

ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ
«БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ
«БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ФЕРЕНЧУК ЄЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.12:547.466:616-008.9:616.61

ДИСЕРТАЦІЯ
СТАН ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ТА СИСТЕМИ ОБМІНУ
ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
НЕФРОПАТІЇ І ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Науковий керівник – Геруш Ігор Васильович, кандидат медичних наук,
доцент, проректор з науково-педагогічної роботи

Чернівці – 2020

АНОТАЦІЯ

Ференчук Є. О. Стан енергетичного метаболізму та системи обміну гідроген сульфідом за умов експериментальної нефропатії і застосування глутатіону. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (03.00.04 – біохімія) в галузі знань 09 – Біологія. – Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню показників стану енергетичного метаболізму, оксидантно-антиоксидантної системи та обміну гідроген сульфідом в печінці та крові щурів за умов фізіологічної норми, нефропатії та впливу екзогенного глутатіону.

Швидкість прогресування ниркової патології обґрунтовує пошук антиоксидантів із цитопротекторною дією – інтегральним захисним впливом на клітини, що дозволить сповільнити темпи прогресування нефропатій та супутніх захворювань, зменшити вплив нефротоксичних факторів на інші органи. Тому останні десятиліття активно вивчаються властивості різноманітних сполук із функцією попередження та корекції порушень функцій нирок та печінки, однак окремі дані щодо ролі різних природних та синтезованих антиоксидантів є фрагментарними та потребують подальших досліджень.

Глутатіон у ролі цитопротектора має ряд переваг – природні метаболічні шляхи, нетоксичність. Сполука характеризується повною абсорбцією, володіє детоксикаційними, антиоксидантними та протизапальними властивостями, здатна стимулювати регенерацію гепатоцитів.

Метою роботи було з'ясування стану енергозабезпечення в мітохондріях гепатоцитів, особливостей утворення гідроген сульфідом та

стану оксидантно-антиоксидантної системи у крові та печінці щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону.

Матеріал і методи дослідження. Експериментальні дослідження проведено на 131 нелінійному білому статевозрілому щурі-самці масою 160-180 г. Нефропатію моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення фолієвої кислоти (Sigma-Aldrich) у дозі 250 мг/кг. Глутатіон (Sigma-Aldrich) вводили інтрагастрально упродовж трьох та семи днів у дозі 100 мг/кг.

Вивчали показники енергозабезпечення гепатоцитів, оксидантно-антиоксидантної системи, системи обміну гідроген сульфід у крові та печінці щурів за умов норми, експериментальної нефропатії та введення глутатіону.

У крові визначали вміст активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активних продуктів), активність каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази (GPx), аланіламінотрансферази, γ -глутамілтранспептидази, вміст креатиніну, сечовини, альбуміну, окисно модифікованих протеїнів (ОМП), церулоплазміну (ЦП), SH-груп, гідроген сульфід у постмітохондріальному супернатанті гомогенатів тканин печінки визначали вміст ТБК-активних продуктів, глутатіону, активність антиоксидантних ензимів глутатіон-S-трансферази (GST) та глутатіонпероксидази (GPx), H_2S -продукуючу активність ензимів цистатіонін- γ -ліази (CSE), цистатіонін- β -синтази (CBS), цистеїнамінотрансферази (CAT), концентрацію та продукцію H_2S . У мітохондріях гепатоцитів визначали вміст SH-груп, активності NADH-дегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази, H^+ -АТФ-ази.

Результати і висновки. У кірковій речовині нирок за умов нефропатії мікроскопічно виявлено відкладання кристалів фолієвої кислоти всередині ниркових каналців. У проксимальному відділі нефрону спостерігалось пошкодження епітелію із подальшою проліферацією тубуло-

інтерстиціального розпаду на усі шари нирок, що призводило до зниження фільтруючої здатності нирок.

Встановлено підвищення рівня креатиніну на 59% ($p < 0,05$) на третій день експерименту, та на 30% ($p < 0,05$) – на сьомий експериментальний день порівняно з показниками контрольної групи, що свідчить про погіршення фільтраційної функції і здатності нирок до виведення з кровотоку продуктів азотного обміну. За умов нефропатії у крові тварин спостерігали збільшення вмісту сечовини порівняно з контрольною групою: на 27% ($p < 0,05$) – на третій день експерименту, на 15% ($p < 0,05$) – на сьомий. Встановлено інтоксикацію організму під впливом високої концентрації фолієвої кислоти, про що свідчило порушення протеїнсинтезувальної функції печінки, зростання активності γ -глутамілтранспептидази та аланіламініотрансферази порівняно з групою контролю.

Нами виявлено, що рівень ОМП₃₇₀ за умов нефропатії був вищим на 36% ($p < 0,01$), а ОМП₄₃₀ – на 14,6% ($p < 0,01$) на 3-й день експерименту порівняно з контрольною групою тварин. Рівень церулоплазміну у тварин з нефропатією порівняно з групою контролю збільшувався на 28% ($p < 0,01$) та 43% ($p < 0,01$) протягом 3 та 7 днів, а рівень SH-груп порівняно з показниками контрольної групи у крові щурів з нефропатією був нижчим на 26% ($p < 0,01$) на 3-й день експерименту. Виявлено, що інтенсивність утворення ТБК-активних продуктів збільшується на 21% ($p < 0,01$) на 3-й день та на 22,5% ($p < 0,01$) на 7-й день експерименту порівняно з показниками контролю, що вказує на оксидативний стрес за умов нефропатії.

Було виявлено зниження активності каталази на 25% ($p < 0,01$) на 3-й та 7-й дні експерименту, GPx – на 40% ($p < 0,05$) на 3 день та 20% ($p < 0,05$) – 7 день експерименту порівняно з групою контрольних тварин. Рівень H₂S у крові тварин з нефропатією був нижчим на 35,5% ($p < 0,01$) на 3-й день та на 25,7% ($p < 0,01$) – 7 добу експерименту порівняно з групою контролю. Ми з'ясували, що глутатіон збільшує рівень газотрансміттера на 14,3% ($p < 0,05$) у

плазмі крові щурів на 3-й та на 11% ($p < 0,05$) на 7-й день експериментального періоду порівняно з показниками тварин, яким антиоксидант не вводили. Семиденне введення глутатіону прирівнювало показники креатиніну, сечовини, ОМП₃₇₀, рівень ТБК-ап та SH-груп, а також активність GPx експериментальних тварин до показників, отриманих у групі контрольних щурів, що свідчить про відновлення видільної функції нирок.

Встановлено тісний взаємозв'язок між оксидант-антиоксидантною системою крові та розвитком нефропатії. Застосування глутатіону на початковому етапі розвитку нефропатії регулює метаболізм через GSH-залежні шляхи, проявляючи антиоксидантні та детоксикаційні функції.

З'ясовано, що нефропротекторні властивості глутатіон проявляє за умов його 7-денного застосування. Це підтверджується зниженням проявів нефротичного синдрому та поліпшенням функціональних показників нирок, що, очевидно, відбувається шляхом відновлення структури тканин нирки, а саме: клубочкового апарату, епітелію канальців нирок, їх реабсорбційної та фільтраційної здатності.

Ниркові дисфункції супроводжуються метаболічними порушеннями і токсичним ураженням організму, призводять до оксидативного стресу у клітинах, тому було проведено дослідження системи енергозабезпечення мітохондрій та стану антиоксидантної системи печінки як головного детоксикаційного органу.

Функціонування мітохондрій безпосередньо пов'язане з підтриманням клітинного редокс-балансу та енергетичного обміну. У мітохондріях гепатоцитів нами було виявлено зниження вмісту SH-груп на 31% ($p < 0,05$) та 33% ($p < 0,05$) – 3-й та 7-й експериментальний день відповідно, що вказує на прогресування оксидативного стресу в гепатоцитах.

Уперше у дисертаційній роботі на основі теоретичного підходу та експериментального дослідження розкрито особливості системи енергозабезпечення печінки щурів за умов нефропатії та застосування

глутатіону. Активності NADH-дегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази та H^+ -АТФази знижувалась за умов патології, що свідчило про інтенсифікацію вільнорадикальних процесів. Глутатіон захищає мітохондріальну мембрану від окислювального пошкодження – введення антиоксиданта збільшувало активності сукцинатдегідрогенази на 31% ($p < 0,05$) та H^+ -АТФази на 20% ($p < 0,05$) на 3-й експериментальний день, і на 17,7% ($p < 0,05$) та 26,7% ($p < 0,05$) відповідно – на 7 добу експерименту порівняно з групами тварин з нефропатією.

У експериментальних групах тварин за умов нефропатії посилювалися процеси вільнорадикальних ушкоджень молекул у печінці: зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 17% ($p < 0,01$) на 3-й день та на 27% ($p < 0,05$) на 7-й день експерименту, зниження глутатіону на 33% ($p < 0,01$) на 3-й та на 23% ($p < 0,05$) – на 7-й день експерименту, зниження активностей GPx – на 11,6% ($p < 0,05$) на 3-й та 36,5% ($p < 0,05$) – 7-й день дослідження та GST – на 22,5% ($p < 0,05$) на 3-й та 9% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту порівняно з показниками контрольної групи.

З'ясовано, що за умов динамічної рівноваги між окиснювальними процесами і антиоксидантним захистом, трьохразове уведення глутатіону не вплинуло на абсолютні значення активності ензимів антиоксидантного захисту системи глутатіону. Зокрема, наближення концентрації глутатіону та активності глутатіон-S-трансферази до значень контролю відбулася тільки при семиденному застосуванні.

За умов нефропатії ми виявили зниження активностей CSE на 38,98% ($p < 0,01$) – 3-й та 31% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту, CBS – на 33,73% ($p < 0,01$) – 3-й та 32,12% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту, CAT – на 26,76% ($p < 0,01$) – 3-й та 32,7% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту порівняно з показниками контролю, що, в свою чергу, зумовило зниження концентрації (на 37,92% ($p < 0,01$) – 3-й та 45,3% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту) та продукції гідроген сульфід (на 34,84% ($p < 0,01$) – 3-й та 27,8% ($p < 0,01$) – 7-й

день експерименту) за умов нефропатії порівняно з контрольною групою тварин.

Вперше показано зростання концентрації гідроген сульфїду за умов введення глутатїону. Спостерїгалося збїльшення концентрації H_2S порівняно з групами тварин, яким не вводили глутатїон, на 48,4% ($p < 0,01$) і 43% ($p < 0,01$), а продукції – на 36,3% ($p < 0,01$) і 36% ($p < 0,01$) завдяки збїльшенню гідроген сульфїд-продукуючої активності CBS – на 33,5% ($p < 0,01$) на 3-й і 27% ($p < 0,01$) та CAT – на 49,3% ($p < 0,01$) і 49,7% ($p < 0,01$) на 3-й та 7-й день дослідження відповідно.

Отримано нові наукові дані про зв'язок показників обміну гідроген сульфїду з системою глутатїону: антиоксидант підвищував активність ензимів синтезу сірководню та викликав зростання вмісту та продукції H_2S завдяки включенню трипептиду як джерела цистеїну в процеси синтезу гідроген сульфїду.

Отже, за умов нефропатії, викликанї високою дозою фолїєвої кислоти, спостерїгалися метаболїчні змїни: зниження рївня глутатїону та продукції гідроген сульфїду, порушення роботи системи енергетичного забезпечення гепатоцитів, посилення окислювального стресу, що зумовлює локальне та вїддалене травмування органів, тому для гострого пошкодження нирок характернї порушення функції печїнки та обміну речовин.

Наше дослідження виявило позитивний вплив екзогенного глутатїону на енергетичний обмін та сірководневу систему тварин в умовах експериментальної нефропатії. В роботї встановлено, що оптимальним є семиденне внутрїшньошлункове введення глутатїону для зменшення вмісту продуктів вільнорадикального окиснення лїпїдів і протеїнів, корекції активностей енергопродукуючих та антиоксидантних ензимів, регуляції обміну гідроген сульфїду за умов експериментальної нефропатії.

Зробленї висновки допоможуть розширити знання про стан оксидантно-антиоксидантної системи, енергозабезпечення мїтохондрїй

гепатоцитів та особливості обміну гідроген сульфідом в умовах розвитку нефропатії та застосування глутатіону, і можуть бути теоретичною основою для подальшого вивчення можливостей застосування глутатіону з нефро- та гепатопротекторною метою за умов захворювань нирок.

Ключові слова: нефропатія, глутатіон, система енергозабезпечення, антиоксидантна система, оксидативний стрес, гідроген сульфід, мітохондрії.

SUMMARY

Ferenchuk Ye. O. State of energy metabolism and hydrogen sulfide metabolism system under conditions of experimental nephropathy and influence of glutathione. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for obtaining the Doctor of Philosophy degree by field of study 09 – Biology (Program subject area 091 – Biology (03.00.04 – biochemistry)). – Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi, 2020.

Kidney disease often leads to the general state of oxidative stress and can co-exist with different liver diseases, or stimulate their development. The qualifying paper studies indicators of the state of energy metabolism, oxidative-antioxidant system, and hydrogen sulfide metabolism in the liver and blood of rats under conditions of the physiological norm, nephropathy, and influence of exogenous glutathione.

The study aimed to determine the energy system in the mitochondria of hepatocytes, the formation of hydrogen sulfide, and the state of the oxidative-antioxidant system in the blood and liver of rats by experimental nephropathy and influence of glutathione.

Material and methods. The experiment was carried out on 131 male albino rats with the bodyweight of 0,16–0,18 kg. Experimental nephropathy was modeled by injection of a single intraperitoneal dose of folic acid (250 mg/kg, Sigma-

Aldrich). Glutathione (Sigma-Aldrich) was introduced daily (100 mg/kg) by the intragastric way for 3 and 7 days following the injection of folic acid.

The parameters of the energy system of hepatocytes, oxidative-antioxidant system, and hydrogen sulfide metabolism system in the blood and liver of rats under normal conditions, experimental nephropathy, and glutathione administration were studied.

The content of active products of thiobarbituric acid (TBA-active products), the level of oxidative modification of proteins (OMP), albumin, creatinine, ceruloplasmin, SH-groups, hydrogen sulfide, activities of catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase (GPx), alaninaminotransferase, γ -glutamyltranspeptidase in the blood were determined. The content of TBA-active products, glutathione, the activity of glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, H₂S-producing activity of cystathionine- γ -lyase (CSE), cystathionine- β -synthase (CBS), cysteine aminotransferase (CAT) in the liver were determined. In the mitochondria of hepatocytes the content of SH-groups, the activities of NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, H⁺-ATP-ase were determined.

Results and Discussion. To confirm the pathology, the kidneys were examined by morphometric analysis. Thus we determined that the rapid appearance of folic acid crystals inside the renal tubules caused alteration of the epithelium of the proximal tubule of the kidney, inflammatory cell infiltration and caused necrosis and the cortical scarring. Damage of the epithelium of the proximal tubules with the subsequent proliferation of tubulointerstitial disintegration on the renal cortex, renal medulla, and renal papillae led to a decrease of the filtering capacity of the kidneys.

In the group of animals with nephropathy on 3rd day of the experiment the creatinine concentration increased by 59% ($p < 0,05$) and by 30% ($p < 0,05$) on 7th day of the study as compared to the control. Seven-day glutathione influence equates the creatinine values of experimental animals with those of the intact

group. Under conditions of nephropathy the urea content increase by 27% ($p < 0,05$) on 3rd day and by 15% ($p < 0,05$) – 7th day of the experiment compared to the control group was observed. The general intoxication of the body under the influence of high concentrations of folic acid by the decrease of liver protein-synthesizing function, increased activity of γ -glutamyltranspeptidase and alaninaminotransferase compared to animals of the control group was evidenced.

Glutathione shows nephroprotective properties confirmed by a decrease in the manifestations of nephrotic syndrome and improvement of the functional parameters of the kidneys.

The close interrelation between the oxidant-antioxidant blood system and the development of nephropathy has been established. The degree of oxidative modification of proteins was evaluated in the blood by the level of aldehyde and ketone derivatives of neutral (OMP₃₇₀) and basic (OMP₄₃₀) composition. The level of OMP₃₇₀ by nephropathy was higher 36% ($p < 0,01$) and OMP₄₃₀ – 14,6% ($p < 0,01$) on 3rd day of the experiment compared to control rats. Ceruloplasmin levels in animals with nephropathy increased by 28% ($p < 0,01$) and 43% ($p < 0,01$) on 3 and 7 days compared to control rats. The level of SH-groups in the blood of rats with nephropathy was lower by 26% ($p < 0,01$) on 3rd day compared to control rats. Catalase activity decreases by 25% ($p < 0,01$) on both days compared to group of control. There was the decreased level of GPx activity in the blood by 40% ($p < 0,05$) on 3rd day and by 20% ($p < 0,05$) – 7th day compared to control. The level of H₂S was lower by 35,5% ($p < 0,01$) on the 3rd day and by 25,7% ($p < 0,01$) on 7th day of the experiment compared to control. The glutathione increased the level of gasotransmitter by 14,3% ($p < 0,05$) in blood plasma of rats on 3 day and by 11% ($p < 0,05$) on 7 day of the experimental period. The introduction of glutathione during 7 days equated the levels of creatinine, urea, OMP₃₇₀, TBA-active products, SH-group and activity of GPx of experimental animals to the values of the control group.

Mitochondrial oxidative damage and disorders of energy metabolism contribute to a wide range of pathologies and disease progression. The activities of NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase and H⁺-ATP-ase activity and the content of the free SH-groups in the liver under conditions of nephropathy were shown to be decreased, evidently due to the intensification of the free radical processes. The result of the work demonstrates a positive effect of 7-days glutathione introduction on the content of SH-groups. The introduction of the antioxidant increased the activity of succinate dehydrogenase by 31% (p<0,05) and H⁺-ATP-ase by 20% (p<0,05) – 3rd experimental day and by 17,7% (p<0,05) and 26,7% (p<0,05) – 7th day, compared to groups of animals with nephropathy. Changes by glutathione influence may be viewed as a signal for rearrangement of mitochondrial energy generation. In our opinion this is due to the fact, that glutathione has antioxidant properties and decreases reactive oxygen species in mitochondria thereby promoting stabilization of the energy metabolism of mitochondria.

In experimental groups of animals under conditions of nephropathy, the processes of free radical damage of molecules in the liver intensified: increase in the content of TBA-active products by 17% (p<0,01) on day 3rd and 27% (p<0,05) on 7th day of the experiment, decrease the level of glutathione by 33% (p<0,01) on 3rd day and by 23% (p<0,05) – on the 7th day of the experiment, decrease activities of GPx and glutathione-S-transferase.

Under conditions of nephropathy, we found the decrease of CSE activity by 38,98% (p<0,01) – on the 3rd and 31% (p<0,01) – on the 7th day of the experiment, CBS – by 33,73% (p<0,01) – 3rd and 32,12% (p<0,01) – 7th day, CAT – by 26,76% (p<0,01) – 3rd and 32,7 % (p<0,01) – the 7th day of the experiment compared to the control. That causes the decrease of concentration (by 37,92% (p<0,01) on the 3rd and by 45,3% (p <0,01) – 7th day of the experiment) and production of H₂S (by 34,84% (p<0,01) – 3rd and 27,8% (p<0,01) – 7th day of the experiment) compared to the control group of animals.

For the first time, an increase of the concentration of hydrogen sulfide under the conditions of glutathione introduction was shown. There was an increase of concentration of H₂S by 48,4% (p<0,01) on the 3rd and 43% (p<0,01) – the 7th day, and production – by 36,3% (p <0,01) on the 3rd and 36% (p <0,01) – 7th day of the study compared to groups of animals with nephropathy due to the increase of H₂S-producing activity of CBS – by 33.5% (p<0,01) on the 3rd and 27% (p <0,01) and CAT – by 49,3% (p<0,01) and 49,7% (p<0,01) on the 3rd and 7th day of the study respectively. As reasons for this effect, antioxidant properties of glutathione and the possibility of including tripeptide as a source of cysteine in the synthesis of hydrogen sulfide are considered.

Decreased antioxidant defence and overproduction of reactive oxygen species lead to oxidative stress and energy decrease – one of the key mechanisms of distant organ injury by kidney disease. Therefore, for acute kidney injury are characteristic impaired liver function and metabolism. Our study confirms the positive effects of exogenous glutathione on the energy metabolism and hydrogen sulfide system of animals under conditions of experimental nephropathy.

This study amplifies the theoretical data on the mechanisms of antioxidant and hepatoprotective action of glutathione and its ability to regulate ATP and hydrogen sulfide formation. The received results regarding the effect of glutathione on the state of energy metabolism, the oxidative-antioxidant system, and the hydrogen sulfide exchange system by kidney disease can be the theoretical basis for further study of the possibility to use glutathione for nephro- and hepatoprotective effects by kidney disease.

Keywords: nephropathy, glutathione, energy system, antioxidant system, oxidative stress, hydrogen sulfide, mitochondria.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Ференчук ЄО. Вплив глутатіону на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії.

Мед. і кл. хімія. 2018; 3: 27-32. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i3.9552

2. Ferenchuk YeO, Gerush IV. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.019>

3. Gerush IV, Ferenchuk YeO. Hydrogen sulfide and mitochondria Biopolym. Cell. 2019; 35(1): 3-15. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000998>

4. Ferenchuk EO, Gerush IV. Effect of 7-day introduction of glutathione on activities of H₂S-producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. Medical and Clinical Chemistry. 2019; (1): 5-9. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v0.i1.9992

5. Ференчук Є, Геруш ІВ. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфід у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. Укр. біофарм. журнал. 2018; 1 (58): 18-21. doi: <https://doi.org/10.24959/ubphj.19.200>

6. Ferenchuk Ye, Gerush I, Grigorieva N. Effect of glutathione on oxidant-antioxidant system and the content of hydrogen sulphide in the blood by experimental nephropathy. PharmacologyOnLine. 2020 Apr 30; 1: 113-120.

7. Ференчук ЕА, Коляник ІО. Влияние трехкратного введения экзогенного глутатиона на активность ферментов энергетического обмена в условиях нефропатии. XX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей; Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье; 22 апреля 2017, Санкт-Петербург; Санкт-Петербург: СПбГУ; 2017. с. 580.

8. Gerush I, Ferenchuk Ye. Effects of 3 days glutathione introduction on the activities of antioxidant enzymes in the blood of rats with nephropathy. 8th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry; 18-20 September 2017, Poland; Lublin; 2017. p. 47.

