9]. Можлива роль H_2S як кисневого датчика в мозковому шарі нирок є також предметом наукових дискусій.

Система H_2S залучена й до патогенезу ниркових уражень, однак його роль різноспрямована: під час ішемії-реперфузії, обструктивної, гіпертонічної та діабетичної хвороби нирок, НПЗЗ-нефротоксичності та гіпергомоцистеїнії він відіграє роль нефропротектора [10, 11]. За інших захворювань, таких як цисплатин-індукована та доксорубіцин-індукована нефропатія, H_2S може опосередковувати пошкодження нирок, хоча з цього приводу існують протилежні дані [12, 13]. Надалі дослідження в цьому напрямі дозволять не тільки консолідувати уявлення щодо ренотропних ефектів H_2S , але вже немає сумніву щодо H_2S як терапевтичної мішені для дії лікарських засобів різних груп, які використовують для лікування захворювань нирок.

Сьогодні існує велика кількість лікарських засобів і біологічно активних сполук, що виявляють здатність захищати нирки, серед яких окремим класом є рослинні засоби з політропною органопротекторною дією [14]. Багатогранна нефропротекторна активність у разі різних за етіологією уражень нирок притаманна, зокрема, флавоноїду кверцетину [15, 16], стильбеноїду ресвератролу [17], ізофлавоноу геністеїну [18]. Однак натеper дуже обмеженою є інформація щодо їхнього впливу 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, перш за все, доцільним є з'ясування ренальних ефектів вказаних фітосполук у тварин без патологічних змін у нирках, що дасть можливість розширити та доповнити наші уявлення щодо їхньої фармакодинаміки та водночас стане обґрунтуванням для подальшого вивчення їхнього ренопротекторного потенціалу за гострого, а особливо, хронічного ураження нирок. Саме цьому питанню присвячене дане дослідження.

Мета дослідження – вивчити вплив флавоноідів (кверцетину, ресвератролу) та ізофлавоноідів (геністеїну) на систему H_2S у нирках щурів без експериментальної патології та визначити його зв'язок з маркерами роботи клубочкового та каналцевого апарату видільних органів.

Матеріали та методи. Досліди проведені на 40 щурах-самцях лінії Вістар, масою 300–330 г, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», які перебували в умовах віварію ВНМУ. Дослідження проведені відповідно до загальних етичних принципів експериментів на тваринах «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.), правил гуманного відношення до експериментальних тварин, затверджених комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Усі тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-год режимом день/ніч. Воду і збалансований гранульований корм отримували *ad libitum* відповідно до нормативів. Усі маніпуляції проводили в стандартних умовах з 9^{00} до 10^{00} .

Тварини були поділені на 4 групи по 10 щурів. 1 група – контрольні тварини, щурам 2, 3 і 4 груп внутрішньошлунково 1 раз на 1 добу вводили: геністеїн (5 мг/кг), ресвератрол (50 мг/кг) і кверцетин (20 мг/кг) відповідно (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) у 30 % розчині диметилсульфоксиду з розрахунку 0,5 мл на 100 г маси тварини. Контрольні тварини отримували еквіоб'ємні кількості розчинника. Дози

поліфенольних сполук знаходились у межах доз, які за даними літератури виявляли позитивні нефропротекторні властивості [15–18]. Уміст H_2S визначали спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілєндіаміном у присутності $FeCl_3$ [19]. Активність H_2S -синтезуючих ензимів – ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ оцінювали в адаптованих нами інкубаційних середовищах за приростом сульфід-аніона [20]. Уміст H_2S у середовищі визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілєндіаміном в присутності $FeCl_3$ [21]. Здатність нирок до утилізації екзогенного H_2S визначали за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніона в інкубаційному середовищі [22]. Уміст креатиніну в сироватці крові та сечі визначали за методом Яффе з використанням стандартних наборів фірми Філісіт-Діагностика, Україна. Кліренс креатиніну та коефіцієнт реабсорбції води розраховували за відомими формулами [23]. Уміст натрію та калію в сироватці крові та сечі визначали спектрофотометричним методом за стандартним набором фірми Філісіт-Діагностика, Україна. Рівень білка визначали мікробіуретовим методом з реактивом Бенедикта [24]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили в програмі «STATISTICA 6.1», дані представляли як середню (M) і похибку середньої (m). Визначення характеру розподілу ознак у вибірці здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Достовірність різниці між показниками оцінювали з використанням параметричного t-критерію Стьюдента (за нормального розподілу) та непараметричного U-критерію Манна-Уїтні (у разі невідповідності нормальному розподілу). При використанні непараметричного U-критерію цифрові дані надані 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.

Результати та їх обговорення. Застосування природних поліфенолів в інтактних тварин сприяє збільшенню

ензиматичної продукції H_2S у нирках (табл. 1). Серед досліджуваних поліфенолів лише геністеїн і ресвератрол сприяли посиленню синтезу H_2S за участі ЦГЛ. Так, у групі тварин, які отримували геністеїн і ресвератрол, активність ЦГЛ у нирках на 15,1 і 11,7 % відповідно перевищувала показники контрольних тварин ($p < 0,05$), натомість, застосування кверцетину не супроводжувалось достовірними змінами активності ЦГЛ у нирках. Застосовані поліфеноли збільшували активність синтезу H_2S у нирках за участі ЦБС, хоча виразність їхнього впливу залежала від обраної сполуки. У тварин, яким вводили геністеїн, активність ЦБС перевищувала показник контролю на 14,4 % ($p < 0,05$). Менший вплив на продукцію H_2S за участі ЦБС у нирках мав ресвератрол, оскільки активність ЦБС за умов його застосування перевершувала показник контрольних тварин на 13,1 % ($p < 0,05$). Найбільший вплив на активність ЦБС реєструвався у кверцетину, який викликав її збільшення на 17,5 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Використання поліфенолів, особливо, геністеїну, супроводжувалось зростанням син-

тезу H_2S у нирках за участі ЦАТ. У групі «Геністеїн» активність ЦАТ була вищою за таку в групі умовно здорових тварин на 17,7 % ($p < 0,05$), у групі «Ресвератрол» активність ЦАТ була більшою за показник контролю на 13,3 % ($p < 0,05$). Найменша активність ЦАТ реєструвалась у групі «Кверцетин», де вона достовірно не відрізнялась від контролю.

Досліджувані поліфенольні сполуки в різному ступені викликали сповільнення утилізації екзогенного H_2S у нирках щурів без експериментальної патології (рис. 1). Виявилось, що у тварин групи «Геністеїн» медіана швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках 0,641 (95 % CI 0,597–0,707) нмоль S^{2-} / хв · мг протеїну, P_{25} – P_{75} – 0,624–0,688 нмоль S^{2-} / хв · мг протеїну. За середніми величинами швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках була меншою на 16,1 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. У тварин групи «Ресвератрол» медіана швидкості утилізації екзогенного H_2S у нирках 0,667 (95 % CI 0,601–0,717) нмоль S_2^- / хв · мг протеїну, P_{25} – P_{75} – 0,622–0,687 нмоль S^{2-} / хв · мг протеїну поступалась групі контролю на 15,0 % ($p < 0,05$). За умов застосування

Таблиця 1

Активність продукуючих ензимів H_2S в нирках умовно здорових щурів за впливу природних поліфенолів ($M \pm t, n = 10$)

Група тварин	Активність ензимів, нмоль H_2S / хв·мг протеїну		
	цистатіонін- гамма-ліаза	цистатіонін- бета-синтаза	цистеїнаміно- трансфераза
Контроль	1,75 ± 0,04	2,30 ± 0,09	2,53 ± 0,09
Геністеїн	2,01 ± 0,03*	2,63 ± 0,07*	2,98 ± 0,10*
Ресвератрол	1,95 ± 0,05*	2,60 ± 0,08*	2,87 ± 0,11*
Кверцетин	1,79 ± 0,08	2,70 ± 0,05*	2,52 ± 0,07

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: * $p < 0,05$ порівняно з контролем.

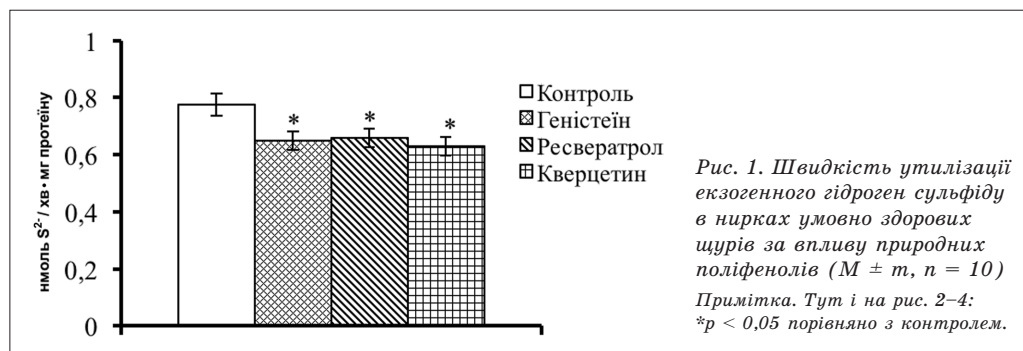


Рис. 1. Швидкість утилізації екзогенного гідроген сульфїду в нирках умовно здорових щурів за впливу природних поліфенолів ($M \pm t, n = 10$)
Примітка. Тут і на рис. 2–4: * $p < 0,05$ порівняно з контролем.