9. Геруш И, Ференчук Е, Коляник И. Влияние глутатиона на изменение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов в условиях экспериментальной нефропатии. Материалы 72-й научно-практической конференции студентов-медиков и молодых ученых с международным участием; Актуальные проблемы современной медицины; Самарканд, 11-12 мая, 2018; 2018. с. 313.

10. Ferenchuk YeO, Gerush IV, Kolianyk IO, Bevzo VV, Dikal MV. Effect of 3 days glutathione introduction on energy metabolism in the liver mitochondria of rats with nephropathy. Abstracts of the XI Parnas Conference – Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3–5 September 2018; Ukr.Biochem.J; 90; 2018. p. 97.

11. Ferenchuk Ye. Glutathione influence on biochemical indices of serum in experimental nephropathy. Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11, 13, 18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с. 111.

12. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Дікал МВ, Ференчук ЄО, Чернюх ОГ. Спосіб корекції біохімічних показників сироватки крові при експериментальній нефропатії у щурів. Пат. № 9668/ЗУ/20, Україна, МПК (2020.01) А61В 5/00 А61К 31/00 А61Р 13/00 G09В 23/28. № u 2019 11811; заявл. 11.12.2019; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ НЕФРОПАТІЙ. СИНТЕЗ І ВЛАСТИВОСТІ ГЛУТАТІОНУ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ЗА УМОВ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ НОРМИ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЯХ (огляд літератури)	26
1.1. Механізм виникнення нефропатії.....	26
1.2. Види експериментальних нефропатій.....	28
1.3. Антиоксидантні властивості та механізми дії глутатіону.....	31
1.4. Мітохондрія і глутатіон.....	39
1.5. Гідроген сульфід: синтез та біохімічна роль.....	43
Висновки до розділу 1.....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2.1. Модель дисертаційного дослідження.....	50
2.2. Визначення основних показників протеїнового обміну в крові.....	52
2.3. Визначення стану оксидантно-антиоксидантної системи у крові та печінці.....	53
2.4. Дослідження стану енергетичного метаболізму у мітохондріальній фракції гепатоцитів.....	58
2.5. Визначення показників системи обміну гідроген сульфідом.....	60
РОЗДІЛ 3. СТАН ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА ОСНОВНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРОТЕЇНОВОГО ОБМІНУ В КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ НЕФРОПАТІЇ І ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ....	64
3.1. Біохімічні показники сироватки крові за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону.....	64
3.2. Зміни оксидантно-антиоксидантного стану в крові за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону.....	68
Висновки до розділу 3.....	79

РОЗДІЛ 4. СТАН СИСТЕМИ ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ НЕФРОПАТІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ.....	82
4.1. Ензиматична активність компонентів дихального ланцюга гепатоцитів за умов нефропатії та застосування глутатіону.....	82
4.2. Антиоксидантна система печінки за умов ушкодження нирок	92
Висновки до розділу 4.....	100
РОЗДІЛ 5. СТАН СИСТЕМИ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ЗА УМОВ НЕФРОПАТІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ.....	102
5.1. Зміни у системі утворення гідроген сульфід у печінці за умов нефропатії та введення глутатіону.....	102
5.2. Взаємозв'язок глутатіону та системи обміну гідроген сульфід у.....	107
Висновки до розділу 5.....	108
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	110
ВИСНОВКИ.....	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	130
ДОДАТКИ.....	151

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

CAT – цистеїнамінотрансфераза

CBS – цистатіонін- β -синтаза

CSE – цистатіонін- γ -ліаза

GSH – відновлений глутатіон

H₂O₂ – гідроген пероксид

H₂S – гідроген сульфід

NADPH – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений

GST – глутатіон-S-трансфераза

АФО – активні форми кисню

GPx – глутатіонпероксидаза

КАТ – каталаза

ОМП – окисна модифікація протеїнів

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

ТБК – тіобарбітурова кислота

ТБК-ап – активні продукти тіобарбітурової кислоти

SOD – супероксиддисмутаза

ФК – фолієва кислота

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Захворювання нирок – одна з найпоширеніших проблем сучасної медицини. Сьогодні нефропатія вражає 850 мільйонів людей у всьому світі, і, за прогнозами вчених, захворюваність прогресуватиме. Принципово важливо проводити ранню діагностику нефропатій та запобігати їх ускладненням, адже метаболічні порушення, що спостерігаються у процесі розвитку захворювань нирок, часто призводять до генерації вільних радикалів, які пошкоджують ліпідні та протеїнові компоненти клітин, сприяють утворенню і накопиченню ліпопероксидних сполук, посилюють процеси дестабілізації клітинних мембран, призводять до супутніх захворювань та ускладнення хвороб [1-2].

Вивчення специфіки адаптації організму, дослідження впливу різних сполук на адаптаційні процеси в організмі дозволяє ряд експериментальних моделей нефропатій, перебіг яких максимально відтворює характерні симптоми захворювання, що полегшує дослідження можливих методів лікування та корекції патологічних станів [3].

Експериментальна модель нефропатії, викликана ін'єкцією високої дози фолієвої кислоти (ФК), дозволяє досліджувати механізми пошкодження нефротичних каналів та поступовий фіброз тканини нирок, оскільки повторює послідовність патологічних (набряк ниркових епітеліальних клітин, атрофія ниркових каналців, апоптоз) та адаптивних реакцій, які спостерігаються у людей за умов гострої ниркової недостатності [4].

Схема лікування метастазуючого раку шлунково-кишкового тракту містить високі дози фолієвої кислоти, що збільшило кількість нефропатій: при обстеженні нирок хворих, які проходили протипухлинне лікування, виявляли ознаки пошкодження каналців нирок, схожі з ушкодженнями при експериментальній ФК-нефропатії тварин [5].

Індукована ФК патологія нирок, за попередніми дослідженнями [6, 7], характеризується дегенерацією епітелію каналців, інтерстиціальною

інфільтрацією імуніцитів та зростанням факторів запалення уже на ранніх етапах патології. Під час порушення функціональної здатності нирок відбувається надлишкове виділення активних форм кисню, підвищене споживання антиоксидантів та інактивація ензимів антиоксидантного захисту, в результаті чого природні захисні механізми не в змозі захистити організм від окислювального стресу, буде ушкоджувати віддалені органи організму, викликаючи супутні захворювання [8].

Часто за умов пригнічення функції нирок ушкоджується печінка, головний детокс-орган організму, але біохімічні зміни та метаболічні перебудови в гепатоцитах за умов нефропатії досі не вивчені, а вибір гепато- та нефропротекторів залишається відкритим питанням.

Увагу науковців дедалі більше привертають сполуки природного походження з різносторонніми механізмами захисної дії та високим ступенем безпечності застосування. Глутатіон, тіол-вмісний трипептид, є головним ендogenous неензиматичним антиоксидантом, який володіє цитопротекторними та детоксикаційними властивостями. Найбільш інтенсивно захоплюють та використовують глутатіон (зокрема прийнятий перорально) різні епітеліальні клітини – ентероцити, ендотеліоцити, альвеолярні клітини легень, епітелій проксимальних ниркових каналців, тому є обґрунтованою ідея застосування глутатіону при захворюваннях органів, які беруть активну участь у процесах детоксикації: нирок, печінки, легень, а також за умов системних захворювань, які супроводжуються дисфункцією ендотелію та оксидативним стресом – цукровий діабет, атеросклероз, нефропатії [9, 10].

Високий вміст природного глутатіону має печінка, але за умов гострої ниркової недостатності функція печінки та обмін речовин пошкоджуються, тому є доцільним дослідження впливу екзогенного глутатіону на метаболізм тварин за умов експериментальної нефропатії.

Ключову функцію у координації клітинних функцій виконують мітохондрії, але рівень активних форм кисню в органелах при багатьох патофізіологічних станах збільшується. Оскільки мітохондрії виконують роль первинної мішені для токсинів, порушення функціонування дихального ланцюга може бути початковим етапом прояву гепато- та нефротоксичності,

Мітохондріальний глутатіон є важливою складовою антиоксидантної системи енергетичних станцій клітини, він попереджує та корегує метаболічні пошкодження, використовується для захисту від фізіологічного та патологічного оксидативного стресу, але залишається недослідженим вплив глутатіону на активність ензимів енергетичного метаболізму в гепатоцитах за умов нефропатії.

В останні роки актуальним є вивчення функцій та властивостей гідроген сульфід, який у межах фізіологічних концентрацій здатний проявляти антиоксидантні та протизапальні властивості, має регулюючий вплив на видільну систему організму [11, 12]. Але, незважаючи на те, що є безліч наукових робіт, присвячених дослідженню властивостей гідроген сульфід, біохімічні та молекулярні механізми участі антиоксидантів у метаболізмі гідроген сульфід при нефропатії, залишаються невідомими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планових науково-дослідних робіт кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці) «Стрес-індуковані морфофункціональні та біохімічні зміни структур хроноперіодичної і гепаторенальної систем у ссавців» (№ державної реєстрації 0114U002472) та «Морфофункціональне і біохімічне обґрунтування дисфункцій нейросекреторних структур головного мозку й ендокринних залоз та гепаторенальної системи щурів при експериментальній патології, у віковому аспекті та шляхи її корекції» (№ державної реєстрації 0119U101346).

Авторка є співвиконавицею теми та виконала декілька розділів: стан оксидантно-антиоксидантної та енергопродукуючої систем печінки за умов нефропатії і введення глутатіону; стан системи утворення гідроген сульфід у печінці за умов нефропатії і введення глутатіону; стан оксидантно-антиоксидантної системи та рівень гідроген сульфід у крові за умов нефропатії і введення глутатіону.

Тему дисертації затверджено Вченою Радою Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», протокол № 4 від 27 жовтня 2016 року.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясування стану енергозабезпечення в мітохондріях гепатоцитів, особливостей утворення гідроген сульфід та стану оксидантно-антиоксидантної системи у крові та печінці щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону.

Для досягнення мети було поставлено наступні **завдання**:

1. Дослідити стан оксидантно-антиоксидантної системи та основні показники протеїнового обміну в крові щурів за умов нефропатії та застосування глутатіону.
2. Вивчити стан системи енергозабезпечення гепатоцитів щурів за активністю ензимів дихального ланцюга (NADH-дегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази, H^+ -АТФ-ази) за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону.
3. Оцінити стан оксидантно-антиоксидантної системи печінки (вміст ТБК-активних продуктів, концентрація глутатіону, активності глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази) щурів за умов нефропатії та застосування глутатіону.
4. Визначити H_2S -продукуючу активність ензимів (цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін- β -синтази, цистеїнамінотрансферази), вміст і продукцію

гідроген сульфід у печінці тварин за умов норми та експериментальної нефропатії.

5. З'ясувати можливі біохімічні механізми впливу глутатіону на досліджувані показники системи обміну гідроген сульфід за умов експериментальної нефропатії.

Об'єкт дослідження: метаболічні процеси в крові і печінці щурів при експериментальній нефропатії та за умов застосування глутатіону.

Предмет дослідження: активність ензимів енергетичного обміну, особливості синтезу H_2S , окремі ланки антиоксидантного захисту у крові та печінці щурів із нефропатією та за умов впливу глутатіону.

Методи дослідження. У роботі використано біохімічні (центрифугування, спектрофотометричні, фотоколориметричні для визначення активностей ензимів стану антиоксидантної системи, системи енергозабезпечення, концентрації та продукції гідроген сульфід, ензимів його синтезу, вмісту окисномодифікованих протеїнів, активних продуктів тіобарбітурової кислоти, відновленого глутатіону в печінці; вмісту окисномодифікованих протеїнів, концентрації активних продуктів тіобарбітурової кислоти, креатиніну, сечовини, альбумінів, протеїну, SH-груп, гідроген сульфід, активностей γ -глутамілтранспептидази, аланінамінотрансферази та ензимів антиоксидантної системи у крові), морфологічні та статистичні методи дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше проведено комплексне дослідження оксидантно-антиоксидантного стану, системи енергозабезпечення гепатоцитів, вмісту гідроген сульфід й ензимів його утворення за умов експериментальної нефропатії, індукованої введенням фолієвої кислоти, проаналізовано вплив глутатіону на виявлені зміни.

Уперше у дисертаційній роботі на основі теоретичного підходу та експериментального дослідження розкриті особливості системи

енергозабезпечення печінки щурів за умов нефропатії та застосування глутатіону.

Отримано нові наукові дані про зв'язок показників обміну гідроген сульфїду з системою глутатіону, яка відіграє важливу роль у інактивації активних форм оксигену та підтримці енергосинтезуючої системи.

Уперше підтверджено участь екзогенного глутатіону у підтримці активностей ензимів синтезу гідроген сульфїду.

Уперше продемонстровано здатність глутатіону корегувати біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії у щурів шляхом внутрішньошлункового введення глутатіону у дозі 100 мг/кг маси тіла впродовж 3 днів та 7 днів.

Встановлено, що оптимальним є семиденне внутрішньошлункове введення глутатіону, яке зумовлює зниження вмісту продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів, корекцію активностей антиоксидантних та енергопродукуючих ензимів, регуляцію обміну гідроген сульфїду за умов експериментальної нефропатії.

Практичне значення одержаних результатів. Розширені теоретичні дані щодо механізмів дії глутатіону і його здатності нормалізувати показники ензимів синтезу гідроген сульфїду, енергосинтезувальної та антиоксидантної систем, та отримані експериментальні результати впливу глутатіону на організм за умов нефропатії можуть бути теоретичною основою для подальшого вивчення можливостей застосування глутатіону з нефро- та гепатопротекторною метою за умов захворювань нирок.

Запатентовано спосіб корекції біохімічних показників сироватки крові при експериментальній нефропатії у щурів шляхом внутрішньошлункового введення глутатіону у дозі 100 мг/кг маси тіла.

Результати дисертаційної роботи впроваджено у навчальний процес кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Буковинського державного медичного університету, кафедри патологічної фізіології

Буковинського державного медичного університету, кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедри біологічної та медичної хімії імені академіка Г.О. Бабенка Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, що підтверджено відповідними актами впровадження.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним закінченим науковим дослідженням. Авторка спільно з науковим керівником визначила тему, мету, завдання дисертаційної роботи, самостійно здійснювала розробку основних теоретичних і практичних положень дисертаційної роботи, планувала напрямки досліджень, здійснила аналіз та обговорення отриманих результатів. Загальне формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником.

Дисертантка самостійно провела аналіз і реферування джерел сучасної наукової літератури, а також змодельовала експериментальну нефропатію та виконала всі біохімічні дослідження стану оксидантно-антиоксидантної системи, системи енергозабезпечення гепатоцитів і системи обміну гідроген сульфідом в печінці та крові щурів за умов фізіологічної норми, нефропатії, індукованої введенням фолієвої кислоти, і введення глутатіону. Експериментальні біохімічні дослідження проведені на кафедрі біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», математично-статистичні – на кафедрі біологічної фізики та медичної інформатики Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», морфологічні – на базі лабораторії кафедри патологічної анатомії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет».

Авторкою роботи виконано аналіз отриманих результатів досліджень,

підготовлено до друку наукові роботи, написано всі розділи дисертації.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, участь дисертантки полягала у проведенні літературного пошуку, лабораторних дослідженнях, аналізі отриманих даних, формулюванні висновків та підготовці публікацій до друку.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на вітчизняних і міжнародних конференціях: 8th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry (м. Люблін, Польща, 2017); XX міжнародній медико-біологічній конференції молодих дослідників «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (м. Санкт-Петербург, 2017); XI Parnas Conference – Young Scientists Forum, «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (м. Київ, 2018); 100-й підсумковій науковій конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченій 75-річчю БДМУ (м. Чернівці, 2019).

Публікації. Основні наукові положення за темою дисертації опубліковано в 12-ти наукових працях, з них 6 статей (5 – у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, 1 стаття – у закордонному виданні, три статті опубліковано в журналах, які належать до Міжнародної наукометричної бази даних Scopus), 5 тез доповідей у матеріалах з'їздів та конференцій, 1 патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 156 сторінках (основний її обсяг становить 112 сторінок), складається з таких частин: анотації, вступу, огляду літератури, матеріалу та методів досліджень, експериментальної частини й обговорення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Робота містить 16 рисунків і 4 таблиці. Список літератури охоплює 205 найменувань, з них кирилицею – 22, латиницею – 183.

РОЗДІЛ 1

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ НЕФРОПАТІЙ. СИНТЕЗ І ВЛАСТИВОСТІ ГЛУТАТІОНУ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ЗА УМОВ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ НОРМИ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЯХ (огляд літератури)

1.1. Механізм виникнення нефропатії

Механізми ушкодження та відновлення нирок є складними та різноманітними [1, 2, 13, 14]. Нирки особливо чутливі до ішемії та дії токсинів із наступною вазоконстрикцією, ушкодженням ендотелію та активацією запальних процесів. Це зумовлено існуванням на зовнішній мозковій речовині нирки судинно-канальцевих структурних з'єднань, ураження яких порушуватиме кровопостачання життєво важливих структур нефрону. Внутрішньониркову вазоконстрикцію викликає активація ренін-ангіотензин-альдостеронової та симпатичної нервової систем, виснаження можливостей внутрішньогломерулярної авторегуляції та ендотеліальна дисфункція, що характеризується гіперпродукцією ендотеліну-1 і NO-синтази. Унаслідок канальцевої реабсорбції у нефроні концентрується багато речовин, що призводить до перевищення порогу токсичності в оточуючих епітеліальних клітинах, при ушкодженні яких цілісність цитоскелету швидко втрачається, а також, внаслідок втрати щіткової облямівки, зникнення полярності епітелію і порушення локалізації молекул адгезії та інших мембранних протеїнів (Na^+ , K^+ -АТФаза і β -інтегрини), порушується процес реабсорбції іонів натрію, що викликає апоптоз та некроз клітин. На місці десквамованого епітелію базальна мембрана залишається єдиним бар'єром між фільтратом та перитубулярним інтерстицієм, викликаючи зворотній відтік фільтрату, а за умов підвищення тиску в канальцях завдяки

внутрішньоканальцевій обструкції продовжуватиметься зниження швидкості клубочкової фільтрації [13, 14].

На ушкодження нефротелію впливає багато внутрішньоклітинних чинників: зростання концентрації вільного внутрішньоклітинного Ca^{2+} , виснаження АТФ, активація протеаз, ендонуклеаз, фосфоліпази, пошкодження мітохондрій, активація вільнорадикального окиснення, підвищення проникності плазматичної та мітохондріальної мембран, зниження протеїн-синтезувальної функції, руйнування цитоскелету, набряк ендоплазматичного ретикулуму, скупчення ядерного хроматину.

Специфічні етіологічно залежні прояви нефротатій варіюються залежно від синдрому та ступеня пошкодження тканин нирки. Проте ураження нирок різної етіології характеризуються загальними механізмами, що призводять до гострого тубулярного некрозу, який проявляє токсичний вплив та створює перешкоди для нормального руху рідини, викликаючи посилену продукцію АФО, уповільнення кровообігу в нирках, а також закислення фільтрату внаслідок гіперурикозурії, що, як правило, сприяє утворенню кристалів у каналцях і викликає їх обструкцію [8, 15]. Як наслідок – припинення активного транспорту іонів натрію та інших речовин, генерування запальних та вазоактивних медіаторів, активація системи імунного захисту.

Дисбаланс постачання кисню та поживних речовин до нефроцитів і видалення із них продуктів обміну зумовлює ушкодження епітеліальних клітин, порушення енергетичного обміну, іонного транспорту, що призводить до загибелі клітин шляхом апоптозу та гострого канальцевого некрозу.

Нирки – енергозалежний орган, але за умов патології часто спостерігається порушення роботи дихального ланцюга, продукція АТФ знижена, електрони надходять безпосередньо на молекули кисню, внаслідок чого у мітохондріях утворюється велика кількість вільних

радикалів, які ініціюють реакції пероксидного окиснення ліпідів, запускаючи механізм ушкодження клітинних мембран.

Літературні дані вказують [1, 2, 7, 16], що захворювання нирок призводять до запальних процесів, викликають підвищення проникності судин та інфільтрацію нейтрофілів і Т-лімфоцитів у печінці. За умов нефропатій активізується окислювальний стрес, знижується рівень антиоксидантів і посилюється експресія молекул, що сприяє пошкодженню та апоптозу гепатоцитів, гальмує або зупиняє їх детоксикаційну функцію. Тяжкість ураження печінки корелює з тяжкістю ураження нирок. Фактор некрозу пухлини (TNF- α), який є продукується трубчастими епітеліальними клітинами при захворюванні нирок, індукує прозапальні або протизапальні цитокіни, такі як інтерлейкіни IL-6, IL-8 та IL-10, що, в свою чергу, впливає на патогенез інших органів. Є чимало досліджень про те, що захворювання нирок активізує окислювальний стрес, знижує рівень антиоксидантів, і регулює експресію молекул, що сприяє пошкодженню інших тканин, однак точні механізми дистанційної дисфункції органів, спричиненої захворюванням нирок, залишаються незрозумілими.

1.2. Види експериментальних нефропатій

Існує чимало моделей патології нирок, які характеризуються відмінностями патогенезу та складністю відтворення – моделі хірургічного втручання, імунологічні нефрити (*Thy-1*, *anti-GBM*) та трансгенетичні моделі, а також патології, зумовлені впливом хімічних речовин та лікарських засобів, наприклад, нефропатії, викликані введенням сулеми, гліцеролу, пуроміцину, фолієвої кислоти, циклоспорину А, деоксикортикостерон ацетату [3, 17].

Нефропатія, яку викликають внутрішньом'язовим введенням розчину гентаміцину сульфату, характеризується накопиченням діючої речовини у кірковому шарі нирок. Сполука інгібує лізосомальну фосфоліпазу і сфінгомієлазу, що призводить до лізосомального фосфоліпідозу, акумуляції

мієлоїдних частинок та, як результат, до некрозу. Гентаміцинова нефропатія характеризується порушенням концентраційної функції нирок та мінерального обміну, запаленням і розвитком протеїнурії [18].

Міоглобінурична (рабдоміолітична, гліцеролова) експериментальна гостра ниркова недостатність, яку викликають одноразовим внутрішньом'язовим введенням щурам водного розчину гліцеролу є досить популярною серед вітчизняних дослідників. Характерними для цієї моделі є ішемія нирок, зростання внутрішньоканальцевого тиску, зумовлене преципітацією міоглобіну і спазмом аферентної артеріоли, а також зниження ниркового кровообігу та активація вазоконстрикторних факторів [3, 19].

Токсична нефропатія, викликана дихлоридом ртуті, характеризується зниженням швидкості клубочкової фільтрації, порушенням канальцевого транспорту речовин [20].