кверцетину сповільнення швидкості утилізації H_2S у нирках було найвиразнішим. За середнім показником швидкість утилізації екзогенного H_2S у нирках була меншою на 18,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Використані природні сполуки, особливо геністеїн, збільшували запаси ендogenous H_2S у нирках умовно здорових щурів (рис. 2). У тварин групи «Геністеїн» медіана вмісту H_2S у нирках 4,80 (95 % CI 4,18–5,29) нмоль/мг протеїну, P_{25} – P_{75} – 4,44–5,05 нмоль/мг протеїну. За середніми величинами вміст H_2S у нирках був більшим на 24,4 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. У тварин групи «Ресвератрол» медіана вмісту H_2S у нирках 4,51 (95 % CI 3,91–5,18) нмоль/мг протеїну, P_{25} – P_{75} – 4,18–4,93 нмоль/мг протеїну. За середніми величинами вміст H_2S у нирках перевищував на 18,6 % ($p < 0,05$) показник контрольної групи. Використання кверцетину збільшує на 12,9 % ($p < 0,05$) вміст H_2S у нирках порівняно з групою контролю. За цих умов медіана вмісту H_2S у нирках 4,41 (95% CI 3,73–4,70) нмоль/мг протеїну, P_{25} – P_{75} – 4,12–4,56 нмоль/мг протеїну.

Наступним етапом дослідження було визначити вплив сполук, що досліджу-

вались, на основні показники роботи нирок у щурів без експериментальної патології. Було встановлено, що всі три поліфеноли покращували видільну функцію нирок навіть за умов відсутності патологічних процесів. Так, на тлі їхнього застосування зареєстроване посилення елімінації креатиніну з сечею та зниження його вмісту в крові (табл. 2). Уведення геністеїну викликало зменшення рівня креатиніну в плазмі крові на 19,4 % ($p < 0,05$) і збільшення його вмісту в сечі на 20,1 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. Застосування ресвератролу супроводжувалось зменшенням рівня креатиніну в плазмі крові на 14,0 % ($p < 0,05$) та збільшенням його вмісту в сечі на 15,6 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. Найменш виразну дію щодо елімінації креатиніну проявляв кверцетин. На тлі його введення рівень креатиніну в плазмі крові зменшувався на 12,4 % ($p < 0,05$), а в сечі – зростав на 13,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Досліджувані природні поліфеноли посилювали діурез і фільтраційну функцію нирок у тварин без експериментального ураження (табл. 2). Уведення геністеїну викликало збільшен-

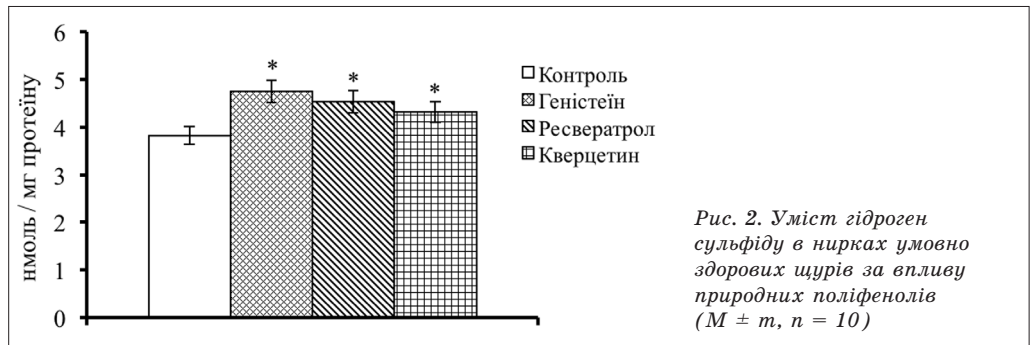


Рис. 2. Уміст гідроген сульфїду в нирках умовно здорових щурів за впливу природних поліфенолів ($M \pm t, n = 10$)

Таблиця 2

Уміст креатиніну в плазмі крові та сечі, швидкість клубочкової фільтрації та діурез в умовно здорових щурів за впливу природних поліфенолів ($M \pm t, n = 10$)

Група тварин	Креатинін		Діурез, мл/8 год	Швидкість клубочкової фільтрації, мл/хв
	плазма крові, мкмоль/л	сеча, ммоль/л		
Контроль	87,1 ± 1,87	7,03 ± 0,17	5,41 ± 0,13	0,455 ± 0,016
Геністеїн	70,2 ± 1,19*	8,44 ± 0,13*	6,61 ± 0,19*	0,826 ± 0,018*
Ресвератрол	74,9 ± 1,03*	8,12 ± 0,15*	6,40 ± 0,21*	0,724 ± 0,028*
Кверцетин	76,3 ± 0,89*	7,99 ± 0,17*	6,18 ± 0,17*	0,676 ± 0,027*

ня діурезу на 22,2 % ($p < 0,05$) та зростання швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) на 81,5 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Менший вплив на діурез і ШКФ мав ресвератрол. Його застосування супроводжувалося збільшенням діурезу на 18,3 % ($p < 0,05$) і ШКФ на 58,9 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Призначення кверцетину призводило до збільшення діурезу на 14,2 % ($p < 0,05$) і ШКФ на 48,4 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Аналіз змін електролітного балансу на тлі дії поліфенолів показав, що найвиразніший вплив на цей показник проявляв геністеїн (табл. 3). Він викликав зменшення рівня натрію в плазмі крові на 15,3 % ($p < 0,05$) та зростання його екскреції з сечею на 15,6 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Ресвератрол виявляв менш потужний вплив на елімінацію натрію. За цих умов відмічали зменшення рівня натрію в плазмі крові на 12,5 % ($p < 0,05$) і зростання його екскреції з сечею на 13,9 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою. Найменший вплив на рівні натрію в крові та сечі виявляв кверцетин. За цих умов відмічалось зменшення рівня натрію в плазмі крові на 10,4 % ($p < 0,05$) та зростання його екскреції з

сечею на 11,8 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Далі оцінили вплив поліфенольних сполук на рівень калію в крові та його екскрецію з сечею (табл. 3). Геністеїн викликав зменшення рівня калію в плазмі крові на 25,0 % ($p < 0,05$) і зростання його екскреції з сечею на 43,2 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. Ресвератрол виявляв менш виразний вплив на елімінацію калію (викликав зменшення цього електроліту в плазмі крові на 22,0 % ($p < 0,05$) і зростання його екскреції з сечею на 34,9 % ($p < 0,05$)) щодо показника тварин, які отримували розчинник. Найменший вплив на рівні калію в крові та сечі виявляв кверцетин. За його введення відмічалось зменшення рівня калію в плазмі крові на 18,5 % ($p < 0,05$) і зростання його екскреції з сечею на 29,5 % ($p < 0,05$). Використані поліфеноли, особливо, геністеїн, зменшували співвідношення Na/K у сечі умовно здорових щурів (рис. 3). Так, у тварин групи «Геністеїн» медіана співвідношення Na/K у сечі 0,049 (95 % CI 0,044–0,056), P_{25} – P_{75} – 0,046–0,51. За середніми величинами співвідношення Na/K у сечі було меншим на 19,4 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Таблиця 3

Уміст натрію та калію в плазмі крові та сечі в умовно здорових щурів за впливу природних поліфенолів ($M \pm t, n = 10$)

Група тварин	Натрій		Калій	
	плазма крові, ммоль/л	сеча, мкмоль/8 год	плазма крові, ммоль/л	сеча, мкмоль/8 год
Контроль	144,0 ± 3,43	2,37 ± 0,10	4,64 ± 0,13	38,7 ± 0,91
Геністеїн	122,0 ± 3,11*	2,74 ± 0,11*	3,48 ± 0,19*	55,4 ± 1,19*
Ресвератрол	126,0 ± 3,27*	2,70 ± 0,11*	3,62 ± 0,17*	52,2 ± 1,04*
Кверцетин	129,0 ± 2,90*	2,65 ± 0,08*	3,78 ± 0,15*	50,1 ± 0,97*

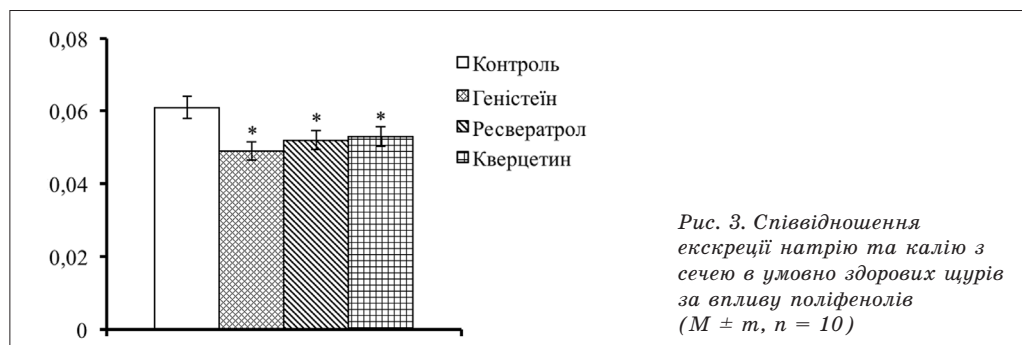


Рис. 3. Співвідношення екскреції натрію та калію з сечею в умовно здорових щурів за впливу поліфенолів ($M \pm t, n = 10$)

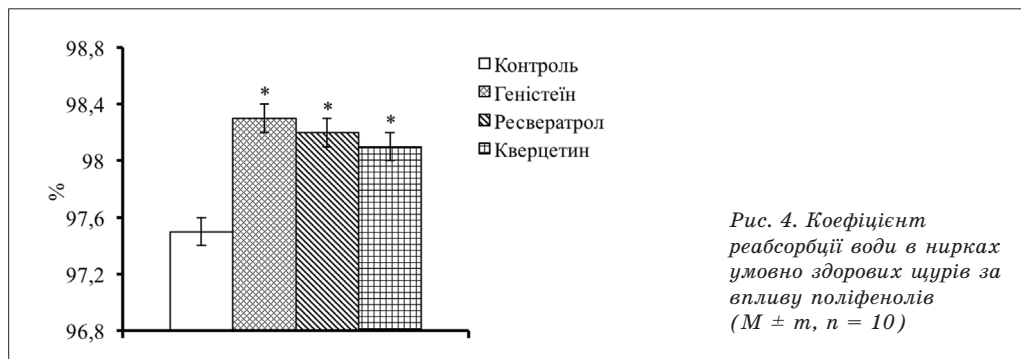


Рис. 4. Коефіцієнт реабсорбції води в нирках умовно здорових щурів за впливу поліфенолів ($M \pm t, n = 10$)

Застосовані поліфенольні сполуки сприяли посиленню реабсорбції води в каналцях нефрону, причому найефективнішим виявився геністеїн (рис. 4), який викликав статистично достовірне збільшення коефіцієнта реабсорбції води в середньому до 98,3 (95 % СІ 98,2–98,5) %. Введення ресвератролу та кверцетину виявляло менш потужну стимулюючу дію на процеси реабсорбції води. Медіана коефіцієнта реабсорбції води на тлі їх застосування становила 98,2 (95% СІ 98,0–98,2) % і 98,1 (95 % СІ 97,9–98,3) % відповідно.