Нами було використано модель експериментальної нефропатії, яка базується на введенні тваринам високої дози фолієвої кислоти. Моделі ФК-нефропатій у гризунів вперше були описані 50 років тому [21], і досі широко застосовуються та детально вивчаються. Модель нефропатії, викликана ін'єкцією великої дози ФК (250 мг/кг), дозволяє вивчати механізми пошкодження нефротичних каналів та поступовий фіброз нирок, оскільки повторює послідовність патологічних (набряк ниркових епітеліальних клітин, атрофія ниркових канальців, апоптоз) та адаптивних реакцій, які спостерігаються за умов гострої ниркової недостатності у людей [22-24].

Слід згадати, що високі дози фолієвої кислоти і 5-фторурацил – комбінована хіміотерапія при лікуванні метастазуючого раку шлунково-кишкового тракту. Така схема лікування збільшила кількість нефропатій: одним з механізмів дії 5-FU є його перетворення в фтордезоксидуридилат, який інгібує тимідилсинтетазу, а швидкість інгібування ензиму зростає зі збільшенням концентрації фолієвої кислоти. Було проведено обстеження стану нирок у хворих, що проходили курс лікування, і виявлено ознаки

пошкодження каналців нирок, схожі з пошкодженнями при нефропатії, викликаній ФК [5].

Індуковане ФК пошкодження нирок, за попередніми дослідженнями [4, 22, 25], характеризується дегенерацією епітелію каналців, інтерстиціальною інфільтрацією імуніцитів та зростанням факторів запалення уже на ранніх етапах патології, а згодом – порушення антиоксидантної системи та загибель епітеліальних клітин.

Як відомо [26], протеїни фактора росту судинного ендотелію (англ. VEGF – Vascular endothelial growth factor) відповідають за відновлення подачі кисню до тканин в умовах недостатньої циркуляції крові шляхом утворення нових кровоносних судин під час ембріонального розвитку, росту пухлин або після травм, тому зміна рівня VEGF за умов нефропатії, викликаній фолієвою кислотою, може бути функціонально залученим чинником прогресуючого ушкодження перитубулярних капілярів нирок, недостатнього росту судин і гіпоксії тканин.

Крім гострого ураження нирок, фолієва кислота у високих дозах спричинює фіброз нирок [5, 27]. Важливим внеском у розвиток тубуло-інтерстиціального фіброзу є активність реніну, трансформуючого фактору росту бета (TGF β), який пригнічує активацію імунної системи, та мітохондріальні дисфункції, що разом сприяє гіпоксії тканин, фіброгенезу та порушенню антиоксидантної системи. Пошкодження мембран та вакуолей, набряк клітин, порушення цілісності каналців нирок демонструють прямий нефротоксичний ефект ФК. Окрім прямої токсичної дії на епітелій нирок, фолієва кислота через низьку розчинну здатність накопичується та формує у нирках кристали, викликаючи обструктивне пошкодження тканин. Відомо, що високі дози ФК викликають запалення та посилюють експресію TNF- α , ICAM-1 та IL-6.

Різні автори [3, 7, 22] повідомили про підвищений оксидантний стан та знижений потенціал антиоксидантів у експериментальних моделях

нефропатій. У нирках фізіологічно обумовлено посилений енергетичний та окислювальний обмін, який призводить до зростання виробництва АФО за умов найменших ушкоджень, а в умовах патології гіперпродукція АФО буде ушкоджувати віддалені органи організму також.

1.3. Антиоксидантні властивості та механізми дії глутатіону

За умов фізіологічної норми організм підтримує динамічну рівновагу між вмістом оксидантів, які стимулюють процеси вільнорадикального окиснення біомолекул, та активністю антиоксидантних систем. Але за умов ушкодження будь-якої ланки живої системи спостерігається підвищене утворення АФО та пригнічення антиоксидантних систем організму, що призводить до активації процесів вільнорадикального окиснення, інтенсивність перебігу якого залежить від концентрації кисню в тканинах та від ензиматичних і неензиматичних систем антиоксидантного захисту, які запобігають руйнуванню клітин активними формами кисню. Відомо, що адаптивні реакції організму при стресових впливах спрямовуються на підтримання гомеостазу і в цьому процесі пріоритетну роль відіграють нирки та печінка.

За умов надходження в організм токсичних речовин та активації окисно-відновних процесів для корекції метаболічних порушень широко використовуються сполуки природнього походження з антиоксидантними та гепатопротекторними властивостями. Проте, незважаючи на велику кількість досліджень за згаданою темою, вивчення нефро- та гепатопротекторних властивостей різних сполук залишається й досі актуальним.

Серед водорозчинних біоантиоксидантів є популярними у медицині низько- і високомолекулярні сполуки, які містять SH-групи; моно-, ди- і трикарбонові кислоти та інші аніони. У науковій літературі є чимало згадок про використання глутатіону при патологіях різної етіології.

Глутатіон (γ -L-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин) – трипептид, який існує у двох формах – відновленій (GSH) та окисленій (дисульфід глутатіону, GSSG). Найбільша його частка (85%) знаходиться в цитоплазмі, менша (10-15%) – у мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі [9, 28].

В світовій медичній практиці екзогенний глутатіон використовується уже понад 40 років. Уперше він був синтезований в Японії на початку 1970-х років, згодом розпочалося клінічне застосування препарату в Китаї, Італії, Іспанії, США та інших країнах.

Система глутатіону в організмі відновлює понад 300 окиснених субстанцій, зокрема, зв'язує вільні радикали, відновлює продукти пероксидного окислення ліпідів, фосфоліпідів мембран, протеїнів, відновлює вітаміни С та Е [29]. Основні функції системи глутатіону були описані у 70-80-ті роки в класичних оглядах А. Meister [30, 31], а згодом доповнені вченими усього світу.

Основним резервуаром GSH є печінка, звідки він виділяється в значній кількості у кров та жовч [9, 32]. Система глутатіону, що включає власне глутатіон і ще три ензими (глутатіонпероксидазу (GPx), глутатіон-S-трансферазу й глутатіонредуктазу), є єдиною в організмі, що задіяна у трьох лініях антиоксидантного захисту з чотирьох існуючих.

Як і більшість хімічних речовин, концентрації яких всередині клітини постійно регулюються, синтез та розпад GSH здійснюється окремими шляхами, що дозволяє ефективніше регулювати концентрацію GSH у межах клітини. Розпад відбувається виключно за допомогою каталізу, опосередкованого γ -глутамілтрансферазою. Відомо, що високу активність γ -глутамілтрансферази мають епітелій тонкого кишечника, пігментний епітелій сітківки, а найвищу – проксимальні каналці нирок.

Глутатіон утворюється з амінокислот L-цистеїну, L-глутамінової кислоти й гліцину: спочатку відбувається синтез γ -глутамілцистеїну із глутамату й цистеїну за участі ензиму γ -глутамілцистеїнсинтетази, далі –

приєднання залишку гліцину до С-кінця γ -глутамілцистеїну за допомогою глутатіонсинтетази. Обидва етапи є АТФ-залежними, і за умов патології або токсичного ураження, енергії для синтезу GSH може бути недостатньо, або кількість синтезованого трипептиду виявиться низькою для підтримки оптимальних клітинних концентрацій GSH. Оскільки внутрішньоклітинна концентрація цистеїну, як правило, нижча, ніж концентрація глутамату чи гліцину, цистеїн є регулятором синтезу глутатіону, а його кількість – обмежувач швидкості трипептиду. Контроль внутрішньоклітинного гомеостазу глутатіону є складним процесом, що відбувається шляхом його синтезу, споживання й деградації. Клітинний GSH синтезується *de novo* з прекурсорів (амінокислот глутамату, цистеїну, гліцину), також є можливим поглинання екстрацелюлярного глутатіону клітинами. Окрім синтезу *de novo*, кількість антиоксиданта контролюється активністю глутатіонредуктази, яка відновлює GSSG у присутності NADPH(H⁺) до GSH [33, 34]. Активність ензимів, які беруть участь у метаболізмі відновленого глутатіону, контролюється організмом на транскрипційних, трансляційних і посттрансляційних рівнях.

Глутатіоновий статус – співвідношення GSH/GSSG – є одним з ключових компонентів підтримки редокс-гомеостазу в клітині. Співвідношення концентрацій відновленого й окисленого глутатіону в нормі становить 10:1, а зменшення співвідношення є маркером оксидативного стресу, при розвитку якого спостерігається пошкодження молекул вуглеводів, ліпідів, протеїнів, нуклеїнових кислот, зміна експресії генів, одно- або дволанцюгові розриви ДНК, зниження трансмембранного потенціалу та проникності мембран мітохондрій.

Системі глутатіону належить основна роль у підтримці клітинного редокс-гомеостазу завдяки участі в тіол-дисульфідному обміні, що обумовлює не тільки його антиоксидантні властивості, але й участь у

регуляції генної експресії, активності деяких ензимів, метаболічних процесах у цитозолі, мікросомах і мітохондріях.

Нирки – основне місце розпаду трипептиду, куди окиснений глутатіон транспортується кровоносною системою, вільно дифундує через клітинну мембрану. Його ензиматичний гідроліз відбувається у проксимальній частині ниркових канальців за допомогою ензимів зовнішньої поверхні мембран щіткової облямівки (цистеїнілгліциндипептидази, γ -глутамілтрансферази та цистеїнредуктази).

Раніше використання глутатіону перорально було дискусійним питанням через припущення, що біосинтез та деградація глутатіону об'єднані в глутамільний цикл, і ензимами ентероцитів глутатіон руйнується до складових амінокислот. Але згодом з'явилось чимало значущих наукових робіт [35, 36], у яких шляхом експериментів було виявлено, що антиоксидант здатний в інтактному вигляді всмоктуватися у травному тракті.

Результати досліджень [37-39], пов'язаних із пероральним введенням GSH лабораторним тваринам, показали, що GSH всмоктується з шлунково-кишкового тракту неушкодженим, і може бути корисним для підвищення концентрації GSH у плазмі та тканинах. Перорально введений трипептид, залежно від тканини, здатний підвищувати концентрацію GSH безпосередньо за допомогою поглинання транспортерами (як це спостерігається в травному тракті, плазмі крові, легенях та головному мозку щурів); опосередковано через деградацію GSH та подальший внутрішньоклітинний повторний синтез, або поєднанням обох механізмів (печінка, серце).

Є наукові дані [40], які вказують, що GSH може надходити до бокалоподібних клітин тонкої кишки, всмоктуватися через базолатеральну мембрану за натрій-залежним механізмом та безпосередньо транспортуватися з просвіту кишки в судинний перфузат.

Цікавим є той факт, що введення у раціон тварин складових амінокислот трипептиду не впливало на концентрацію GSH у плазмі крові.

Це ще раз вказує на збільшення концентрації GSH внаслідок поглинання інтактного GSH, а не через метаболізм та повторний синтез. Вплив перорального прийому GSH на рівень GSH у плазмі людей також досліджувався, і було отримано показники зростання рівня трипептиду [41], та зауважено міжвидові відмінності в рівнях GSH у плазмі після перорального прийому, що пояснюється більш високою активністю печінкової γ -глутамілтрансферази у людини порівняно з щурами, в результаті чого відбувається посилений гідроліз GSH та підвищення рівня циркулюючого трипептиду у людини [42]. Введення складових амінокислот антиоксиданта людям не призвело до такого ж збільшення плазматичного GSH, як введення GSH, що демонструє поглинання GSH неушкодженим. Зокрема, у роботі [43] повідомили про збільшення протеїнової форми глутатіону в крові пацієнтів після перорального прийому, тоді як глутатіон у депротеїнізованій фракції не змінився. Ці дослідження свідчать про те, що перорально введений глутатіон всмоктується в кров і може мати вплив на окислювально-відновний стан в організмі людини. Водночас накопичення залишків цистеїну та зниження рівня GSH у клітині асоціюють із порушеннями функціонування внутрішньоклітинних протеїнів.

Функціонування системи глутатіону впливає на реалізацію важливих фізіологічних та біохімічних процесів: детоксикації, антиоксидантного захисту, перетворення вітамінів С, Е, ліпоєвої кислоти, убіхінону; регуляції тіол-дисульфідної рівноваги, синтезу нуклеїнових кислот; збереження оптимального стану та функцій біологічних мембран; бере участь у обміні ейкозаноїдів – простагландинів та лейкотрієнів [44]. Окисна модифікація або карбонілювання протеїнів, яке відбувається при виснаженні глутатіону, стимулює ковалентну модифікацію ендогенних ензимів та протеїнів, що може призвести до втрати їх функцій, стійкості до інсуліну та порушення метаболізму глюкози [9, 45].

Клітинний окислювально-відновний стан є вирішальним регулятором клітинного циклу, а GSH відіграє у цьому важливу роль: у G1-фазі клітинного циклу науковцями було зафіксовано дуже низький рівень GSH, а підвищення рівня GSH необхідне для переходу клітини від фази G1 до S-фази [29, 46]. Під час фаз G2 і метафази відбувається врівноваження між цитозольним і ядерним пулами GSH.

Глутатіон бере участь у захисті SH-груп внутрішньоклітинних ензимів від окислення та блокування чужорідними сполуками, а окремі ензими використовують його як кофактор (гліоксалаза, формальдегіддегідрогеназа, цис-транс-ізомерази) або субстрат. Глутатіон також регулює клітинний цикл через ген полімерази – високі рівні GSH корелюють зі збільшенням активності ензиму [35, 47].

Неконтрольоване окислення призводить до деградації ядерної та мітохондріальної бази ДНК, і щоб мінімізувати цю шкоду, система GSH виконує захисну функцію – глутатіонування протеїнів, що забезпечує "окисно-відновний буфер GSH", який регулює процеси транскрипції, трансляції, відповідає за стабільність хроматину, рівень протеїнів у ядрі, а отже, реплікацію та відновлення ДНК [10, 48].

Для регенерації GSSH у GSH у клітках присутня глутатіонредуктаза, і ензиматичне відновлення глутатіону залежить від NADPH, тому функціонування GSH-залежних компонентів антиоксидантної системи взаємозв'язано з активністю ензимів, які продукують NADPH:



Велика увага приділяється впливу клітинних рівнів GSH на імунну систему: доведено, що низький рівень GSH корелює з багатьма аутоімунними захворюваннями. GSH може безпосередньо модулювати проліферацію високоочищених Т-клітин через антигени CD2 та CD3, підтримує баланс Th1/Th2 і впливає на цитокіни [49-51].

У нирках є особливості метаболізму глутатіону, оскільки поруч із реакціями антиоксидантного захисту, трипептид інтенсивно використовується під час транспорту амінокислот через мембрану в γ -глутаміловому циклі Мейстера. Тому порушення структури нирок, захворювання видільної системи потребують додаткових досліджень обміну глутатіону та вивчення впливу екзогенного антиоксиданта на організм за умов патології органів виділення.

Оскільки ключовим функціональним елементом молекули GSH є залишок цистеїну, який забезпечує наявність реакційноздатної тіольної групи, однією із важливих функцій GSH є запасання та збереження цієї амінокислоти, оскільки вона нестабільна у позаклітинних умовах і швидко окислюється до цистину в процесах, продуктами яких є потенційно токсичні АФО.

Цикл γ -глутамінової кислоти дозволяє використовувати GSH як неперервне джерело цистеїну. Глутатіон екскретується із клітини, далі завдяки дії γ -глутамілтранспептидази, розташованої на зовнішній поверхні мембран, розщеплюється до залишку γ -глутамінової кислоти, який поєднується з іншою амінокислотою (найкращим акцептором є цистеїн), та цистеїніл-гліцину. Цикл завершується, коли γ -глутаміламінокислота транспортується в клітину, де може метаболізуватися до амінокислоти та 5-оксипроліну, який здатний перетворюватися в γ -глутамат і далі використовуватися в синтезі GSH. Цистеїніл-гліцин розщеплюється дипептидазою до гліцину та цистеїну. Останній транспортується у клітини, де в основному використовується на синтез GSH, частина входить до складу протеїнів, у залежності від потреб клітини, а залишок перетворюється на сульфат і таурин [52].

Значну роль складові системи глутатіону виконують у процесах знешкодження аміаку. Глутамін, присутній у складі глутатіону, є молекулярною формою транспорту аміаку з органів та тканин, де він

утворюється: глутамін в печінці розщеплюється з вивільненням аміаку, який використовується в реакції синтезу сечовини, забезпечуючи знешкодження надлишкової кількості аміаку та попереджаючи його токсичний вплив.

Глутатіон має регулюючий вплив на синтез протеїнів теплового шоку; бере участь у реалізації механізмів апоптозу, посттрансляційних модифікаціях протеїну для захисту тіолів від гіперокислення або регулювання активності протеїнів [10, 53, 54]. Найбільш інтенсивно захоплюють циркулюючий глутатіон епітеліальні клітини – ентероцити, альвеолярні клітини, а також епітеліоцити проксимальних ниркових каналців.

Глутатіон можна розглядати, як потенційний засіб для профілактики й патогенетичного лікування діабетичної полінейропатії [48, 51, 55]. З'явилися дані про участь GSSG у регуляції сну та виникненні нейро- та міопатій у людей із вродженими порушеннями синтезу глутатіону [57, 58]. Дедалі ширше вивчаються нейротропні ефекти трипептиду, активно досліджується та обговорюється гіпотеза щодо використання глутатіону як доповнення до антипухлинної терапії. В контексті лікування злоякісних новоутворень повноцінне функціонування системи глутатіону є життєво необхідним для підтримання окисно-відновного гомеостазу нормальних клітин організму, доведено [36, 51, 52] численні взаємозв'язки глутатіонової системи з розвитком і прогресуванням злоякісних новоутворень, але чимало ефектів глутатіону на метаболічні шляхи організму ще потребують детального вивчення.

Більша частина вмісту GSH плазми крові забезпечується його синтезом в печінці, тому порушення функціональності печінки призводить до системного міжорганного порушення гомеостазу глутатіону, і особливо важливими є дослідження застосування глутатіону при захворюванні печінки та органів видільної системи, а також при захворюваннях, які супроводжуються токсичністю.

Оскільки важливим компонентом антиоксидантного механізму захисту є глутатіон, а головним детокс-органом – печінка, ймовірно, що рівень антиоксидантного захисту за умов нефропатії може змінюватися і негативно впливатиме на загальний оксидантний стан нирок та печінки, призводитиме до посилення пероксидного окиснення ліпідів після введення фолієвої кислоти. Це обґрунтовує необхідність вивчення можливостей екзогенного глутатіону для корекції зазначених порушень.

1.4. Мітохондрія і глутатіон

Мітохондрії — двомембранні органели, характерні для більшості клітин еукаріот. Завдяки функції утворення енергії їх називають «електростанціями» або «енергетичними станціями клітин». Вперше органелу описав у 1890 році R. Altman [59], а свою сучасну назву вони отримали через 7 років у роботах С. Benda (1898) [60]. На сьогодні відомо, що мітохондрії є не лише джерелами енергії, а й АФО, беруть участь у рості та загибелі клітини.

Для мітохондрії характерними є внутрішня та зовнішня мембрани, які відділяють матрикс (внутрішнє середовище органели) від цитозолю. У матриксі локалізовано генетичний апарат, ензими, залучені до оксидативного метаболізму, циклу трикарбонових кислот та метаболізму жирних кислот. Внутрішня мембрана формує кристи і характеризується наявністю протеїнів дихального ланцюга, вона непроникна для більшості іонів та малих молекул – властивість, необхідна для підтримання протонного градієнту для окисного фосфорилування. У різних типах клітин та тканин кількість, розмір та форма мітохондрій варіює, а мітохондріальна ДНК легко мутує за несприятливих умов та наявності стимулюючих чинників (АФО, радіація), оскільки в органелі механізм репарації відсутній [61].

Клітинне дихання полягає у послідовній взаємодії складних окислювально-відновних реакцій. На початковому етапі в матрикс

мітохондрій транспортується піруват, де в циклі Кребса за aerobicних умов утворюються відновлювані NAD і ФАДН₂. Далі, послідовно електрони транспортуються з NADH⁺ і ФАДН₂ до комплексів I та II, убіхінону (Q), комплексу III, цитохрому *c* і комплексу IV (рис. 1.1), і в міжмембранний простір крізь внутрішню мембрану викачуються протони (H⁺), створюється трансмембранний електрохімічний протонний градієнт [62].

З комплексу IV електрони надходять до молекул кисню, які розпадаються на атоми та з'єднуються з іонами H⁺, формуюючи молекули води, а протони, переміщені раніше з матриксу в міжмембранний простір, транспортується знову в матрикс H⁺-АТФ-синтазою. В результаті надходження потоку протонів утворюється енергія синтезу АТФ. Мітохондрії мають широкий спектр протеїнових (цитохром *c*, ендонуклеаза G) і непротеїнових факторів (іони Ca²⁺, АФО), які активують процеси патогенетичних механізмів загибелі клітин за дії різних пошкоджуючих чинників: токсичних впливів, ішемії, реперфузії, оксидативного стресу тощо.