Досліджувані фітосполуки викликали зменшення екскреції білка з сечею щурів без експериментальної патології. За цих умов найвищу ефективність показав геністеїн. Виявилось, що в групах «Геністеїн», «Ресвератрол», «Кверцетин» середні показники протеїнурії були меншими порівняно з контрольними тваринами на 16,8, 14,3 і 11,8 % ($p < 0,05$) відповідно.

Нефропротекторні властивості вказаних сполук, згідно з даними літератури, асоціюються з їхніми протизапальними, антиоксидантними, антиапоптотичними властивостями, здат-

ністю покращувати кровопостачання нирок, посилювати діурез, клубочкову фільтрацію. Показано, що фітоестроген геністеїн збільшує продукцію H_2S у слизовій оболонці шлунка тварин за диклофенак-індукованої гастротоксичності [25]. Застосування геністеїну збільшує вміст H_2S у серцево-судинній системі, зменшує швидкість утилізації H_2S і збільшує активність H_2S -продукуючих ензимів у міокарді та аорті за умов гіпергомоцистемії. За цих умов введення кверцетину також супроводжувалось збільшенням вмісту H_2S і зменшенням швидкості його утилізації в серцево-судинній системі, але не впливало на активність H_2S -продукуючих ензимів [26]. На моделі пірагалол-індукованого оксидативного стресу у мишей показано, що застосування ресвератролу зменшує депримуєчий вплив активних кисневих дериватів на вміст H_2S в аорті [27].

Проведений нами кореляційний аналіз надав додаткові докази того, що ренотропні властивості всіх трьох досліджуваних поліфенолів пов'язані з впливом на систему H_2S (табл. 4).

Таблиця 4

Коефіцієнти кореляції між рівнем гідроген сульфїду в нирках і маркерами функціонального стану нирок в умовно здорових щурів на тлі введення геністеїну, ресвератролу та кверцетину

Показник	Рівень гідроген сульфїду в нирках		
	геністеїн	ресвератрол	кверцетин
Швидкість клубочкової фільтрації	0,72*	0,69*	0,66*
Білок сечі	-0,65*	-0,64*	-0,60*
Na/K коефіцієнт	0,58*	0,57*	0,57*
Реабсорбція води	0,27	0,22	0,25

Примітка. *Вірогідні ($p < 0,05$) коефіцієнти кореляції в разі $r \geq 0,56$.

З'ясувалось, що фільтраційна здатність і нормалізація електролітного статусу нирок має позитивну статистично вірогідну кореляцію з вмістом H_2S у нирках щурів на тлі дії геністеїну, а також ресвератролу та кверцетину, тоді як протеїнурія – навпаки, обернено корелює з вмістом цієї молекули. Тобто, збільшення вмісту H_2S , яке викликали природні поліфеноли, супряжене з покращанням показників роботи нирок у тварин без експериментального ураження видільних органів.

Висновок

Таким чином, усі застосовані поліфенольні сполуки мали потужний вплив на метаболізм H_2S у нирках умовно здорових щурів (стимулювали ензима-

тичну продукцію H_2S , сповільнювали неензиматичну утилізацію H_2S і збільшували його запаси в нирках). Найпотужніші нефротропні властивості та здатність стимулювати ендогенну продукцію H_2S реєструвались у біофлавоноїду геністеїну, дещо менші – у ресвератролу та найменші – у кверцетину. 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. Подальші дослідження захисної дії на нирки природних поліфенолів з точки зору їхнього впливу на систему H_2S є перспективним напрямом корекції ниркових порушень.

1. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids*. 2011. № 41 (1). P. 113–121.
2. Zaichko N. V., Melnik A. V., Yoltukhivskyy M. M. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role. *Ukr. Biochem. J.* 2014. V. 86 (5). P. 5–25.
3. Мельник А. В., Пентюк О. О. Активність ензимів синтезу гідрогенсульфіду в нирках щурів. *Український біохімічний журнал*. 2009. Т. 81, № 4. С. 12–22.
4. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. Y. H. Liu, M. Lu, L. F. Hu et al. *Antioxid. Redox. Signal*. 2012. № 17. P. 141–185.
5. Bian J. S., Olson K. R., Zhu Y. C. Hydrogen Sulfide: Biogenesis, Physiology, and Pathology. *Oxid Med Cell Longev*. 2016. № 11.
6. Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. M. Lu, Y. H. Liu, H. S. Goh et al. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2010. № 21 (6). P. 993–1002.
7. The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. H. Laggner, M. Hermann, H. Esterbauer et al. *J. Hypertens*. 2007. № 25 (10). P. 2100–2104.
8. Regulatory effect of hydrogen sulfide on vascular collagen content in spontaneously hypertensive rats. X. Zhao, L. K. Zhang, C. Y. Zhang et al. *Hypertens. Res*. 2008. № 31 (8). P. 1619–1630.
9. Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. H. E. Yoon, J. Y. Ghee, S. Piao. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2011. № 26 (3). P. 800–813.
10. Волощук Н. І. Судинні механізми формування гендерних відмінностей нефротоксичності диклофенаку у щурів. *Буковинський медичний вісник*. 2012. Т. 16, № 3 (63), Ч. 2. С. 73–77.
11. Xu C., Jin-Song B. The Role of Hydrogen Sulfide in Renal System. *Front. Pharmacol*. 2016. № 7. P. 385.
12. Йолтухівський М. М. Патогенетична роль порушень метаболізму сірковмісних амінокислот у розвитку цисплатинової нефропатії: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.32 «Медична біохімія». Луганськ, 2012. 20 с.
13. Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage. C. Francescato Della N., F. Q. Cunha, R. S. Costa et al. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2011. № 26. P. 479–488.
14. Штриголь С. Ю., Товчига О. В. Біологічно активні речовини та препарати рослинного походження з нефропротекторною активністю. *Фармаком*. 2010. № 1. С. 140–155.
15. Пат. № 93707 Україна. Фармацевтична композиція на основі кверцетину, що виявляє нефропротекторну дію та регулюючу електролітичний обмін активність при хронічній нирковій недостатності. Безпалько Л. В., Шаламай А. С., Зупанець І. А., Мойбенко О. О., та ін. № а 2008 12288; заявл. 20.10.200; опубл. 10.03.2011; Бюл. № 5. . 14 с.
16. Abdel-Raheem I. T., Abdel-Ghany A. A., Mohamed G. A. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull*. 2009. № 32 (1). P. 61–67.
17. Protective effect of resveratrol on kidney in rats with diabetic nephropathy and its effect on endoplasmic reticulum stress. D. Yuan, X. M. Liu, Z. Fang et al. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2018. № 22 (5). P. 1485–1493.

18. Palanisamy N. Beneficial effect of genistein on lowering blood pressure and kidney toxicity in fructose-fed hypertensive rats. N. Palanisamy, A. C. Venkataraman. *Br. J. Nutr.* 2013. № 109 (10). P. 1806–1812.
19. Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. V. Wiliński et al. *Folia Med. Cracov.* 2011. № 51 (1–4). P. 29–35.
20. Пат. № 75683 Україна. Спосіб визначення H₂S-продукуючої активності міокарда тварин. Заїчко Н. В., Мельник А. В., Ольховський О. С., Заїчко К. О.; № u2012 06388; заявл. 28.05.2012; опубл. 10.12.2012; Бюл. № 23. 3 с.
21. Dombkowski R., Russell M., Olson K. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. № 286. P. 678–685.
22. Пат. 87884 Україна. Спосіб визначення утилізації H₂S в органах тварин. Заїчко Н. В., Ольховський О. С., Юрченко П. О. та ін.; № u2013 10024; заявл. 12.08.2013; опубл. 25.02.2014; Бюл. № 4. 2 с.
23. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник; под общ. ред. проф. В. В. Меньшикова. Москва : Медицина, 1987. 368 с.
24. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. Москва : Высшая школа, 1980. 272 с.
25. Волощук Н. І. Оцінка протективної дії препаратів флавоноїдів та ізофлавоноїдів за умов НПЗЗ-гастропатії у щурів. *Вісник наукових досліджень.* 2010. № 1 (58). С. 80–84.
26. Мельник А. В., Волощук Н. І. Вплив біофлавоноїдів на індуквані гіпергомоцистеїнемією зміни метаболізму гідроген сульфїду в міокарді та аорті самців та самок щурів. *Світ медицини та біології.* 2017. № 1 (59). С. 129–133.
27. Hydrogen sulfide: A novel mechanism for the vascular protection by resveratrol under oxidative stress in mouse aorta. G. Yetik-Anacak, G. Sevin, O. Ozzayim et al. *Vascul. Pharmacol.* 2016. № 87. P. 76–82.

Н. І. Волощук, С. А. Конюх, О. М. Денисюк, А. В. Саєнко
Дослідження впливу геністеїну, ресвератролу та кверцетину на показники обміну гідроген сульфїду в нирках і маркери функціонального стану нирок в умовно здорових щурів

Сьогодні існує велика кількість лікарських засобів і біологічно активних сполук з ренотропною дією, серед яких є рослинні нефропротектори. Проте нез'ясованим є їхній вплив на метаболізм гідроген сульфїду (H₂S) у нирках і роль H₂S у реалізації їхнього нефропротекторного потенціалу.

Мета дослідження – вивчити вплив флавоноїдів (кверцетину, ресвератролу) та ізофлавоноїдів (геністеїну) на систему H₂S у нирках щурів без експериментальної патології та визначити його зв'язок з маркерами роботи клубочкового та канальцевого апарату видільних органів.