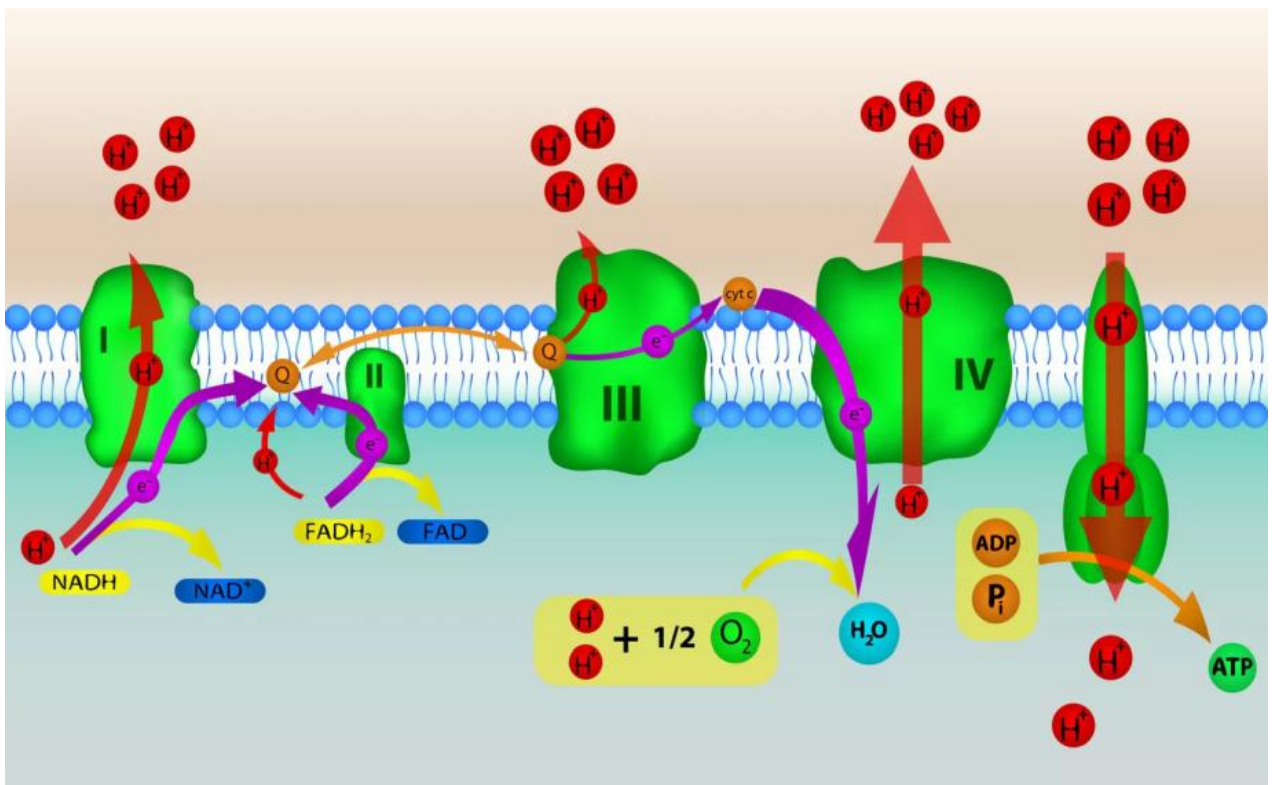


Рис. 1.1. Схема синтезу АТФ в електронно-транспортному ланцюзі внутрішньої мембрани мітохондрії [63]

Сьогодні серед наукової спільноти є поширеним термін «мітохондріальні апоптичні пори» (mitochondrial apoptotic pores – MAP), механізмом виникнення яких є олігомеризація на мітохондріальній мембрані протеїнів Bax і Bak, а стимулом – гіперпродукція активних форм кисню та роз'єднання процесів дихання та фосфорилування [64-65].

В основі розвитку апоптозу за мітохондріальним типом лежить активація мітохондріальної пори перехідної проникності (mitochondria permeability transition pore (mPTP) та утворення в зовнішній мембрані мітохондрій апоптоз-індукованого каналу (mitochondrial apoptosis-induced channel) [66]. Як при апоптичній, так і при некротичній загибелі клітин шляхом ініціювання внутрішньоклітинних сигнальних шляхів одним із чинників є мітохондріальна дисфункція [63, 67, 68]. Ініціюючим етапом індукції загибелі клітини за мітохондріальним шляхом є відкриття mPTP, внаслідок чого відбувається деполяризація мітохондріальної мембрани, набряк мітохондрії, вивільнення протеїнів проапоптотичної дії до цитозолу.

Мітохондрії є основною внутрішньоклітинною локацією споживання кисню та основним джерелом АФО, більшість з яких походить від електрон-транспортного ланцюга. Наприклад, стаціонарна концентрація супероксиду в мітохондрії у 5-10 разів більша, ніж у цитозолі.

Рівень GSH у клітині має регулюючий вплив на здатність клітини починати шлях апоптозу. Головними чинниками такого контролю є зміна клітинного редокс-гомеостазу, а саме зниження співвідношення GSH/GSSG або через окиснення GSH, або транспортом GSH з клітини, що впливає на ініціацію апоптозу та безпосередньо на перебіг апоптичних реакцій. Також є дані про роль процесу S-глутатіонування у модуляції активності протеїнів, які активують загибель клітин, і те, що система GSH зменшує апоптоз активацією декількох сигнальних шляхів (JNK1, MAPK, TRAF2-ASK1, p38, p53, Trx). В досліджах на модельних системах показано [10, 47, 52, 69-70], що високий рівень клітинного GSH характерний для стійкого до апоптозу

фенотипу, а зниження рівня антиоксиданта приводило або до ініціації апоптозу, або було характерним для його етапів. Чимало експериментальних досліджень [55, 60, 64, 71] підтвердили, що збільшення пулу глутатіону пригнічувало апоптичні реакції.

GSH є важливим для синтезу теломерів еукаріотичних хромосом, оскільки бере участь у підтримці активності теломерази. Глутатіон виконує декілька ролей у матриксі: антиоксидантна дія, участь у біогенезі кластерів заліза та сірки, відновлення пероксиредоксину Ptx1, глутатіонування мітохондріальних протеїнів. Протеїнове S-глутатіонілювання включає ковалентний зв'язок молекули GSH до залишку цистеїну через дисульфідний зв'язок для регулювання функції та активності протеїну в мітохондріях. Можливим є механізм S-глутатіонілювання протеїнів у мітохондріях через ензиматичну активність GST [37, 40, 54, 72]. З процесів, які залежні від S-глутатіонілювання в мітохондріях, мабуть, найбільш вивченими є регуляція протеїнів дихальних комплексів I, III і V, а також ензими циклу Кребса – аконітаза, 2-оксоглутаратдегідрогеназа, сукциніл-коА-синтетаза.

Мітохондріальний глутатіон (mGSH) синтезується в цитозолі [73, 74]. Вміст GSH у клітинах, виявлений у мітохондріях, незначний. Мітохондріям не вистачає ензимів для синтезу глутатіону, але матрикс мітохондрій та внутрішня мітохондріальна мембрана містять ензими, зокрема глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу та глутатіон-S-трансферазу, які використовують глутатіон, і застосовують різні механізми подачі NADPH та обміну малими молекулами. Існують дослідження, що холестерин бере участь в регулюванні транспорту mGSH [75, 76].

Глутатіон не в змозі вільно проходити через ліпідний шар, оскільки негативно заряджений, тому у мітохондріальних мембранах передбачено наявність специфічних транспортних систем, які працюють проти електрохімічного градієнта. Вважають, що глутатіон проходить через зовнішню мембрану мітохондрій через аніонні канали та, ймовірно, через

транслокацію протеїну TOM 40 та TIM (translocase of the outer/inner membrane). Також матрикс мітохондрій містить Glr1 та дитіольний глутаредоксин. Зокрема, глутаредоксин Grx55 бере участь у біогенезі всього мітохондріального заліза [59, 67, 77-82].

Дихальний ланцюг, що генерує протони та АФО, імовірно, призводить до відмінностей у низькомолекулярному складі між внутрішньомембранним простором та кристами мітохондрій, але ця гіпотеза досі потребує детального вивчення.

Підтримка нормальної роботи видільної системи організму залежить від постачання глутатіону, що частково пов'язано з високою швидкістю аеробного метаболізму в нирках, особливо в їх проксимальних каналцях, та печінці, зокрема за умов порушення метаболічних шляхів і токсичних впливів навколишнього середовища та лікарських засобів. Оскільки клітинні концентрації GSH підтримуються як внутрішньоклітинним синтезом, так і транспортними системами організму, використання трипептиду у фармакологічних цілях для забезпечення гепатоцитів та ниркових проксимальних трубчастих клітин екзогенним GSH для захисту від окислювального стресу в умовах патологій є аргументованим, але потребує детального вивчення [71, 83, 84].

1.5. Гідроген сульфід: синтез та біохімічна роль

За останнє десятиліття наукові працівники зацікавилися дослідженням сірководню – сигнальної молекули, яка бере участь у механізмах цитопротекції клітин, регуляції фізіологічних та біохімічних процесів організму майже у всіх органах. Особливу увагу заслуговує вплив цієї сигнальної молекули на тонус судин, ангиогенез, а також її антиоксидантна і нейромедіаторна дія, участь у регуляції апоптозу, запальних процесах, антиагрегантні та фібринолітичні властивості.

Подібно до NO і CO, H₂S є ліпофільним і вільно проникає через мембрани, хоча для H₂S мембрани відносно менш проникні. H₂S є високореакційною молекулою і може легко реагувати з іншими сполуками, особливо з реакційноздатними видами кисню та азоту. Було продемонстровано [85-87], що H₂S реагує щонайменше з чотирма видами АФО – радикальним аніоном супероксиду, пероксидом водню, пероксинітридом та гіпохлоритом. Усі вони відрізняються високою реакційною здатністю: супероксидний аніон продукується NADPH-оксидазами у багатьох типах клітин, зокрема у клітинах серцево-судинної та видільної систем; H₂O₂ утворюється у реакції, каталізованій супероксиддисмутазою; пероксинітрид (ONOO⁻) є продуктом спонтанної реакції між супероксидом і NO, а гіпохлорит (ClO⁻) утворюється з H₂O₂ нейтрофільною мієлопероксидазою. І одним із механізмів захисту протеїнів і ліпідів від пошкодження, опосередкованого цими АФО, є їх взаємодія з H₂S. Значення реакції H₂S із O₂ досі неоднозначне, оскільки сульфід, як і сірководень, може мати як токсичні, так і антиоксидантні властивості, залежно від концентрації. Було виявлено, що при запаленні за участі НАДФ-оксидази відбувається окиснення H₂S до сульфату, який посилює адгезію лейкоцитів і функцію нейтрофілів.

Основними джерелами ендogenous гідроген сульфід у організмі є процеси транссульфування цистеїну та гомоцистеїну за участю трьох піридоксальфосфат-залежних ензимів (рис.1.2) – CSE (КФ 4.4.1.1), CBS (КФ 4.2.1.22), цистеїнамінотрансферази (CAT, КФ 2.6.1.3), а також Zn-залежної 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (3-MST, КФ 2.8.1.2) [88-90].

У різних органах і тканинах фізіологічні концентрації гідроген сульфід варіюють і становлять від 1 до 100 нмоль/г тканини. Відомо, що при запаленні збільшується синтез H₂S ензимами цистатіонін-γ-ліазою (CSE) і цистатіонін-β-синтазою (CBS) під впливом ліпополісахаридів і прозапальних цитокінів. Також сірководень може нести як індуючий, так і інгібуючий

вплив на механізми реалізації апоптозу клітини. Проапоптичний ефект гідроген сульфїду у високих (мілімолярних) концентраціях супроводжується генерацією активних форм кисню, залученням як рецепторного, так і мітохондріального шляхів реалізації апоптозу. Дія мілі- і мікромолярних концентрацій гідроген сульфїду має цитопротекторний вплив [91-94].

CBS – маркерний ензим синтезу H_2S у центральній нервовій системі, нирках, печінці, плаценті та підшлунковій залозі, CSE – в серцево-судинній системі. Цистатіонін- β -синтаза та цистатіонін- γ -ліаза, домінуючі ензими генерації H_2S у нирках, в основному локалізовані в ниркових проксимальних каналцях.

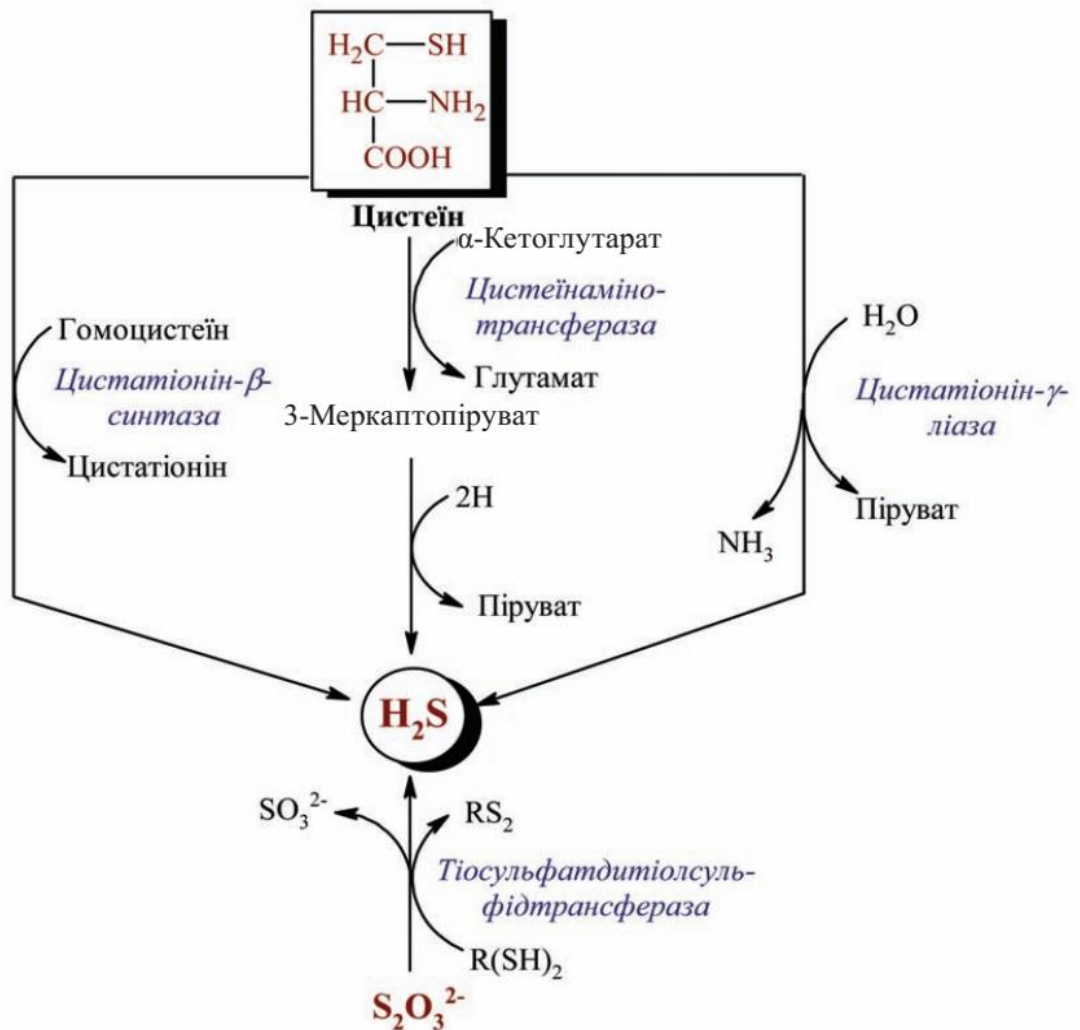


Рис. 1.2. Схема синтезу гідроген сульфїду [95]

Цистеїнамінотрансфераза каталізує перетворення цистеїну до 3-меркаптопірувату. Використовуючи у ролі кофактора йони Zn^{2+} , 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза перетворює атом сірки 3-меркаптопірувату до інших акцепторів сульфуру. Було встановлено, що H_2S у значних кількостях синтезується у нирках, і є важливим у функціонуванні каналцевого і клубочкового апарату нирок [88, 91]. Слід зазначити, що існує три основних шляхи метаболізму H_2S : мітохондріальне окиснення, цитоплазматичне метилювання та зв'язування метгемоглобіном [87, 92, 95], а концентрація H_2S залежить від співвідношення трьох чинників: швидкості його утворення, швидкості метаболізму та зберігання у складі зв'язаного сульфату сульфуру. Метаболізм H_2S пов'язаний із тіолдисульфідним обміном та синтезом глутатіону, зокрема з метаболізмом внутрішньоклітинного цистеїну (рис. 1.3), який утворюється з метіоніну як продукт транссульфурації під дією цистатіонін- β -синтази та цистатіонін- γ -ліази, або є похідним цистину [96 - 98].

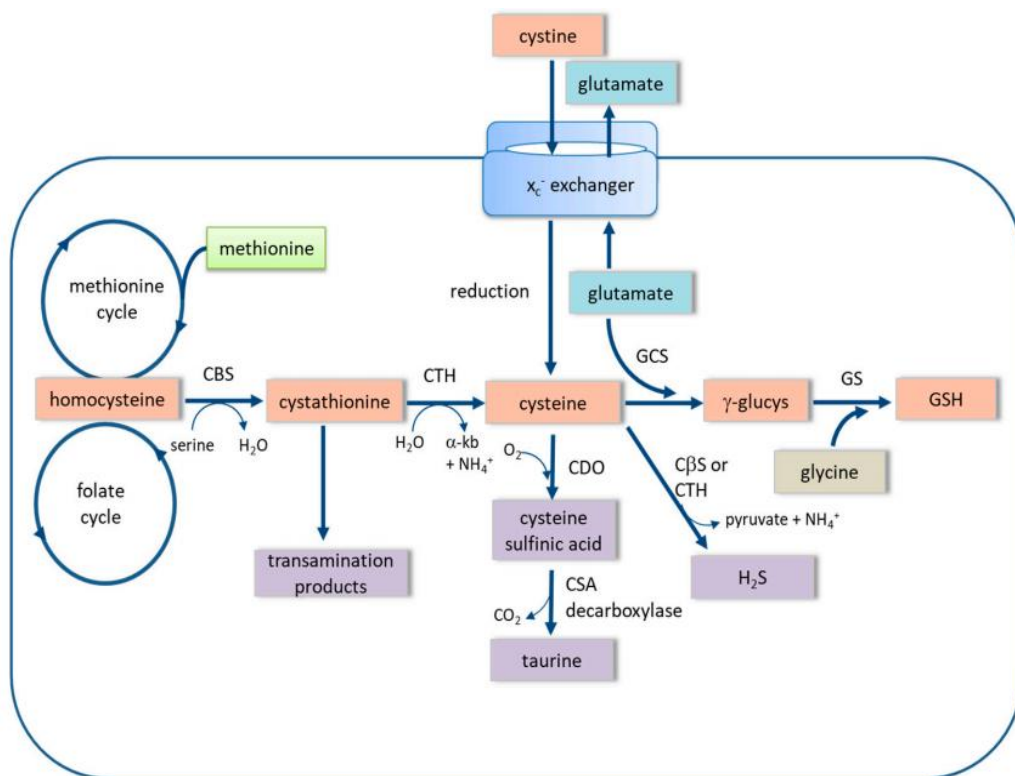


Рис. 1.3. Шляхи синтезу та метаболізму внутрішньоклітинного цистеїну та гідроген сульфіду [98]

Сірководень посилює транспорт цистину і цистеїну в клітини через збільшення активності цистин-глутамат антипорту і цим самим збільшує концентрацію субстрату синтезу глутатіону. Крім того, H_2S збільшує активність γ -глутамілцистеїнсинтетази, ензиму синтезу GSH, що призводить до збільшення рівня GSH в клітині, особливо при оксидативному стресі [89, 94, 96, 97].

Встановлено, що H_2S підвищує активність ендогенних антиоксидантів: супероксиддисмутази, глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази. Існують дані про те, що H_2S посилює антиоксидантний захист клітин через регуляцію Nrf 2, фактора транскрипції, який передає стимулюючі сигнали на компонент антиоксидантного реагуючого елемента, що контролює експресію понад двохсот генів, залучених у антиоксидантний і протизапальний захист, серед них, гени гемоксигенази-1, тіоредоксину, тіоредоксинредуктази, глутатіонпероксидази та каталази [89, 93, 98].

Механізм вазорелаксуючої дії H_2S включає відкривання калієвих каналів, блокаду Ca^{2+} -каналів, підвищення продукції ендотелієм NO, ендотеліального гіперполяризованого фактору і зниження pH [91, 99, 100-103]. На відміну від NO, що має тільки вазорелаксуючу дію, H_2S може проявляти як судинорозширювальний, так і вазоконстрикторний ефекти. Цікаво, що H_2S з NO утворює нітрозотіолову сполуку, яка, на відміну від інших нітрозотіолів (R-S-NO), неактивна.

Ензиматичний синтез H_2S у мітохондріях здійснюється 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою. H_2S може накопичуватися і брати участь у відновленні балансу O_2 збільшенням медулярного кровотоку.

H_2S може пригнічувати процес ланцюгового утворення АФО в мітохондріях, що посилює участь H_2S як антиоксиданта, та здатний функціонувати як енергетичний субстрат для підтримки синтезу АТФ в умовах стресу, але при високій концентрації молекула інгібує комплекс IV, блокуючи перенесення електронів (рис.1.4).

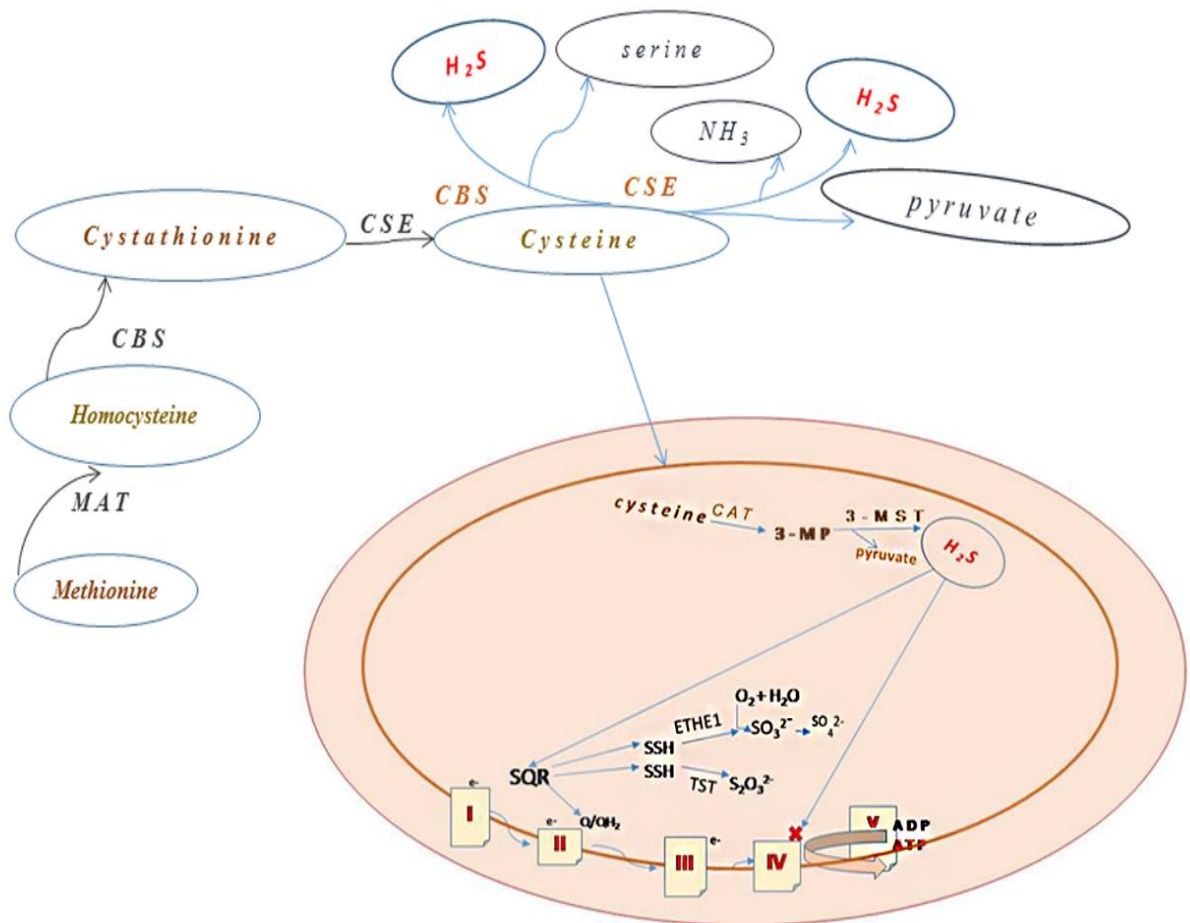


Рис.1.4. Синтез гідроген сульфіді та його роль у дихальному ланцюзі мітохондрій [104]

За умов гіпоксії ензими синтезу гідроген сульфіді здатні транслокуватися в мітохондрії для стимулювання продукції H_2S [103 - 109], де він як донор електронів у мітохондріальному транспортному ланцюзі електронів може впливати на виробництво АТФ. Різносторонній ефект H_2S на біоенергетичну функцію можна застосовувати при ускладненнях багатьох захворювань.