Досліди проведені на 40 щурах-самцях лінії Вістар, масою 300–330 г. Тваринам дослідних груп внутрішньошлунково на 30 % розчині диметилсульфоксиду вводили геністеїн (5 мг/кг), ресвератрол (50 мг/кг) і кверцетин (20 мг/кг), контрольна група отримувала еквіоб'ємну кількість розчинника. Уміст H₂S визначали спектрофотометрично за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілєндіаміном в присутності FeCl₃; активність H₂S-синтезуючих ензимів – цистатіонін-гамма-ліази (ЦГЛ), цистатіонін-бета-синтази (ЦБС), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ) оцінювали за приростом сульфід-аніона. Утилізацію екзогенного H₂S у нирках визначали за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніона в інкубаційному середовищі. Уміст креатиніну в сироватці крові та сечі визначали за методом Яффе. Кліренс креатиніну та коефіцієнт реабсорбції води розраховували за відомими формулами. Уміст натрію та калію в сироватці крові та сечі визначали спектрофотометрично. Рівень білка визначали мікробіуретовим методом. Статистичну обробку проводили в програмі «STATISTICA 6.1», вірогідними вважали відмінності в разі $p < 0,05$.

Серед досліджуваних поліфенолів геністеїн і ресвератрол у інтактних тварин достовірно збільшували ензиматичну активність H₂S у нирках: ЦГЛ – на 15,1 і 11,7 %; ЦБС – на 14,4 і 13,1 %; ЦАТ – на 17,7 і 13,3 % відповідно. Кверцетин достовірно не змінював активність ЦГЛ і ЦАТ, та підвищував активність ЦБС на 17,5 %. Також усі три сполуки достовірно сповільнювали утилізацію екзогенного H₂S і збільшували запаси ендogenous H₂S у нирках умовно здорових щурів; посилювали діурез і фільтраційну здатність нирок; сприяли збільшенню екскреції креатиніну, натрію та калію з сечею і зниженню їхнього вмісту в крові порівняно з контролем; зменшували екскрецію білка з сечею. Найвищу ефективність показав геністеїн. Проведений кореляційний аналіз надав додаткові докази того, що ренотропні властивості всіх трьох досліджуваних поліфенолів пов'язані з впливом на систему H₂S.

Таким чином, усі застосовані поліфенольні сполуки мали потужний вплив на метаболізм H₂S у нирках щурів без експериментальної патології. Найвиразніші нефротропні властивості та здатність стимулювати ендogenous продукцію H₂S реєструвались у геністеїну, дещо менші – у ресвератролу та найменші – у кверцетину. Подальші дослідження захисної дії на нирки природних поліфенолів з точки зору їхнього впливу на систему H₂S є перспективним напрямом корекції ниркових порушень.

Ключові слова: геністеїн, ресвератрол, кверцетин, гідроген сульфїд, умовно здорові щури, нирки

Н. И. Волощук, С. А. Конюх, О. Н. Денисюк, А. В. Саенко

Исследование влияния генистеина, ресвератрола и кверцетина на показатели обмена гидроген сульфида в почках и маркеры функционального состояния почек условно здоровых крыс

Сегодня существует большое количество лекарственных средств и биологически активных соединений с ренотропным действием, среди которых есть растительные нефропротекторы. Однако невыясненным является их влияние на метаболизм гидроген сульфида (H_2S) в почках и роль H_2S в реализации их нефропротекторного потенциала.

Цель исследования – изучить влияние флавоноидов (кверцетина, ресвератрола) и изофлавоноидов (генистеина) на систему H_2S в почках крыс без экспериментальной патологии и определить его связь с маркерами работы клубочкового и канальцевого аппарата выделительных органов.

Опыты проведены на 40 крысах-самцах линии Вистар, массой 300–330 г. Животным опытных групп внутривенно в 30 % растворе диметилсульфоксида вводили генистеин (5 мг/кг), ресвератрол (50 мг/кг) и кверцетин (20 мг/кг), контрольная группа получала эквивалентное количество растворителя. Содержание H_2S определяли спектрофотометрически по реакции с N,N-диметил-пара-фенилендиаминном в присутствии $FeCl_3$; активность H_2S -синтезирующих энзимов – цистатионин-гамма-лиазы (ЦГЛ), цистатионин-бета-синтазы (ЦБС), цистеинаминотрансферазы (ЦАТ) оценивали по приросту сульфид-аниона. Утилизацию экзогенного H_2S в почках определяли по скорости снижения концентрации сульфид-аниона в инкубационной среде. Содержание креатинина в сыворотке крови и моче определяли методом Яффе. Клиренс креатинина и коэффициент реабсорбции воды рассчитывали по известным формулам. Содержание натрия и калия в сыворотке крови и моче определяли спектрофотометрически. Уровень белка определяли микробиуретовым методом. Статистическую обработку проводили в программе «STATISTICA 6.1», достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Среди исследуемых полифенолов генистеин и ресвератрол у животных без патологии почек достоверно увеличивали энзиматическую активность H_2S в почках: ЦГЛ – на 15,1 и 11,7 %, ЦБС – на 14,4 и 13,1 %, ЦАТ – на 17,7 и 13,3 % соответственно. Кверцетин достоверно не изменял активность ЦГЛ и ЦАТ, и повышал активность ЦБС на 17,5 %. Также все три соединения достоверно замедляли утилизацию экзогенного H_2S и увеличивали запасы эндогенного H_2S в почках условно здоровых крыс, усиливали диурез и фильтрационную способность почек, способствовали увеличению экскреции креатинина, натрия и калия с мочой и снижению их содержания в крови по сравнению с контролем, уменьшали выведение белка с мочой. Самую высокую эффективность показал генистеин. Проведенный корреляционный анализ предоставил дополнительные доказательства того, что ренотропные свойства всех трех исследуемых полифенолов связаны с воздействием на систему гидроген сульфида.

Таким образом, все исследуемые полифенольные соединения имели мощное влияние на метаболизм H_2S в почках условно здоровых крыс. Наиболее выраженные нефротропные свойства и способность стимулировать эндогенную продукцию H_2S регистрировались у генистеина, несколько меньше – у ресвератрола и наименее выраженные – у кверцетина. Дальнейшее исследование защитного действия на почки природных полифенолов с точки зрения их влияния на систему H_2S является перспективным направлением коррекции почечных нарушений.

Ключевые слова: генистеин, ресвератрол, кверцетин, гидроген сульфид, условно здоровые крысы, почки

N. I. Voloshchuk, S. A. Konjuch, O. M. Denysiuk, A. V. Saenko

Research of the effects of genisteine, resveratrol and quercetin on the indicators of hydrogen sulphide exchange in the kidneys and the markers of the functional state of kidneys in conditionally healthy rats

Nowadays there are a large number of medicines and biologically active compounds with renotropic action, including plant nephroprotectors. However, their effect on the metabolism of H_2S in the kidneys and the role of H_2S in implementation of their nephroprotective potential is unclear.

The purpose of the study was to research the effect of flavonoids (quercetin, resveratrol) and isoflavones (genistein) on the H_2S system in the kidneys of rats without model pathology and to determine its connection with the functional markers of the glomerular and tubular apparatus of the excretory organs.

Experiments were carried out on 40 Wistar rats with weight of 300–330 g. Animals of the experimental groups received intragastrically genistein (5 mg/kg), resveratrol (50 mg/kg) and quercetin (20 mg/kg) in 30 % DMSO, the control group received the equivalent amount of solvents. The content of H_2S was determined spectrophotometrically by reaction with N, N-dimethyl-para-phenylenediamine in the presence of $FeCl_3$; the activity of H_2S -synthesizing enzymes – cistationin- γ -lyase (CSE), cistationin- β -synthase (CBS), cysteinaminotransferase (CAT) was estimated by an increase in the sulfide anion content. The utilization of exogenous H_2S in the kidneys was determined by the rate of reduction of the sulfide anion concentration in the incubation medium. The content of creatinine in blood serum and urine was determined by the Jaffe method. Creatinine clearance and water reabsorption factor were calculated

using known formulas. The content of sodium and potassium in blood serum and urine was determined spectrophotometrically. The level of protein was determined by the microbiuretic method. Statistical processing was carried out in the program STATISTICA 6.1, significant differences considered at $p < 0,05$.

Among the investigated polyphenols, genistein and resveratrol in conditionally healthy animals significantly increased the enzymatic activity of H_2S in the kidneys: CSE – by 15,1 and 11,7 %; CBS – by 14,4 % and 13,1 %; CAT – by 17,7 % and 13,3 % respectively. Quercetin did not significantly alter the activity of CSE and CAT, and increased the activity of CBS by 17,5 %. Also, all three compounds reliably slowed down the utilization of exogenous H_2S and increased endogenous H_2S reserves in the kidneys of conditionally healthy rats; increased diuresis and filtration capacity of the kidneys; contributed to an increase in the excretion of creatinine, sodium and potassium in the urine and a decrease in their blood levels relative to control; reduced protein excretion in urine against control rats. The highest efficiency was shown by genistein. The correlation analysis has provided additional evidence that the renotropic properties of all three investigated polyphenols are related to the effect on the hydrogen sulfide system.

Thus, all of the applied polyphenolic compounds had a powerful effect on the H_2S metabolism in the kidneys of conditionally healthy rats. The most distinct nephrotropic properties and the ability to stimulate endogenous H_2S products were recorded in genistein, less in resveratrol and the least in quercetin. Further studies of protective action on the kidneys of natural polyphenols in terms of their effect on the system of hydrogen sulfide is a promising direction of renal disorders correction.

Key words: genistein, resveratrol, quercetin, hydrogen sulfide, rats, kidneys

Надійшла: 23 квітня 2019 р.

Прийнята до друку: 23 травня 2019 р.

Контактна особа: Волощук Наталія Іванівна, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, буд. 56, вул. Пирогова, м. Вінниця, 21018. Тел.: + 38 0 67 307 71 34.
Електронна пошта: voloshchuknatali@gmail.com