У малих концентраціях (30 мкмоль/л) донор сірководню $NaHS$ викликає чіткий вазоконстрикторний ефект, у високих (>100 мкмоль/л) – релаксувальний. Констрикторний ефект у малих концентраціях здійснюється через гальмування $eNOS$ і цАМФ шляху. Механізм вазодилаторного ефекту [89, 110-116] включає утворення S-нітрозотіолів, відкриття K_{ATP} -

каналів, зменшення вмісту АТФ і гальмування метаболізму, утворення цГМФ, вплив на дію цГМФ-залежної протеїнкінази, відновне поглинення Ca^{2+} .

Враховуючи, що H_2S гальмує дію АФО, і враховуючи провідну патогенну роль оксидативного стресу при багатьох захворюваннях, є цікавим питання, чи може викликати надмірне виробництво АФО дефіцит сірководню та як впливає глутатіон на синтез сигнальної молекули.

Висновки до розділу 1

Узагальнено сучасні наукові дані про механізми ушкодження нирок та методи відтворення експериментальних нефропатій, розглянуто особливості енергетичних процесів за дії активних форм кисню, проаналізовано сучасні відомості про застосування екзогенного глутатіону та його потенційну роль для корекції різноманітних патологій, описано синтез та різносторонні ефекти H_2S , зокрема його вплив на біоенергетичну та антиоксидантну функцію клітин.

З іншого боку, детальний літературний аналіз способів застосування глутатіону, важливість системи енергозабезпечення у попередженні апоптозу та безумовний інтерес науковців до сигнальних молекул вказує на доцільність проведення досліджень гепато- та нефропротекторних властивостей глутатіону, визначення особливостей його впливу на енергетичний обмін та стан системи гідроген сульфід у при експериментальній нефропатії, викликаній високою дозою фолієвої кислоти.

За темою розділу опубліковано:

1. Gerush IV, Ferenchuk YeO. Hydrogen sulfide and mitochondria. Biopolym. Cell. 2019; 35(1): 3-15 [104]

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Модель дисертаційного дослідження

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконані в 2016–2020 роках відповідно до планових науково-дослідних робіт кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці) «Стрес-індуковані морфофункціональні та біохімічні зміни структур хроноперіодичної і гепаторенальної систем у ссавців» (№ державної реєстрації 0114U002472) та “Морфофункціональне і біохімічне обґрунтування дисфункцій нейросекреторних структур головного мозку й ендокринних залоз та гепаторенальної системи шурів при експериментальній патології, у віковому аспекті та шляхи її корекції” (№ державної реєстрації 0119U101346).

Експериментальні дослідження проведено на 131 нелінійному білому статевозрілому шурі-самці масою 160-180 г. Тварин отримували з віварію ВДНЗ України «Буковинського державного медичного університету». Впродовж місяця до експерименту та під час експериментальних досліджень тварин сформованими групами утримували за умов сталої температури (18-22°C), відносної вологості повітря (50-55%) в окремих обмінних клітках на постійному збалансованому режимі харчування з вільним доступом до води та їжі. Контроль за ростом і розвитком тварин проводили шляхом зважування їх на початку, впродовж та наприкінці досліджу.

Всі дослідження виконано відповідно до положень Директиви Європейського союзу 2010/63 EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях [117]. Дотримання зазначених вимог засвідчено висновком

комісії з питань біоетики ВДНЗ України «Буковинського державного медичного університету (протокол № 2 від 20.10.2016 р.).

Для експериментальних досліджень було обрано фолієву кислоту (Sigma-Aldrich) та глутатіон (Sigma-Aldrich).

Експериментальна частина дисертаційної роботи складалася з трьох етапів дослідження.

Нефропатію моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення фолієвої кислоти у дозі 250 мг/кг [118].

Дослідні тварини було поділено на 5 груп:

I – контрольна група тварин;

II – тварини з 3-денною експериментальною нефропатією;

III – тварини з нефропатією, яким інтрагастрально упродовж трьох днів у дозі 100 мг/кг вводили глутатіон [119];

IV – тварини з 7-денною експериментальною нефропатією;

V – тварини з нефропатією, яким інтрагастрально упродовж семи днів у дозі 100 мг/кг вводили глутатіон.

Наявність нефропатії підтверджували на базі лабораторії кафедри патологічної анатомії ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» під керівництвом д.мед.н., проф. І. С. Давиденка методом мікроспектрофотометрії із використанням гістохімічної реакції з бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» протеїни за Mikel Calvo [120]. Для підвищення відтворюваності результатів кількісних досліджень проводили комп'ютерну морфометрію об'єктів у гістологічних препаратах.

Для проведення гістологічного дослідження ділянки нирок, які відбирали для мікроскопії, фіксували впродовж 48 годин у розчині нейтрального забуференого 10% формаліну, після чого проводили процедуру зневоднювання у висхідній батареї етанолу та парафінову заливку при температурі 64°C.

Тварин виводили з експерименту на наступний день після останнього введення антиоксиданта відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту експериментальних тварин (86/609 ЄЕС).

Кров збирали у центрифужні пробірки з гепарином і центрифугували протягом 20 хв при 3000 об/хв, після чого відділяли плазму крові. Печінку обсушували фільтрувальним папером, заморожували і зберігали при температурі -20°C до використання.

2.2. Визначення основних показників протеїнового обміну в крові

Визначення концентрації креатиніну проводили кінетичним спектрофотометричним методом аналізу [121] за модифікованим методом Яффе. Принцип методу – у здатності креатиніну утворювати із пікриною кислотою у лужному середовищі забарвлену в оранжевий колір таутомерну форму пікрату креатиніну, що визначається колориметричним способом.

Визначення концентрації альбуміну проводили за реакцією з бромкрезоловим зеленим [122]. Альбумін утворює з бромкрезоловим зеленим у кислому середовищі забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення комплексу змінюється прямо пропорційно концентрації альбуміну в досліджуваному зразку.

Визначення концентрації сечовини здійснювали ензиматичним уреазним методом, використовуючи реактиви виробництва ПрАТ «Реагент» (Україна).

Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) проводили кінетичним методом [123, 124] без піридоксаль-5-фосфату, що базується на різниці поглинання окисненої та відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотиду.

Активність γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) визначали за реакцією швидкості утворення 5-аміно-3-нітробензоата реагентами фірми «Corma» (Польща).

2.3. Визначення стану оксидантно-антиоксидантної системи у крові та печінці

У крові визначали вміст окисномодифікованих протеїнів, ТБК-активних продуктів, активність супероксиддисмутази, каталази, аланінамінотрансферази, глутатіонпероксидази, вміст церулоплазміну та SH-груп.

Для визначення стану оксидантно-антиоксидантної системи тканини печінки подрібнювали ножицями і, використовуючи скляний гомогенізатор, готували 5% гомогенати на 50 мМ трис-НСІ-буфері (рН - 7,4), які центрифугували протягом 20 хв при 12000 g (центрифуга HERMLE Labortechnik). Всі операції проводили при температурі не вище +4°C.

У постмітохондріальному супернатанті гомогенатів печінки визначали біохімічні показники: вміст ТБК-активних продуктів, окиснювальномодифікованих протеїнів та активність антиоксидантних ензимів печінки: КАТ, SOD, GPx, GST.

Визначення продуктів окисномодифікованих протеїнів (нейтрального (ОМП₃₇₀) та основного (ОМП₄₃₀) складу. У процесі окисної модифікації протеїнів у радикалах залишків аліфатичних амінокислот утворюються альдегідні та кетонні групи, які взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ), утворюючи 2,4-динітрофенілгідразони з характерним спектром поглинання.

Реакційне середовище містило: 0,8 мл 0,9%-го розчину NaCl, 0,2 мл 5%-го постядерного супернатанту гомогенату нирок, 1 мл 1 М розчину 2,4-ДНФГ і 1 мл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти (ТХО). Після інкубації (1 год при 37⁰ С), суміш центрифугували при 1800g впродовж 10-ти хв, а отриманий осад тричі промивали 5%-вим розчином ТХО. До одержаного осаду додавали 5 мл 8М розчину сечовини, проби витримували на водяній бані до моменту розчинення осаду. Оптичну густина проб вимірювали на спектрофотометрі. Альдегідо- та кетопохідні нейтрального характеру

виявляються при довжині хвилі 370 нм, а основного – 430 нм [125].

Враховуючи молярний коефіцієнт екстинкції ($2,1 \times 10^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), знаходили вміст фенілгідразонів нейтрального характеру, який виражали в одиницях оптичної густини (одиницях абсорбції) на г протеїну (Од.Абс./г протеїну).

Визначення вмісту ТБК-активних продуктів. В основі методу лежить реакція між малоновим альдегідом і тіобарбітуровою кислотою, яка при високій температурі та кислому рН проходить із утворенням забарвленого триметинового комплексу [126].

Вміст ТБК-активних продуктів у постмітохондріальному супернатанті гомогенатів тканин печінки визначали таким чином: до 1 мл 10% гомогенату тканини додавали 1,5 мл H_2O , 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти, 0,2 мл 5 мкМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 мл 60% трихлороцтової кислоти і витримували на киплячій водяній бані 10 хв. Проби охолоджували, центрифугували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 532 нм.

Кількість продуктів розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Результати виражали в мкмоль/г тканини печінки.

Хід визначення ТБК-активних продуктів в еритроцитах: у центрифужну пробірку вносили 1,3 мл дистильованої води, 0,2 мл розчину $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (139 мг в 100 мл H_2O) і 0,2 мл еритроцитів тричі відмитих в ізотонічному розчині NaCl . Перемішували скляною паличкою і через 10 хв вносили 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти. Проби перемішували скляною паличкою, через 5 хв вносили 0,3 мл 60% трихлороцтової кислоти та кип'ятили на водяній бані 10 хв. Проби охолоджували, центрифугували при 3000 об/хв 10 хв та визначали оптичну густину при 532 нм.

Розрахунки вмісту ТБК-активних продуктів проводили з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і виражали в нмоль/мл еритроцитів.

Визначення вмісту відновленого глутатіону. Принцип методу заснований на взаємодії GSH із 5,5'-дитіобіс 2-нітробензойною кислотою (реактив Елмана) з утворенням забарвленого в жовтий колір аніону 2-нітро-5-тіобензоату. Збільшення концентрації жовтого аніону в ході даної реакції реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм [127].

Концентрацію GSH в печінці визначали з використанням 5,5'-дитіобіс 2-нітробензойної кислоти за модифікованим методом [128]. Для визначення відновленого глутатіону тканину печінки гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 6,8) у співвідношенні 1:4 (маса/об'єм).

У пробірку вносили 0,6 мл гомогенатів тканин печінки, до якого додавали 0,2 мл 20% розчину сульфосаліцилової кислоти. Проби центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв, після чого 0,2 мл супернатанту переносили в пробірки, що містили 2,25 мл 0,1М трис-НСІ-буфера (рН 8,5) з 0,01 ЕДТА. До отриманої суміші додавали 25 мкл розчину реактиву Елмана. Після забарвлення розчин спектрофотометрували при довжині хвилі 412 нм. Вміст GSH виражали в нмоль/мг тканини печінки.

Визначення вмісту SH-груп проводили за методикою, розробленою І.Ф. Мещишеним та Н.П. Григор'євою [129]. Принцип методу полягає у взаємодії 5,5'-дитіобіс 2-нітробензойної кислоти з вільними SH-групами.

В хімічну пробірку вносили 0,2 мл плазми, 0,1 мл 1н NaOH (старанно перемішували скляною паличкою), 3,7 мл 0,2 М фосфатного буфера рН=8,0 та 0,1 мл реактиву Елмана. Через 10 хв проби спектрофотометрували при 412 нм проти контролю, в який, на відміну від дослідної проби, замість досліджуваного матеріалу вносили 0,2 мл води.

Отримані результати виражали в мкмоль/мл у плазмі крові, а у мітохондріях гепатоцитів – нмоль/мг протеїну.

Церулоплазмін [КФ 1. 16.3.1]. Принцип методу базується на окисненні *n*-фенілендіаміну за участю церулоплазміну. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням фтористого натрію. За величиною оптичної густини

утворених продуктів судили про концентрацію церулоплазміну, яку визначали модифікованим методом Ревіна [130] та виражали в мг/л плазми крові.

Визначення активності супероксиддисмутази (SOD) [КФ 1.15.1.1].

Активність ензиму визначали за ступенем інгібування процесу відновлення нітротетразолію синього у системі феназінметасульфат-NADH⁺-нітротетразолій синій [131].

Супероксиддисмутазну активність визначали за ступенем інгібування процесу відновлення нітротетразолію синього у системі феназінметасульфат-NADH-нітротетразолій синій [132]. В інкубаційне середовище (4 мл) додавали 3,35 мл 16,5 мМ пірофосфатного буферу (рН 8,4), 0,2 мл нітротетразолію синього (1мг/мл), 0,2 мл феназінметасульфату (40 мкг/мл) і 0,05 мл досліджуваного матеріалу. Реакцію запускали 0,2 мл NADH (1,4 мг/мл). Оптичну густину розчину вимірювали через 10 хв на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм. Паралельно проводили реакцію з холостою пробою (не містить супернатанту) і з пробою на реактиви (не містить NADH).

Активність ензиму у постмітохондріальному супернатанті гомогенатів печінки виражали в одиницях активності, розрахованих на 1 мг протеїну; в гемолізаті крові – в одиницях активності, розрахованих на г Нв крові. Одна одиниця активності ензиму відповідає 50% гальмуванню реакції відновлення нітротетразолію за 10 хв.

Визначення активності каталази [КФ 1.11.1.6]. Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H₂O₂. Кількість незруйнованого гідроген пероксиду вимірювали за допомогою молібдату амонію, який з гідроген пероксидом утворює стійкий забарвлений комплекс [133].

До складу інкубаційного середовища входило: 2мл 0,05М тріс-НСl-буфера (рН 7,5), 0,03% розчин H₂O₂, 0,1 мл крові (1:10). Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4% розчину амонію молібдату та вимірювали оптичну

густину проти контролю (вміст інкубаційного середовища такий же, але замість досліджуваного матеріалу додавали тріс-НСІ-буфера (рН 7,5)).

Активність ензиму в гемолізаті крові виражали в мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв} \times \text{л}$ еритроцитів крові.

Визначення активності глутатіонпероксидази [КФ 1.11.1.9]. Про глутатіонпероксидазну активність в центрифугатах гомогенатів тканин печінки та в гемолізатах крові (1:20) судили за кількістю окисненого глутатіону, що утворився з відновленого глутатіону при знешкодженні пероксиду водню в глутатіонпероксидазній реакції.

До складу реакційної суміші входили: 2,7мл тріс-НСІ буферу (50 мМ, рН 7,4; азид натрію 12мМ; ЕДТА 6мМ), 0,1 мл 2,5мМ відновленого глутатіону, 0,1 мл досліджуваного матеріалу. Проводили преінкубацію 10 хв. Реакцію запускали додаванням у проби 0,1 мл 0,5мМ пероксиду гідрогену і зупиняли через 5 хв додаванням 1 мл 10% ТХО. У контрольну пробу ТХО вносили одразу після преінкубації. Після центрифугування при 1800 г протягом 15-ти хв визначали оптичну густину окисненого глутатіону при довжині хвилі 262 нм на спектрофотометрі [134,135].

Активність ензиму в гомогенатах виражали в нмолях утвореного окисненого глутатіону на мг протеїну за хв. В крові активність ензиму виражали в нмолях утвореного окисненого глутатіону на мг Нв крові за хв.

Визначення глутатіон-S-трансферазної активності [КФ 2.5.1.18]. Активність ензиму визначали у постмітохондріальному супернатанті гомогенатів тканин печінки. Методика полягає в спектрофотометричному вимірюванні кількості кон'югату відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який утворився під дією ензиму [136].

До складу реакційної суміші входили: 4,7 мл 0,1 М фосфатного буферу (рН 7,4); 0,1 мл 0,1 М 1-хлор-2,4-динітробензолу; 0,02 мл гомогенату печінки. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл 10 мМ відновленого глутатіону. Оптичну густину утвореного комплексу визначали впродовж наступних 3 хв

на спектрофотометрі при довжині хвилі 346 нм і виражали в нмолях кон'югату за 1 хв на 1 мг протеїну.

2.4. Дослідження стану енергетичного метаболізму у мітохондріальній фракції гепатоцитів

Виділення мітохондріальної фракції гепатоцитів проводили за методом [137]. Печінку промивали охолодженим 0,9% розчином KCl (2-4°C), подрібнювали і гомогенізували у буфері (pH 7,4), який містив 250 ммоль/л сахарози, 25 ммоль/л трис-HCl та 1мМ EDTA. Гомогенат центрифугували при 700 g протягом 10 хв (4°C), а супернатант – при 11 000 g протягом 20 хв (4°C), використовуючи центрифугу HERMLE Labortechnik. Осад ресуспендували в 5 мл того ж буфера (без EDTA) і знову центрифугували при тих же умовах.

Отриманий осад (мітохондріальну фракцію) одразу використовували для дослідження ензиматичної активності дихального ланцюга.

Визначення NADH-дегідрогеназної активності [1.6.5.3] мітохондрій проводили спектрофотометричним методом [138]. В пробірки, які містили 2 мл 0,02 М трисфосфатного буфера (pH 7,4) додавали 0,02 мл мітохондріальної фракції та 100 мкМ NADH. NADH-дегідрогеназну активність визначали за швидкістю окиснення NADH, що реєстрували при довжині хвилі 340 нм за зменшенням оптичної густини протягом 2 хв з інтервалом 20 с.

Активність NADH-дегідрогенази розраховували з урахуванням молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Визначення сукцинатдегідрогеназної активності [КФ 1.3.99.1]. Принцип методу полягає у відновленні ферицианіду калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), розчин якого має жовте забарвлення, до безбарвного фероцианіду калію ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) сукцинатом під дією сукцинатдегідрогенази. Активність ензиму пропорційна кількості ферицианіду.

У центрифужні пробірки вносили по 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,8) та по 0,1 мл розчинів 0,1 бурштинової кислоти, 25 мМ ЕДТА, 150 мМ азиду натрію і дистильованої води. До проб додавали по 0,5 мл суспензії мітохондрій, попередньо обробленої 0,1% розчином тритону X-100, і протягом 5 хвилин інкубували при кімнатній температурі. Реакцію розпочинали додаванням до проб 0,1 мл розчину 25 мМ ферицианіду калію. Проби інкубували протягом 15 хвилин при 30°C. Після інкубації реакцію зупиняли додаванням в проби по 2 мл 20% ТХО.

Контрольні проби готували аналогічно до дослідних, лише ТХО в пробірки вносили перед суспензією мітохондрій. Після охолодження проби центрифугували при 2000 g протягом 15 хвилин для осадження денатурованого мітохондріального протеїну. Супернатант фотометрували при 420 нм. Оптичним контролем слугувала суміш 20% ТХО і 0,1 М фосфатного буфера (1:1). Для визначення вмісту ферицианіду в пробах використовували калібрувальний графік, побудований за результатами фотометрування проб, які містять від 100 до 1000 мкг ферицианіду в 4 мл розчину. За різницю екстинкцій розраховували кількість ферицианіду, відновленого за час інкубації [139].

Сукцинатдегідрогеназну активність розраховували в нмоль сукцинату/хв на 1 мг протеїну.

Визначення цитохромоксидазної [КФ 1.9.3.1] активності мітохондрій. Принцип методу базується на здатності цитохромоксидази окислювати диметилпарафенілдіамін та α -нафтол (реактив НАДИ). При окисленні утворюється кольоровий продукт – індофеноловий блакитний, концентрація якого пропорційна цитохромоксидазній активності [140].

В пробірки вносили по 1 мл субстрату реакції (α -нафтолу, парафенілдіаміну та карбонату натрію у співвідношенні 1:1:1). До реакційної суміші додавали по 0,1 мл суспензії мітохондріальної фракції (в контроль – 0,1 мл H_2O). Інкубували при 37°C 30 хвилин. Після

інкубації додавали в кожную пробірку по 3 мл спирту. Проби центрифугували 10 хвилин при 6000 г. Надосадову рідину спектрофотометрували при λ 550 нм.

Результати виражали в нмоль/хв на 1 мг протеїну.

H⁺-АТФ-азну активність мітохондрій [КФ 3.6.3.14] визначали у інкубаційному середовищі об'ємом 2 мл, яке містило 400 мкмоль трис-НСІ (рН 7,4), 5 мкмоль динатрієвої солі АТФ, 7,5 мкмоль MgSO₄, 5·10⁻² мкмоль 2,4 динітрофенолу, 7,5 мкмоль СаСl₂, 120 мкмоль NaCl, 20 мкмоль КСl [141]. Реакцію розпочинали додаванням 50 мкл суспензії мітохондрій, яка містила 1 мг протеїну, інкубували 15 хвилин при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10% ТХО.

Вміст Рі визначали колориметрично [140]. Про H⁺-АТФ-азну активність судили за накопиченням неорганічного фосфату і виражали в нмоль Рі за 1 хв на 1 мг протеїну.

2.5. Визначення показників системи обміну гідроген сульфїду

Визначення вмісту H₂S у плазмі крові. Вміст H₂S визначали спектрофотометричним методом, що ґрунтується на реакції між сульфїд-аніоном та кислим розчином N,N-диметил-*n*-фенїлендіамїну у присутності хлориду залїза (III) [142]. В пробірку, до 0,1 мл плазми додавали 0,5 мл 1% ацетату цинку і 2,5 мл дистильованої води. Потім вносили 0,5 мл 20 мМ N,N-диметил-*n*-фенїлендіамїну в 7,2 М НСl і 0,4 мл 30 мМ FeCl₃ в 1,2 М НСl. Суміш інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Після інкубації протеїни в плазмі осаджували 1 мл 10% трихлороцтової кислоти з подальшим центрифугуванням. Оптичну густину надосадової рідини вимірювали при довжині хвилі 670 нм на спектрофотометрі проти контрольної проби, в якій замість плазми крові брали 0,1 мл води. Вміст сульфїд-аніону в пробі розраховували за калїбрувальним графіком.

Стандартом слугували водні розчини $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, США) з концентрацією 31,2-3120 мкМ.

Вміст H_2S в плазмі крові виражали в нмоль/мл.

Для визначення показників системи гідроген сульфід у печінці (концентрації та продукції H_2S , активності ензимів CSE, CBS та CAT) тканину гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері (pH 6,8) у співвідношенні 1:4 (маса/об'єм). Отримані гомогенати печінки центрифугували при 12000 g протягом 20 хв при температурі 4 °С.

Визначення концентрації та продукції H_2S у печінці. Для вимірювання концентрації H_2S відбирали 200 мкл гомогенатів тканин і додавали в центрифужні пробірки, що містили 1% ацетат цинку для уловлювання H_2S . Через 5 хв реакцію зупиняли додаванням 400 мкл N, N-диметил-*n*-фенілендіаміну (20 мкМ у 7,2 М HCl) і 400 мкл FeCl_3 (30 мМ 1,2 М HCl). Після того, як суміш інкубували у темряві протягом 20 хв, додавали 300 мкл 10% трихлороцтової кислоти для осадження протеїнів, які можуть бути присутні в гомогенатах тканин. Потім суміш центрифугували при 10,000 g протягом 10 хв. H_2S у гомогенатах тканин, взаємодіє з N,N-диметил-*n*-фенілендіаміном з утворенням метиленового синього, оптичну густину отриманого розчину визначали спектрофотометрично при 670 нм.

Концентрацію H_2S у гомогенатах тканин обчислювали на основі калібрувальної кривої стандартних розчинів H_2S . Концентрацію H_2S виражали в нмоль/мг тканини печінки.

Для визначення продукції H_2S у пробірки, що містили реакційну суміш (100 мМ калій-фосфатний буфер (pH 6,8), 10 мМ L-цистеїн, 2 мМ піридоксаль 5'-фосфат і 10% гомогенат тканин печінки), вносили 0,5 мл 1% ацетату цинку, накривали фільтрувальним папером (2 × 2 см), попередньо зануреним в рідкий азот та інкубували при 37°C протягом 90 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 50% трихлороцтової кислоти і інкубували при 37°C протягом ще 60 хв. До вмісту пробірок додавали 3,5 мл води. Потім

вносили 0,5 мл 20 мМ N, N-диметил-*n*-фенілендіаміну в 7,2 М HCl і 0,5 мл 30 мМ FeCl₃ в 1,2 М HCl.

Через 20 хв вимірювали поглинання при 670 нм за допомогою спектрофотометра [143, 144].

Рівень продукції H₂S виражали в нмолях H₂S на мг протеїну за хв.

Визначення активності H₂S синтезуючих ензимів цистатіонін-γ-ліази [КФ 4.4.1.1], цистатіонін-β-синтази [КФ 4.2.1.22] і цистеїнамінотрансферази [КФ 2.6.1.3]. До 50 мкл надосадової рідини гомогенатів тканин печінки додавали 2 мл 0,25 М Трис HCl (pH 8,5), 1 мл піридоксаль-5-фосфату і 1 мл H₂O. Для визначення активності ензимів використовували інкубаційні середовища. Для ензиму CSE, реакційна суміш містила 1 мл 20 мМ гомоцистеїну, для CBS 1 мл 20 мМ L-цистеїну, для CAT 1 мл α-кетоглутарату. Суміш інкубували при 37°C протягом 30 хв в пластикових пробірках, закритих парафільмом. Реакцію зупиняли додаванням 1% ацетату цинку для зв'язування H₂S, після чого додавали 10% ТХО для осадження протеїнів. Далі в реакційну суміш вносили N, N-диметил-*n*-фенілендіаміну в 7,2 М HCl відразу ж з подальшим додаванням FeCl₃ в 1,2 М HCl. Оптичну щільність отриманого розчину вимірюють при 670 нм [143]. Активність H₂S синтезуючих ензимів виражали в нмолях H₂S на мг протеїну за хв.

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [145]. Принцип методу ґрунтується на утворенні біуретового комплексу, який у присутності реактиву Фоліна дає синє забарвлення, інтенсивність якого прямопропорційна вмісту протеїну. Визначення проводили за набором для визначення вмісту протеїну за методом Лоурі фірми SIMKO Ltd, Україна.

Усі вимірювання проводили на спектрофотометрі Agilent Cary 60.

У роботі використані нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (окиснена форма), глутатіон (окиснений і відновлений), трис-гідроксиметиламінометан, L-цистеїн, L-цистин, D,L-гомоцистеїн, L-цистатіонін, α-кетоглутарат,

дитіотрейтол, піридоксальфосфат і L-серин, сульфід натрію, N,N-диметил-n-фенілендіамін (Sigma-Aldrich, США), набір для визначення протеїну (SIMKO Ltd, Україна), набір виробництва ПрАТ «Реагент» (Україна) для визначення сечовини, набір для визначення ГГТ фірми «Comau» (Польща).

Інші використані реактиви – вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч. чи ч.д.а.

Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel* за допомогою непараметричного критерія Вілкоксона [146]. Усі дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$).

Результати вважалися достовірними при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

СТАН ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА ОСНОВНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРОТЕЇНОВОГО ОБМІНУ В КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ НЕФРОПАТІЇ І ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ

Нефротоксична дія багатьох токсичних хімічних сполук та лікарських засобів часто має локальний характер: більшість нефропатій [3, 147] супроводжуються прогресивним запаленням гломерул, що зрештою призводить до їх лізису.

Завданнями цього розділу було вивчення показників оксидантно-антиоксидантної системи і протеїнового обміну крові щурів за умов експериментальної нефропатії та дослідження можливості їх корекції шляхом внутрішньошлункового введення глутатіону впродовж 3 та 7 днів.

3.1. Біохімічні показники сироватки крові за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону

Особливу увагу при діагностуванні захворювань нирок приділяють рівню виділення продуктів азотного обміну: креатиніну і сечовини, а також продуктів протеїнового обміну. Проведені нами дослідження показали, що в процесі розвитку нефропатії, викликаній введенням фолієвої кислоти, в крові експериментальних тварин спостерігається накопичення азотовмісних сполук, на що вказує збільшення рівня креатиніну в сироватці крові на третю добу експерименту на 59% порівняно з контрольною групою тварин (табл. 3.1), що підкреслює погіршення фільтраційної функції і здатності нирок до виведення з кровотоку продуктів азотного обміну.

На сьому експериментальну добу відбулося компенсаторне відновлення функції нирок – рівень креатиніну зростав лише на 30%. Зміни

вмісту креатиніну дозволяють використовувати цей показник для раннього діагностування стану нирок та підтвердження моделі нефропатії.

На третю експериментальну добу за умов застосування глутатіону у тварин, яким викликали нефропатію введенням фолієвої кислоти, рівень креатиніну був на 16% нижче, ніж у групі тварин, яким глутатіон не вводили, але показник все ж удвічі перевищував показники контрольної групи.

Семиденне введення екзогенного глутатіону приводило до нормалізації показників креатиніну у сироватці крові експериментальних тварин до показників, отриманих у групі контролю, що вказує на відновлення функціональної активності нирок та активності виведення продуктів азотистого обміну.

На третю добу експерименту за умов фолієвої нефропатії, викликаній дозою 250 мг/кг, у сироватці тварин дослідної групи змінювався вміст сечовини, який був вищим на 27%, а на 7 день – на 15% у порівнянні з групою контролю (табл. 3.1). Відомо, що концентрація сечовини збільшується внаслідок посиленої пасивної реабсорбції у ниркових каналцях.

При порівнянні показників контрольної групи та груп, яким вводили глутатіон, на 3 та 7 доби після моделювання захворювання встановлено, що у тварин з нефропатією, яким вводили глутатіон, вміст сечовини наближався до показників контрольної групи тварин, що свідчить про нормалізацію фільтраційної здатності нирок щодо виведення ними продуктів азотистого обміну.

Концентрація сечовини в сироватці часто використовується як показник контролю функції гломерулярного апарату нирок, і підвищується при послабленій видільній функції нирок. Креатинін фільтрується через базальну мембрану клубочків нирок і в нормі в тубулярному відділі нефрону не реабсорбується. За умов підвищеної концентрації креатиніну в крові його частину активно екскретують клітини тубулярного епітелію.

Таблиця 3.1

Значення основних біохімічних показників у сироватці крові щурів за умов нефропатії та застосування глутатіону ($M \pm m$)

Група Показник	Контроль n=36	Нефропатія 3 день, n=25	Нефропатія + глутатіон, 3 день, n=23	Нефропатія 7 день, n=24	Нефропатія + глутатіон, 7 день, n=23
Загальний протеїн, г/л	62,6±0,26	53,54±0,42**	56,63±0,35*#	53,68±0,54*	57,85±0,34*#
Креатинін, мкмоль/л	7,3±0,56	17,56±0,18*	15,11±0,05*#	9,54±0,3*	7,35±0,20*#
Альбумін, г/л	35,95±0,78	35,65±3,43	36,41±1,90	31,17±0,67*	32,86±1,13*
Сечовина, ммоль/л	6,08±0,05	7,7±0,59*	6,27±0,13#	6,97±0,15	6,2±0,03#
ГГТ, У/л	16,36±1,32	21,42±2,18*	19,22±2,61	17,62±2,49	19,99±1,47*
АЛТ, У/л	95,6±7,10	166,35±7,10**	58,91±7,72*#	75,75±8,11*	55,4±5,34*##

Примітка.

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,01$.

Підвищені рівні креатиніну та сечовини в крові також спостерігаються за умов ниркової недостатності. Ці показники використовуються для оцінки швидкості клубочкової фільтрації [148].

Такі зміни зумовлені тим, що фолієва кислота є однією із типових сполук, що використовуються для моделювання захворювань нирок [5, 6, 149]. Висока концентрація фолієвої кислоти проявляє загальну токсичну дію на організм, особливо на нирки.

У проксимальному відділі нефрону відбуваються основні процеси реабсорбції профільтрованих клубочками токсичних речовин, протеїнів, більшої частини води, електролітів тощо. Первинне ушкодження епітелію проксимальних каналців із подальшим розповсюдженням тубуло-інтерстиціальної дезінтеграції на кіркову, мозкову речовину і сосочки нирки є головною ланкою хронізації нефропатій зі зниженням концентраційної здатності нирок [150-152].

На початковому етапі формування нефропатії спостерігалось зростання активності АЛТ у сироватці на 75 %. Значне підвищення ензиматичної активності свідчить про токсичний вплив високих доз фолієвої кислоти на печінку (табл. 3.1).

На третю добу розвитку нефропатії також спостерігається зростання активності γ -глутамілтранспептидази на 30%, а семиденна патологія не характеризується значним зростанням активності досліджуваного ензиму.

Активність γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) в сироватці крові використовується для оцінки стану печінки, і отриманий нами результат підтверджує токсичне ураження печінки на початковій стадії формування нефропатії, спровоковане уведенням високої дози фолієвої кислоти. Застосування глутатіону знижує активність ензиму, що пояснюється участю трипептиду в детоксикаційних процесах.

Про загальну інтоксикацію організму під впливом високої концентрації фолієвої кислоти свідчить зниження протеїнсинтезувальної функції печінки: концентрація загального протеїну плазми крові дослідних тварин на 17% знижувалася протягом всього експериментального періоду, при цьому концентрація альбуміну на початковому етапі експерименту не змінювалася (табл. 3.1), і знижувалася на 16% на 7-й день дослідження, що може бути пов'язано з дисбалансом синтезу глобулінової фракції і перерозподілом вмісту багатьох гострофазових протеїнів.

За умов застосування глутатіону концентрація загального протеїну та альбуміну зростала, але не досягала значень, отриманих у контрольній групі тварин.

3.2. Зміни оксидантно-антиоксидантного стану в крові за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону

За допомогою морфометричного аналізу було встановлено, що швидка поява кристалів фолієвої кислоти всередині ниркових каналців спричиняє зміну епітелію, запальну клітинну інфільтрацію, викликає некроз та появу кортикальних рубцювань.

Пошкодження епітелію проксимальних каналців з подальшим поширенням призвело до зниження фільтруючої здатності нирок. Зміни (рис. 3.1), які спостерігалися на третій експериментальний день, були пов'язані із специфічним об'ємом епітеліальних клітин проксимальних каналців нирки.

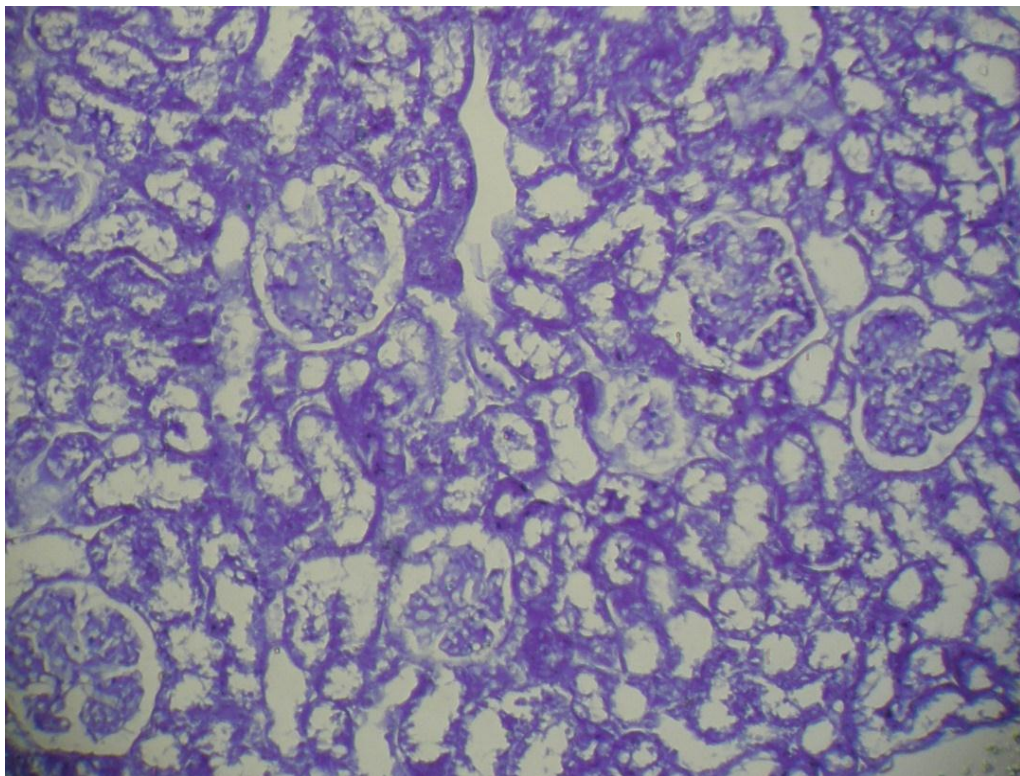


Рис. 3.1. Кіркова речовина нирки щура з нефропатією, викликаною фолієвою кислотою. Забарвлення бромфеноловим синім за Mikel Calvo. Об.20х. Ок.10х (збільшено у 200 разів)

За умов патології питомий об'єм епітеліоцитів проксимальних каналців у стані альтерації у середньому становив 84,8%, зростала окисна модифікація протеїнів (згідно коефіцієнту R/B при забарвленні бромфеноловим синім за Mikel Calvo, рис. 3.1), знижувався вміст глікогену.

У проксимальному відділі нефрону відбуваються основні процеси реабсорбції профільтрованих клубочками токсичних речовин, протеїнів, більшої частини води, електролітів, тому пошкодження епітелію проксимальних каналців із подальшою проліферацією тубуло-інтерстиціального розпаду на усі шари нирок призвело до зниження фільтруючої здатності нирок.

Активні форми оксигену, рівень яких зростає за умов нефропатії, викликають окисну модифікацію протеїнів (ОМП). Підвищення рівня пероксидного окиснення протеїнів є однією з ланок розвитку патологічних станів внаслідок окисного стресу. Вважають, що деструкція протеїнів є більш показовою при окиснювальних пошкодженнях тканин, ніж пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), оскільки продукти ОМП є стабільнішими порівняно з продуктами ПОЛ.

Ступінь ОМП в крові нами було оцінено за рівнем альдегідних та кетонних похідних нейтрального (ОМП₃₇₀) та основного (ОМП₄₃₀) складу. Рівень ОМП₃₇₀ у щурів з нефропатією був вищим на 36% на 3-й день експерименту порівняно з контрольними щурами.

ОМП пов'язана з пошкодженням як поліпептидного ланцюга, так і окремих амінокислот з утворенням декількох типів радикалів. Процес ОМП має складний та специфічний характер, який встановлюється амінокислотним складом протеїнів. Саме ОМП відіграє провідну роль у балансі між синтезом та деградацією простих і складних протеїнів, які визначають здатність клітин генерувати та виробляти регуляторні імпульси, здійснювати рецепторну, медіаторну та енергетичну функції [153]. ОМП може сприяти змінам залишків амінокислот або зміні валентності та

координації металів, що призводить до порушення структури протеїну та полегшення процесів протеолізу. Збільшення концентрації реакційноздатних видів кисню супроводжується блокуванням та розпадом основних ензимів антиоксидантної системи.

При інтенсифікації процесів утворення пероксиду та окисній модифікації макромолекул відбувається інактивація антиоксидантних ензимів, що призводить до виснаження антиоксидантної системи захисту, зменшення кількості антиоксидантних речовин та загибелі клітин через деполімеризацію мембрани [154, 155].

Глутатіон знижував рівень ОМП₃₇₀ на 24% на 3 день експерименту порівняно з групою тварин, яким трипептид не вводили. За результатами нашого дослідження показники ОМП альдегідних та кетонних похідних нейтрального характеру протягом 7 днів не зазнавали значних змін (табл. 3.2).

Рівень ОМП₄₃₀ у крові щурів з нефропатією на 3-й день експерименту був вищим на 14,6%, ніж у контрольних щурів. У тварин з нефропатією на сьомий день активація процесів ОМП підтверджується збільшенням (32,6%) показників альдегідних та кетонних похідних основного характеру в сироватці крові. Таким чином, інтенсивність ОМП може бути маркером ступеня пероксидних процесів і фактором, що впливає на стан антиоксидантної системи.

Глутатіон знижував рівень ОМП₄₃₀ до контрольних значень на 14% на третій день та на 15% на сьомий день експериментального періоду порівняно з групою тварин без введення трипептиду. Зниження вмісту ОМП вказує на відновлення рівноваги між процесами окиснення молекул протеїнів та активності протеаз.

Таблиця 3.2

Стан оксидантно-антиоксидантного балансу в крові щурів за умов нефропатії та застосування глутатіону (M±m)

Група / Показник	Контроль n=36	Нефропатія 3 день, n=25	Нефропатія + глутатіон, 3 день, n=23	Нефропатія 7 день, n=24	Нефропатія + глутатіон, 7 день, n=23
H ₂ S, мкмоль/л	75,05±1,05	53,9±1,14**	61,66±2,52 [#]	58,22±1,97**	64,65±2,63 [#]
Церуло- плазмін, мг/л	180,47±5,72	233,5±14,7**	186,1±18,5	314±23,02**	205,7±19,8 ^{##}
ТБК-ап, мкмоль/л	4,34±0,24	5,37±0,31**	4,92±0,54	5,6±0,17**	4,31±0,23 ^{##}
ОМП ₃₇₀ мМ/г протеїну	0,641±0,014	1,005±0,030**	0,769±0,030 ^{##}	0,774±0,050**	0,652±0,010
ОМП ₄₃₀ мМ/г протеїну	0,358±0,010	0,410±0,010**	0,354±0,020 [#]	0,52±0,040**	0,446±0,030 [#]
SH-групи, мкмоль/л	2,49±0,06	1,82±0,11**	2,2±0,11 [#]	2,25±0,16**	2,48±0,102 [#]
КАТ, мкмоль/хв/л	13,17±0,41	10,5±0,3**	12,46±0,24 ^{##}	10,6±0,53**	11,25±0,60
GPx, нмоль/хв/мг Hb	6,93±0,36	4,34±0,80*	6,66±0,48 [#]	5,74±0,13*	6,85±0,48 [#]
SOD од/мг Hb	1,913±0,050	1,742±0,090	1,968±0,080	1,749±0,020**	1,801±0,060

Примітка.

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, p<0,05;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, p<0,01;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p<0,05;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, p<0,01.

З літературних джерел відомо [151, 155, 156, 157], що процес окиснення протеїнів відбувається у тканинах організму постійно та виступає

одним із факторів регуляції мультикаталітичних протеаз, які вибірково руйнують модифіковані протеїни. При старінні та інших патологічних станах процес деградації окиснених протеїнів, як правило, порушується. ОМП зумовлює денатурацію і гідрофобність протеїнів, що є "сигналом" для їх внутрішньоклітинного протеолізу, і вважається однією з адаптаційних реакцій організму, та направлена на виживання організму за екстремальних умов.

Посилений окислювальний стрес змінює ліпіди та ліпопротеїни, викликаючи істотні зміни їх біологічних властивостей. Збільшення концентрації АФО, які вступають у реакції із залишками ненасичених жирних кислот фосфоліпідів, призводить до розвитку й розгалуження ланцюгових реакцій вільнорадикального окиснення біомолекул у біологічних мембранах. За цих умов як у клітинах, так і позаклітинному середовищі зростає вміст первинних та кінцевих (ТБК-ап) продуктів вільнорадикальних реакцій; утворюються інші активні радикали (спирти, альдегіди, кетони тощо), здатні ковалентно взаємодіяти з функціональними групами протеїнів, викликаючи полімеризацію та модифікацію амінокислотних залишків, і, як результат – ОМП, зміна активності ензимів, порушення структурних та функціональних властивостей клітинних мембран.

Вільно-радикальне пероксидне окислення утворює ряд продуктів, які є результатом взаємодії вільних радикалів як між собою, так і з біологічними макромолекулами [156, 159, 160], що призводить до їх полімеризації і руйнування амінокислотних залишків, особливо які містять SH-, CH₃-, NH-групи. Усе це може викликати модифікацію ензимів, зміну їх активності, руйнування біоантиоксидантів (вітамінів, убіхінону, глутатіону, стероїдних гормонів тощо), зумовлювати зміну фосфоліпідного складу, появу продуктів окислення, які ініціюють процеси іонного транспорту, зміну конформації протеїнів і ліпідного складу, а звідси – зміну або руйнування структурних і функціональних властивостей мембран.

Нами було досліджено вміст ТБК-активних продуктів – кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які утворюють полімерні молекули з протеїнами і фосфоліпідами, що провокує зниження проникності мембран, погіршення активності мембранних ензимів і швидкості обміну фосфоліпідів.

Виявлено, що інтенсивність утворення ТБК-активних продуктів збільшується на 21% на 3 день та на 22,5% на 7 день, що вказує на посилення оксидативного стресу за умов нефропатії.

Під час патології порушується рівновага оксидантної та антиоксидантної системи організму із зсувом у бік активації пероксидного окиснення ліпідів. Одночасне зменшення активності антиоксидантних ензимів і виснаження неензиматичної ланки антиоксидантного захисту клітин при нефропатії зумовлює структурні перебудови мембран та зміни їх фізичного стану, що є несприятливою умовою для функціонування органів та систем на належному рівні. На 7 день експериментального періоду уведений тваринам антиоксидант приближує рівень ТБК-активних продуктів до контрольного значення, що свідчить про здатність трипептиду зменшувати інтенсивність ПОЛ.

Церулоплазмін, металоензим, діє як антиоксидант завдяки своїй активності як фероксидаза – запобігає утворенню токсичних іонів заліза та гальмує початок пероксидного окиснення ліпідів, завдяки чому захищає клітинні мембрани від пошкоджень. У літературних джерелах [161, 162] описано, що церулоплазмін володіє оксидазною активністю, бере участь у окисно-відновних реакціях, впливає на інтенсивність окиснення заліза та біогенних амінів, відіграє роль «позаклітинної супероксиддисмутази», знешкоджуючи супероксидні аніони в позаклітинному середовищі, пригнічує ліпідну пероксидазу. Для окиснення заліза церулоплазміном, на відміну від неензимного окиснення Fe^{2+} за наявності кисню, не характерне утворення супероксидного аніон-радикала, який є пусковим продуктом

вільнорадикальних реакцій та процесів ПОЛ. Церулоплазмін має здатність знешкоджувати супероксидні аніон-радикали, тому в окисних реакціях за участю йонів феруму виступає антиоксидантом.

Коливання вмісту церулоплазміну в плазмі крові відбувається при різних патологічних станах, зокрема синтез ензиму посилюється у відповідь на гіпоксію, при зростанні кількості прозапальних цитокінів, у результаті активації транскрипції гена церулоплазміну.

Нами було досліджено рівень церулоплазміну в сироватці крові з метою його оцінки в якості біомаркера прогресування нефропатії, спричиненої фолієвою кислотою. У період спостереження рівень церулоплазміну був більшим у щурів з нефропатією, ніж у контрольній групі. Рівень церулоплазміну в сироватці крові у тварин з нефропатією збільшувався на 28% та 43% протягом 3 та 7 експериментальних днів відповідно. Максимальне зростання церулоплазміну спостерігається в період загострення нефропатії, на 7 добу експерименту, що дозволяє використовувати сироватковий церулоплазмін у ролі біомаркера для встановлення першої стадії захворювання нирок та фази загострення нефропатії.

Протекторну дію глутатіону в сироватці крові підтверджує приближення рівня церулоплазміну до контрольного показника на третю експериментальну добу та зниження вмісту протеїну на 35% на сьомий день експериментального періоду порівняно з групою тварин без введення глутатіону.

SH-групи – хімічно активні групи протеїнів, які відіграють важливу роль у процесах клітинного дихання, реакціях окисного фосфорилування, регуляції мембранної проникності, є частиною активних центрів багатьох ензимів та коензимів (визначають їх каталітичну активність), і також активно беруть участь у підтримці третинної структури протеїнів. За кількістю SH-груп можна судити про метаболічну активність ензимів. SH-групи мають

антиоксидантні властивості, значну реакційну здатність у окислювально-відновних реакціях, а їх кількість зменшується окислювальним стресом, що виникає внаслідок порушення рівноваги між виробництвом вільних радикалів та механізмами антиоксидантного захисту. Окислення протеїну може відбуватися через окислення цистеїну сульфгідрилу (SH-групи), що призводить до утворення дисульфідних зв'язків між двома його молекулами. Сульфгідрильні групи протеїнів не тільки виконують каталітичну функцію, але й захищають протеїни від згубної дії несприятливих факторів навколишнього середовища [163]. Зниження вмісту сульфгідрильних груп у крові є діагностичним критерієм та характерною метаболічною ознакою гострої гіпоксії.

Оскільки протеїни є основною мішенню для АФО, цистеїн та глутатіон відіграють важливу роль у захисті їх від ендогенних активних видів кисню. Їх сульфгідрильні групи легше окислюються, ніж SH-групи протеїнів, захищаючи самі протеїни від процесу окисної модифікації.

Нами встановлено, що рівень SH-груп у крові щурів із нефропатією був нижчим на 26% на 3-й день та на 9% на 7-й день експерименту порівняно зі значеннями контролю.

Оскільки співвідношення відновленого та окисненого глутатіону визначає внутрішньоклітинний окисно-відновний потенціал, й для попередження значних змін у окисно-відновній рівновазі окиснений глутатіон активно експортується з клітини або реагує з протеїновою сульфгідрильною (-SH) групою, що зумовлює утворення змішаного дисульфіду – основного інструменту глутатіону для реалізації антиоксидантної та детоксикаційної дії.

Введений екзогенний глутатіон відновив вміст SH-груп до показника контролю як на 3 день, так і на 7 день експериментального періоду. Вільна SH-група трипептиду як сильний нуклеофіл зв'язує електрофіли, а гідрофобні центри антиоксиданту нековалентно з'єднуються з ліпофільними

сполуками, запобігаючи їх зануренню у ліпідні шари мембран. Взаємодія глутатіону із ксенобіотиками здійснюється різними способами: шляхом кон'югації субстрату з GSH; нуклеофільним заміщенням; відновленням органічних пероксидів до спиртів.

За умов розвитку нефропатії активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту також змінюється. Стан антиоксидантної системи крові оцінювали за активністю таких ензимів як каталаза (КАТ), супероксиддисмутаза (SOD) та глутатіонпероксидаза (GPx).

Каталаза, яка відповідає за відновлення H_2O_2 до води, експресується в більшості клітин, органів і тканин і у високій концентрації в печінці та еритроцитах, може бути ключовим ензимом антиоксидантного захисту в нирках під час травми. Для клітин підтримка активності каталази має велике значення, оскільки накопичення пероксиду водню запускає каскад реакцій вільнорадикального окиснення поліненасичених жирних кислот ліпідів, провокуючи ушкодження мембран, порушення метаболічних шляхів та активуючи апоптичні процеси.

Після введення фолієвої кислоти спостерігалось зниження активності каталази у щурів з нефропатією на 25% протягом обох експериментальних днів порівняно з тваринами контрольної групи. Введення глутатіону викликало підвищення активності каталази на 15% на третю добу порівняно з групою без введення антиоксиданта. Достовірних змін на сьомий експериментальний день виявлено не було.

Знижена активність каталази у відповідь на розвиток нефропатії може уповільнити захист від вільних радикалів і призвести до посилення пероксидного окислення ліпідів та протеїнів.

Супероксиддисмутаза – антиоксидантний ензим, який здійснює дисмутацію супероксид-аніон радикалів і підтримує їх вміст на безпечному рівні, забезпечуючи цим гомеостаз у клітині й організмі. Результати нашого дослідження показали, що активність супероксиддисмутази за умов

експерименту змінювалася, але значні зміни спостерігалися лише у групі тварин з нефропатією на сьомий день патології (табл. 3.2).

Глутатіонпероксидаза (GPx) є важливим ензимом, що містить селен, який знижує вміст пероксиду водню та захищає від окислювального стресу [164, 165]. Ензим синтезується переважно в нирках, і зниження активності глутатіонпероксидази у крові є одним із показників захворювань нирок.

Значною мірою антиоксидантна функція глутатіону здійснюється завдяки GPx, яка зменшує утворення пероксиду гідрогену і пероксидів ліпідів, коли відновлений глутатіон перетворюється на окислену форму, з утворенням глутатіонових кон'югатів. Органічні пероксидази теж можуть знешкоджуватися за допомогою GPx та GST. При інгібуванні глутатіон-залежних ензимів відбувається окисна модифікація низькомолекулярних тіолів, утворення гомоцистеїну і, як наслідок, порушення транспорту оксиду азоту з утворенням цитотоксичних похідних, які посилюють окиснення тіолів.

Результати нашого дослідження продемонстрували зниження активності глутатіонпероксидази на 40% на 3 експериментальний день та на 20% на 7 день експерименту порівняно з контрольними щурами. Одночасне зниження активності як GPx, так і каталази робить нирки більш вразливими до окислювального стресу, спричиненого фолієвою кислотою. Введення глутатіону збільшує активність ензиму, прирівнюючи показники до контрольного значення протягом усіх експериментальних днів порівняно з групою тварин без введення трипептиду.

Отже, про зниження ензиматичної ланки антиоксидантного захисту при нефропатії свідчило зниження активності каталази та GPx у плазмі крові тварин. Отримані нами результати співзвучні з даними інших дослідників, результати роботи яких [10, 46] свідчили про порушення антиоксидантної ланки у крові при патології нирок.

Відомо, що H_2S бере участь у відновлювальному гомеостазі та антиоксидантних реакціях, регуляції запальних процесів, продукуванні АТФ. Гідроген сульфід є ендogenousним модулятором адгезії лейкоцитів до судинного ендотелію [88 - 90]. При оксидативному стресі молекула здійснює регуляцію реакцій запалення, сприяє вазодилатації, виживанню нейронів: впливає на життєздатність клітин, їх проліферацію, секрецію та активацію цитокінів.

Рівень H_2S у крові щурів з нефропатією був нижчим за показник контрольної групи тварин на 35,5% на 3-й день та на 25,7% на 7-й день експерименту відповідно, і асоціювався зі специфічним об'ємом епітеліальних клітин проксимальних каналців нирки. Глутатіон збільшив рівень газотрансмітера у плазмі крові щурів на 14,3% на 3-й і на 11% на 7-й день експериментального періоду порівняно з групою тварин без введення антиоксиданта.

Раніше науковцями було продемонстровано [97, 106], що H_2S захищає клітини від окислювального стресу шляхом збільшення ендogenousної продукції GSH. Можна припустити, що цистеїн, присутній у глутатіоні, використовується у реакціях синтезу сірководню, і наш експеримент підтверджує цю гіпотезу.

Ми вважаємо, що цистеїн, присутній у глутатіоні, може діяти через його ензиматичний розпад для отримання сірководню, який відіграє опосередковану роль в антиоксидантній здатності клітин завдяки його сигнальним функціям. Крім того, глутатіон при ушкодженому метаболізмі утворює менш токсичні кон'юговані сполуки.

Результати біохімічних досліджень крові показують, що тварини із захворюваннями нирок мають порушення антиоксидантної системи крові, на що вказують зниження активності глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази та каталази, зниження рівня концентрації H_2S та SH-груп, збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, рівнів ОМП і вмісту церулоплазміну.

Дисбаланс між активацією вільнорадикального окиснення макромолекул та роботою системи антиоксидантного захисту може прискорювати розвиток різних патологічних процесів, які лежать в основі захворювань нирок. Посилення оксидативних процесів є провідним механізмом у розвитку супутніх захворювань печінки за умов захворювань нирок.

Проведені дослідження підтверджують наявність захисних та антиоксидантних властивостей глутатіону за умов патології нирок. На нашу думку, екзогенний глутатіон підвищенням рівня SH-груп та вмісту сірководню сприяє корекції активності глутатіонпероксидази та опосередковано позитивно впливає на активність інших антиоксидантних захисних ензимів зниженням вмісту ТБК-активних продуктів, рівня окисної модифікації протеїнів і церулоплазміну.

Отримані дані свідчать про потенційну корисність введення GSH для зменшення ускладнень нефропатії. Основна функція введеного антиоксиданту полягає в пригніченні пероксидного окислення ліпідів, що відбувається в плазматичній мембрані і пошкоджує структуру та проникність мембран. Однією з ключових функцій глутатіону є інактивація та детоксикація активних видів кисню, інших окислювальних молекул та деяких лікарських засобів, екзогенних хімікатів та токсинів. Оскільки GSH вичерпується в цих реакціях, щоб підтримувати життєздатність клітин і органів, його кількість повинна постійно поповнюватися.

Висновки до розділу 3

У розділі досліджено біохімічні зміни в крові, які відбуваються за умов нефропатії, викликаній фолієвою кислотою, та можуть використовуватися для діагностування стану нирок і підтвердження моделі нефропатії. Встановлено тісний взаємозв'язок між оксидант-антиоксидантною системою крові та розвитком нефропатії.

Семиденне введення глутатіону прирівнювало показники креатиніну, сечовини, ОМП₃₇₀, рівень ТБК-ап та SH-груп, а також активність GPx експериментальних тварин до показників, отриманих у групі контрольних щурів, що, очевидно, відбувається шляхом відновлення структури тканин нирок: клубочкового апарату, епітелію каналців нирок, а також відновлення реабсорбційної та фільтраційної здатності нирок.

Антиоксидант регулює метаболізм через GSH-залежні шляхи та H₂S, проявляючи свою антиоксидантну властивість та детоксикаційні функції.

Результати власних досліджень розділу викладено у публікаціях та апробовано на наукових форумах:

1. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Ференчук ЄО. Вплив глутатіону на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Мед. і кл. хімія. 2018; 3: 27-32. doi: 10.11603/mcch.2410 681X.2018.v0.i3.9552 [165]
2. Ferenchuk Ye, Gerush I, Grigorieva N. Effect of glutathione on oxidant-antioxidant system and the content of hydrogen sulphide in the blood by experimental nephropathy. PharmacologyOnline. 2020 Apr 30; 1: 113-120 [166]
3. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Дікал МВ, Ференчук ЄО, Чернюх ОГ. Спосіб корекції біохімічних показників сироватки крові при експериментальній нефропатії у щурів. Пат. № 9668/ЗУ/20, Україна, МПК (2020.01) А61В 5/00 А61К 31/00 А61Р 13/00 G09В 23/28. № u 2019 11811; заявл. 11.12.2019; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14 [167]
4. Gerush I, Ferenchuk Ye. Effects of 3 days glutathione introduction on the activities of antioxidant enzymes in the blood of rats with nephropathy. 8th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry; 18-20 September 2017, Poland; Lublin; 2017. p. 47 [168]
5. Ferenchuk Ye. Glutathione influence on biochemical indices of serum in experimental nephropathy. Матеріали 100-ї підсумкової наукової

конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11, 13, 18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с. 111 [169]

РОЗДІЛ 4

СТАН СИСТЕМИ ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ НЕФРОПАТІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ

Враховуючи те, що ниркові дисфункції супроводжуються метаболічними порушеннями і токсичним ураженням організму, призводять до оксидативного стресу у клітинах та до зниження протеїнсинтезуючої функції печінки як головного детоксикаційного органу, дослідження біохімічних механізмів розвитку захворювань та пошук шляхів вдосконалення нефро- та гепатопротекції є актуальним завданням наукової спільноти як в Україні, так і в світі.

Оскільки мітохондрії мають велику кількість окислювальних метаболічних шляхів, здатні до продукування АФО, то за умов оксидативного стресу, викликаного нефропатією, в першу чергу будуть ушкоджуватися енергетичні станції клітини.

Зростаюча активність ГГТ, АЛТ і знижена концентрація загального протеїну плазми крові підтверджують токсичне ураження печінки за умов нефропатії та можуть бути ознаками змін в енергетичному балансі гепатоцитів, тому завданнями розділу було оцінити оксидантний вплив експериментальної моделі нефропатії на стан енергозабезпечення мітохондрій печінки та стан системи антиоксидантного захисту у гепатоцитах дослідних тварин.

4.1. Ензиматична активність компонентів дихального ланцюга гепатоцитів за умов нефропатії та застосування глутатіону

Гепатоцити збагачені мітохондріями, які складають 13-20% об'єму печінки, та відіграють важливу роль у регулюванні енергетичного обміну: забезпечують окислювальне фосфорилування та β -окислення жирних

кислот, беруть участь у підтримці гомеостазу кальцію в клітинах та у реалізації кальцій-опосередкованої внутрішньоклітинної сигналізації завдяки депонуванню іонів кальцію. У мітохондріях відбувається синтез амінокислот (глутаміну, цитруліну), стероїдних гормонів, вони беруть участь біосинтезі ліпідів і гему, але при дегенеративних змінах клітин мітохондрії є основним джерелом вільних радикалів та сигнальних молекул апоптозу.

Функціонування мітохондрій пов'язане з підтриманням клітинного редокс-балансу, а дихальний ланцюг – головна система перетворення енергії в органелах. У результаті перенесення електронів відбувається перехід через мембрану з матриксу в міжмембранний простір позитивно заряджених іонів водню (протонів), внаслідок чого виникає електрохімічний градієнт протонів на мембрані, і використовується специфічним протеїновим комплексом внутрішньої мембрани для синтезу АТФ [170 – 172].

Висока активність метаболічних процесів у печінці робить гепатоцити основними мішенями для вільних радикалів. Мітохондрії, мікросоми та пероксисоми в паренхіматозних клітинах печінки – потенційні утворювачі АФО. Порушення редокс-гомеостазу індукують незворотні зміни клітинних ліпідів, протеїнів та ДНК, тому важливою складовою антиоксидантної системи енергетичних станцій клітини є мітохондріальний глутатіон, який попереджає та корегує метаболічні пошкодження, використовується для захисту від фізіологічного та патологічного оксидативного стресу.

Зміни окисно-відновного стану тіолових груп протеїнів дихального ланцюга можна розглядати як один із факторів регуляції енергетичних функцій [173], тому за умов нефропатії у мітохондріях гепатоцитів було виміряно вміст SH-груп.

У групах тварин модельної патології спостерігалось зниження SH-груп у мітохондріях гепатоцитів на 31% та 33% на 3-й та 7-й експериментальний день відповідно порівняно до контрольної групи тварин (рис. 4.1). Такі результати дозволяють припустити, що прогрес захворювання спричинив

розвиток та прогресування оксидативного стресу в мітохондріях, що може впливати на мітохондріальний біоенергетичний стан гепатоцитів.

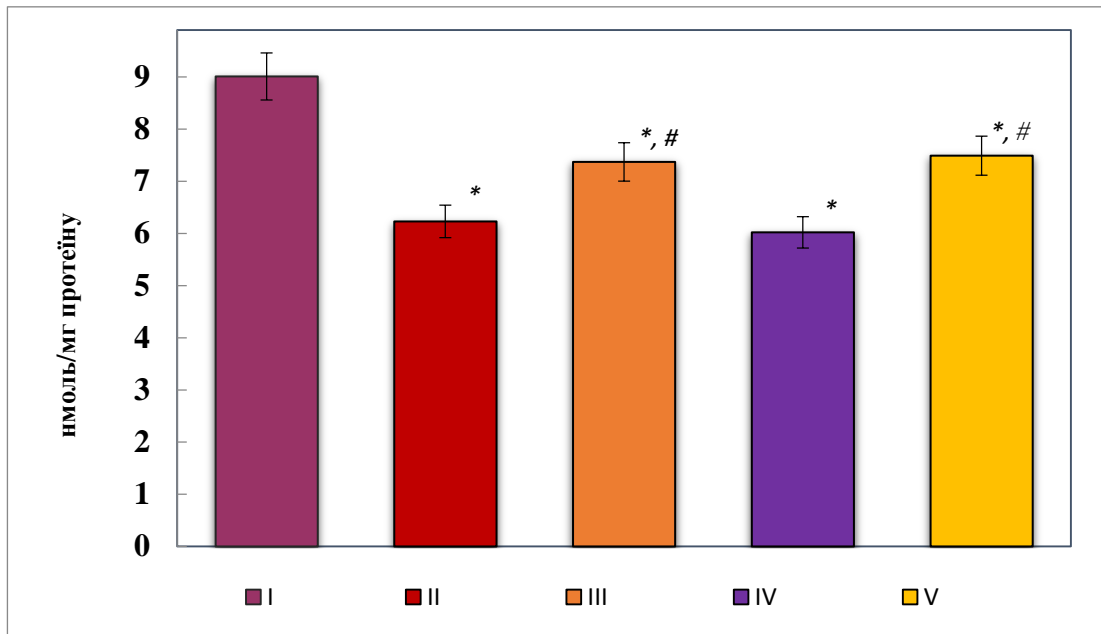


Рис. 4.1. Вміст SH-груп у мітохондріях гепатоцитів за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$.

Введення глутатіону сприяло підвищенню показника на 17% та 24% відповідно до 3-ї та 7-ї доби експерименту порівняно з групами тварин з нефропатією.

Зниження сульфгідрильних груп протеїнів пов'язане з високою інтенсивністю генерації АФО у організмі на початкових етапах розвитку нефропатії та визначається ступенем токсичного впливу на біомолекули печінки, і, можливо, є одним із механізмів порушення біотрансформації

енергії в гепатоцитах, та однією з причин пригнічення протеїнсинтезувальної функції печінки за даних експериментальних умов.

Ми припускаємо, що глутатіон відіграє важливу роль у захисті мітохондріальної мембрани від окислювального пошкодження, і його введення може стати стримуючим фактором у процесі прогресування патології.

Процеси перетворення енергії у мітохондріях гепатоцитів визначають їх стійкість до дії пошкоджуючих агентів. Виявлене зниження вмісту SH-груп робить доцільним питання дослідження структурно-функціонального стану мітохондрій печінки щурів за умов нефропатії та спонукає з'ясувати чи викликає розвиток патології нирок енергетичний дисбаланс у мітохондріях гепатоцитів.

Результати нашого експерименту показали зниження активності NADH-дегідрогенази на 10% (табл. 4.1) та активності сукцинатдегідрогенази на 26,8% (рис. 4.2) у мітохондріях гепатоцитів щурів з нефропатією на третю добу порівняно з контрольною групою.

Таблиця 4.1

Активність NADH-дегідрогенази за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону (M±m)

Група / Показник	Контроль n=36	Нефропатія 3 день, n=25	Нефропатія + глутатіон, 3 день, n=23	Нефропатія 7 день, n=24	Нефропатія + глутатіон, 7 день, n=23
NADH-дегідрогеназа, нмоль NADH/хв*мг протеїну	20,98±0,28	19,07±0,51*	20,57±0,31 [#]	19,52±0,38*	20,2±0,43

Примітка.

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

[#] – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$.

Ймовірно, причиною цього є порушення структурної функціональної організації комплексів I та II в експериментальних умовах, розвиток гіпоксії та порушення глутатіонування комплексів дихального ланцюга.

У мітохондріях гепатоцитів щурів із нефропатією на 7 день експерименту в порівнянні зі значеннями контрольної групи спостерігалось зниження активності NADH-дегідрогенази на 7% (табл. 4.1) та активності сукцинатдегідрогенази на 16,7% (рис. 4.2).

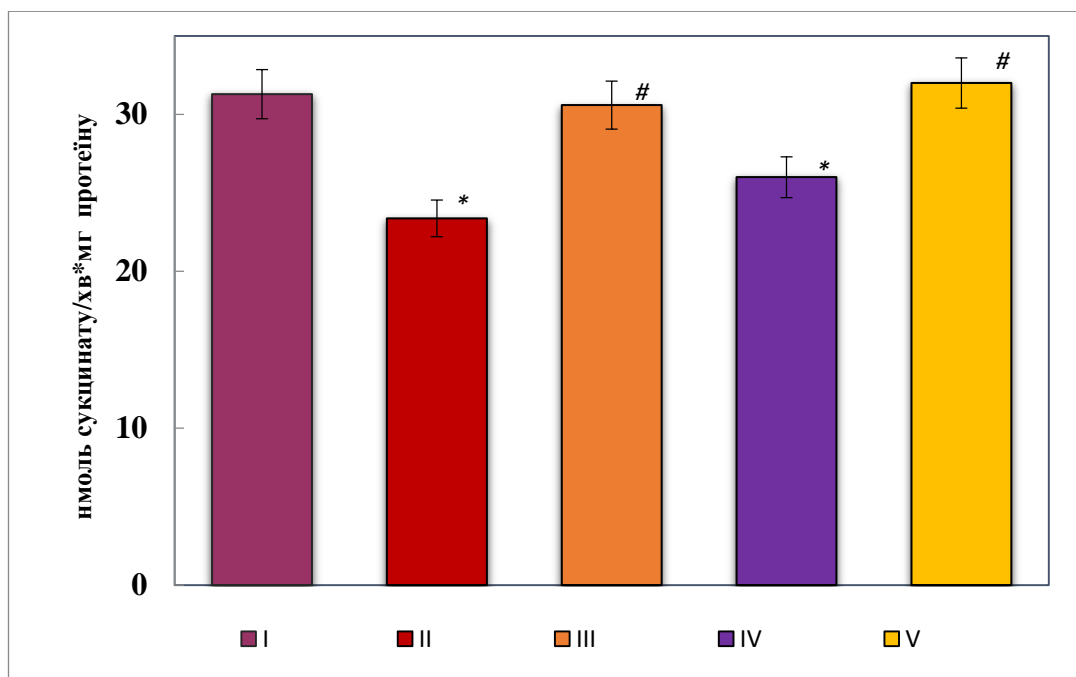


Рис. 4.2. Активність сукцинатдегідрогенази за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$.

Така реакція організму на окислювальний стрес, викликаний нефропатією, може стати пусковим механізмом розвитку патобіохімічних

реакцій, результатом яких є енергетичний дефіцит, який призводитиме до некрозу та апоптозу клітин. Адже навіть незначні зниження активності першого комплексу дихального ланцюга здатні викликати негативні наслідки для клітин: накопичення в мітохондріях відновленого NADH^+ , нестача ресурсів окисленого NAD^+ , а, отже, й гальмування ензимів циклу Кребса, поступова деполяризація внутрішньої мітохондріальної мембрани та активація кисню, що зумовлюватиме окислювальний стрес та відкриття мітохондріальних пор апоптозу.

Структурна гетерогенність мітохондріального комплексу I може бути причиною чутливості окремих амінокислот до посттрансляційної модифікації, зокрема під час розвитку патологій, які супроводжуються зменшенням вмісту GSH і зростанням продукції супероксид-радикалу в мітохондріях, або при селективному пошкодженні комплексу I [174-176]. Супероксид у мітохондріях перетворюється в пероксид водню, який може проникати через мітохондріальну мембрану в цитозоль, запускаючи каскад ушкоджуючих клітину реакцій. Таким чином клітина може реагувати на сигнал про зміну ступеня окислення глутатіону в мітохондріях.

У той же час активність цитохромоксидази (рис.4.3) у мітохондріях гепатоцитів щурів із нефропатією зменшувалась на 50% протягом усіх експериментальних днів, порівняно з показниками, отриманими у контрольній групі тварин. Однак змін активності цитохромоксидази після введення глутатіону щурам також не було виявлено.

Дефіцит функціональної цитохромоксидази свідчить про пригнічення енергетичного метаболізму в мітохондріях та може викликати зсув окислювального метаболізму в сторону гліколізу, що розглядається як механізм адаптації клітин до метаболічного стресу в умовах гіпоксії, але зростання активних форм кисню.

Взаємозв'язок мітохондріального синтезу АТФ та регуляторних шляхів апоптозу, при можливому переході на гліколітичний метаболізм дозволяє

припустити, що це є одним з апоптичних чинників, адже відомо, що ряд ензимів гліколізу задіяно в регуляцію апоптозу [177-179].

Ймовірно, перепрограмування метаболічних процесів гепатоцитів за умов нефропатії у мітохондріях проявляється зміною їх функціональної направленості від синтезу АТФ до цитоплазматичного гліколізу, пригнічення активності ензимів дихального ланцюга та посилення синтезу АФО в умовах метаболічного стресу та гіпоксії.

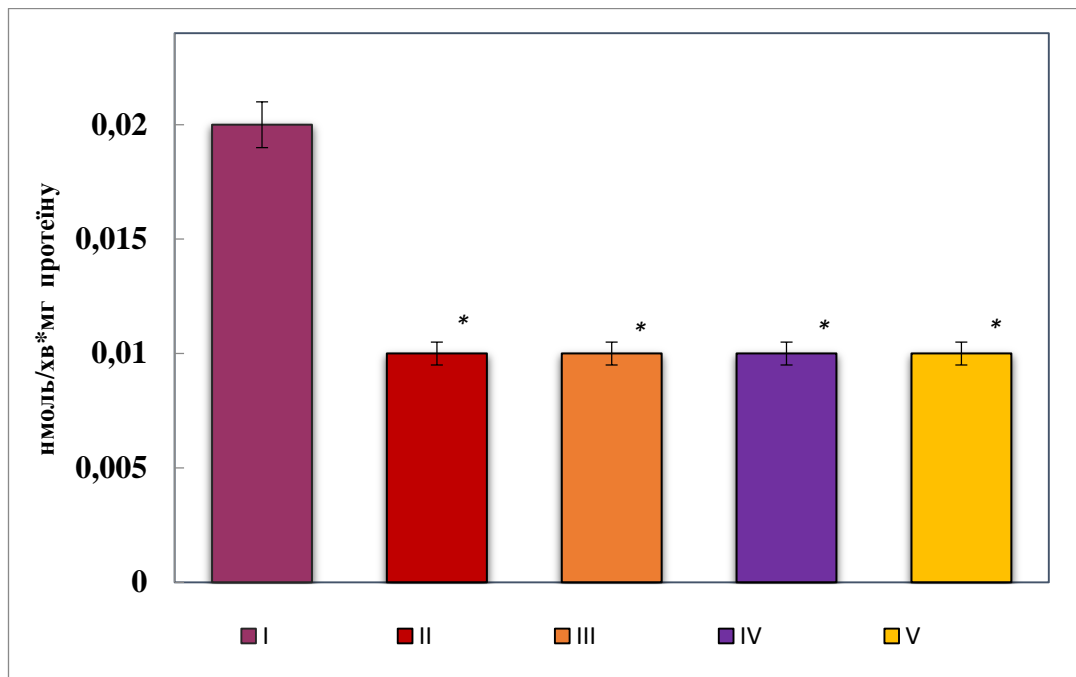


Рис. 4.3. Активність цитохромоксидази за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$.

Активність H^+ -АТФази (рис. 4.4) у мітохондріях гепатоцитів щурів із нефропатією зменшилася на 37,5% на 3-й експериментальний день та на 33% на 7-й день експерименту порівняно з тваринами контрольної групи.

Енергетичні станції клітин відіграють ключову функцію у координації найважливіших клітинних функцій, але мітохондріальний рівень АФО

збільшується в умовах гіпоксії, ішемії, стресу та при багатьох патофізіологічних станах та їх лікуванні, тому є припущення, що дисфункція мітохондрій – початковий етап проявів гепато- та нефротоксичності, оскільки мітохондрії виконують роль первинної мішені для токсинів.

Введення глутатіону збільшувало кількість АТФ регуляцією активності досліджуваних ензимів комплексів I, II, V на 7,8%, 31% та 20% відповідно на 3-й експериментальний день, і на 17,7% та 26,7% – активності досліджуваних ензимів II та V комплексів відповідно на 7 добу експерименту порівняно з показниками щурів із нефропатією.

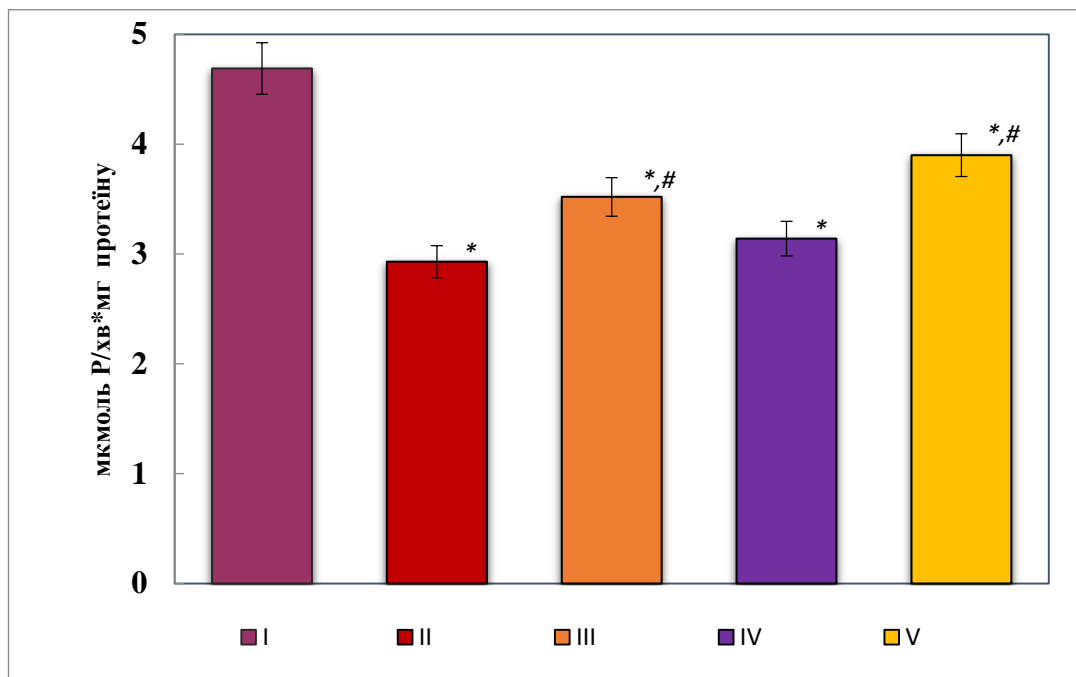


Рис. 4.4. Активність H^+ -АТФази за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$.

Встановлені нами зміни можна пояснити тим, що антиоксидант підтримує S-глутатіонілювання протеїнів, яке є важливим для регулювання функції та активності протеїнів у мітохондріях, зокрема протеїнів дихальних комплексів I, III і V через дію GST. Тіол-групи є важливими для структури та діяльності сукцинатдегідрогенази [173, 177, 180], тому введення глутатіону нормалізує активність ензиму, а встановлене раніше зниження рівня SH-груп є однією з причин порушення активності комплексу II.

Також, оскільки в мітохондріальній мембрані є дикарбоксилатний транспортер, здатний переміщувати всередину сукцинат, а утворений фумаразою малат – назовні, можна вважати, що активація окислення сукцинату відбувається шляхом збільшення проникності мембрани для протонів.

Отже, глутатіон проявляє в мітохондріях декілька шляхів захисту від оксидативного стресу в печінці тварин з нефропатією, та, як наслідок, частково нормалізує активність ензимів комплексів дихального ланцюга та забезпечує покращення енергопродукуючої функції клітин.

Порушення окислювального фосфорилування і недостатній синтез АТФ зумовлює клітинний іонний дисбаланс зі зменшенням внутрішньоклітинного вмісту K^+ , збільшенням вмісту Na^+ , деполяризацією мембран, набуханням мітохондрій [175-178]. Гальмування мітохондріального трансмембранного потенціалу, зміни транспорту електронів, зростання АФО, дефіцит синтезу енергетичних сполук та залучення протеїнів проапоптозної дії, у тому числі й вивільнення через мітохондріальні пори цитохрому *c*, зумовлюють той факт, що епіцентром запрограмованої загибелі клітин є мітохондрії.

Часто, як на ранніх, так і на пізніх стадіях клітинного пошкодження, для мітохондрій є характерним зростання концентрації цитозольного вільного Ca^{2+} , збільшений вміст якого активує кальцій-залежні нейтральні протеази (кальпаїни), які беруть участь у внутрішньоклітинному протеолізі.

Вагомими факторами індукції запрограмованої загибелі клітин є збільшення АФО у енергетичних станціях клітини, які активують механізми апоптозу, аутофагії та некрозу. Інтенсифікація процесів перокисного окислення ліпідів активує ензими, які гідролізують фосфоліпіди клітинної мембрани та внутрішньоклітинні цистеїнові протеїнази (каспази), які є частиною пускового механізму апоптозу клітин.

Отримані результати демонструють важливу регуляторну роль глутатіону у процесі синтезу АТФ мітохондріями. За умов збільшеної продукції АФО у мітохондріях, які інгібують дихальний ланцюг, введення екзогенного глутатіону дозволяє підтримувати енергосинтезуючі функції ензимів комплексів I, II, та V. На нашу думку, такий ефект застосування глутатіону можна пояснити його антиоксидантними властивостями: трипептид зменшує активні види кисню в мітохондріях, сприяючи стабілізації енергетичного обміну мітохондрій, що є важливим критерієм гепатопротекції за умов прогресування ниркової дисфункції.

АФО вивільняють із мітохондріальної мембрани водорозчинний протеїн цитохрому *c*, який активує каспазний шлях клітинної смерті. Зростання рівня мітохондріальних АФО може бути спровоковане гіпоксією, токсичністю, надлишком Ca^{2+} , патологіями органів, і призводить до інтенсифікації процесу перокисного окиснення ліпідів, пошкодження мітохондріальних мембран, деструкції крист, набухання та руйнування мітохондрій з подальшим енергетичним дисбалансом [63, 67].

Без корегувального впливу антиоксиданту послідовні зміни активностей усіх мітохондріальних комплексів можуть призводити до формування гіпоксії та розвитку енергодефіциту клітин, а згодом – викликати дисфункцію каналів активного іонного транспорту, дестабілізацію клітинних мембран та мітохондріальну дисфункцію, проявами якої є посилена продукція АФО та ініціація механізмів загибелі клітин.

4.2. Антиоксидантна система печінки за умов ушкодження нирок

У мітохондрії не відбувається синтез глутатіону, поповнення його вмісту в органелі відбувається завдяки транспорту з цитозолу специфічними GSH-транслоказами в процесі роботи 2-оксоглутаратного та дикарбоксилатного переносників. Також глутатіон здатний безпосередньо взаємодіяти з $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$, $HOCl$, $RO\cdot$, $RO_2\cdot$, пероксинітрином та молекулярним киснем, утворюючи окислену форму глутатіону, відновлення якого здійснює глутатоніредуктаза мітохондріального матриксу. І, незважаючи на те, що організм має систему синтезу та відновлення трипептиду, в умовах зниженої функціональності печінки, високого рівня АФО, порушеного піридинового нуклеотидного окисно-відновного статусу та синтезу АТФ, актуальним є застосування екзогенного глутатіону.

Як показали результати наших досліджень, процес синтезу АТФ у мітохондріях гепатоцитів за умов нефропатії порушено. При зниженні цитозольного рівня антиоксиданту та зниженні продукції АТФ мітохондрії не отримуватимуть необхідну кількість трипептиду, оскільки глутатіон синтезується в основному в цитозолі печінки із амінокислот-попередників шляхом послідовної дії двох АТФ-залежних ензимів, а вміст внутрішньоклітинного та позаклітинного відновленого глутатіону визначається балансом між виробництвом, споживанням і транспортуванням трипептиду.

Після виявлених змін у системі енергозабезпечення мітохондрій гепатоцитів як ключових регуляторів окислювального стресу наступним етапом роботи стало дослідження оксидантно-антиоксидантного стану печінки за умов нефропатії.

Порушення роботи дихального ланцюга у гепатоцитах експериментальних груп тварин супроводжується інтенсивним неензиматичним пероксидним окисленням ліпідів у печінці, яке було встановлено за швидкістю утворення ТБК-активних продуктів.

За умов нефропатії посилювалися процеси вільнорадикальних ушкоджень молекул у печінці досліджуваних тварин, про що свідчить зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 17% на 3-й день та на 27% на 7-й день експерименту в порівнянні з показниками контролю (рис. 4.5). Екзогенний глутатіон приводив показники на 7-й день експерименту до меж норми, але на початковій стадії розвитку патології зниження інтенсивності ПОЛ не було очевидним.

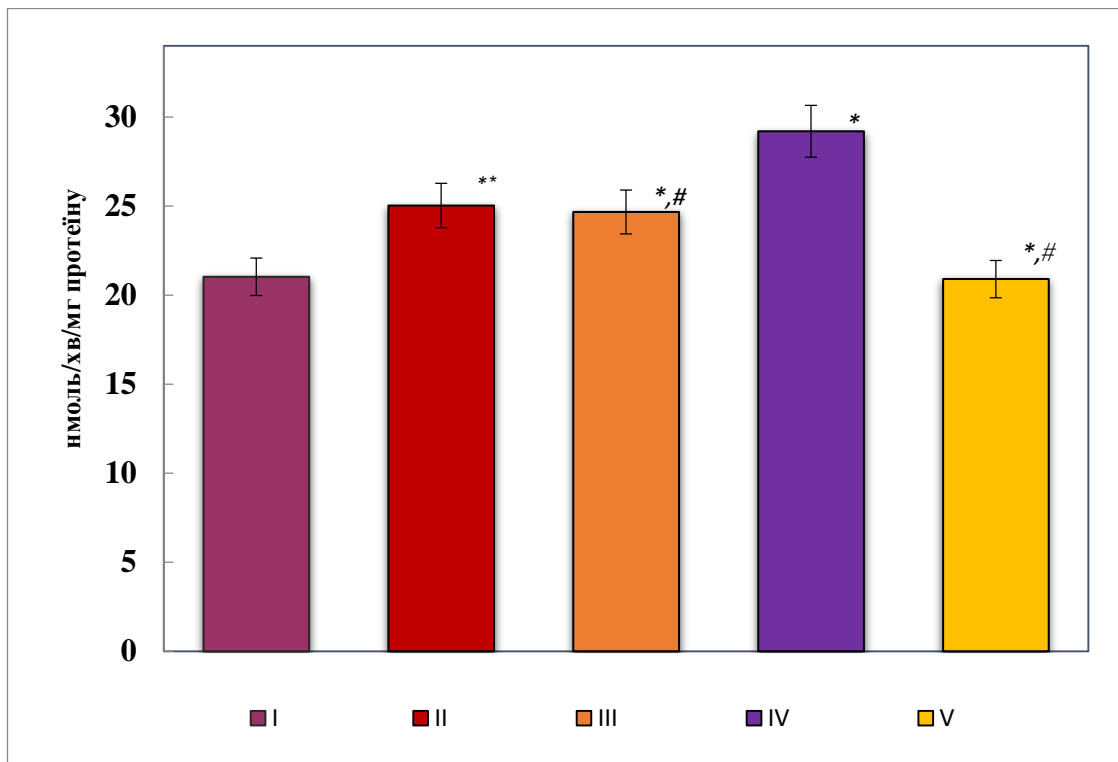


Рис. 4.5. Вміст ТБК-активних продуктів у печінці тварин за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;

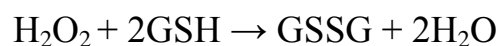
– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,01$.

Розвиток оксидативного стресу в гепатоцитах є результатом енергетичного дисбалансу клітин печінки за умов нефропатії. Як наслідок зниження синтезу АТФ та змін в активностях комплексів дихального ланцюга у печінці відбувається порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, яке викликає інтенсифікацію процесів пероксидного окиснення ліпідів у мембранних структурах, що, в свою чергу, може призвести до загибелі клітин. Тому нами були проведені дослідження стану глутатіонової системи захисту за умов впливу високого рівня АФО. Ми визначали вміст глутатіону як головного неензиматичного антиоксиданта, синтез якого локалізовано у печінці, оцінили активність глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази в гепатоцитах за умов патології та введення глутатіону .

Вміст глутатіону у печінці тварин з нефропатією знижувався на 33% на 3-й експериментальний день, та на 23% — на 7-й, порівняно до показників контролю (рис.4.6).

Крім інактивації ензиматичним шляхом гідропероксидів ліпідів, глутатіон неензиматичним шляхом інактивує H_2O_2 та інгібує АФО:



Швидкість реакції знешкодження H_2O_2 залежить від концентрації глутатіону у клітині: при її зниженні збільшується вміст пероксиду водню та зростає концентрація цитотоксичних вільних радикалів [7].

Зниження кількості GSH є індикатором порушення редокс-статусу [55, 180, 181], що впливає на стійкість гепатоцитів до оксидативного пошкодження. Цілком вірогідно, що зниження вмісту антиоксиданта відбувається через надлишкову продукцію АФО і підвищені активності системи антиоксидантного захисту та детоксикації печінки. Застосування глутатіону, як на 3-й, так і на 7-й день експерименту приводить досліджувані показники до меж норми.

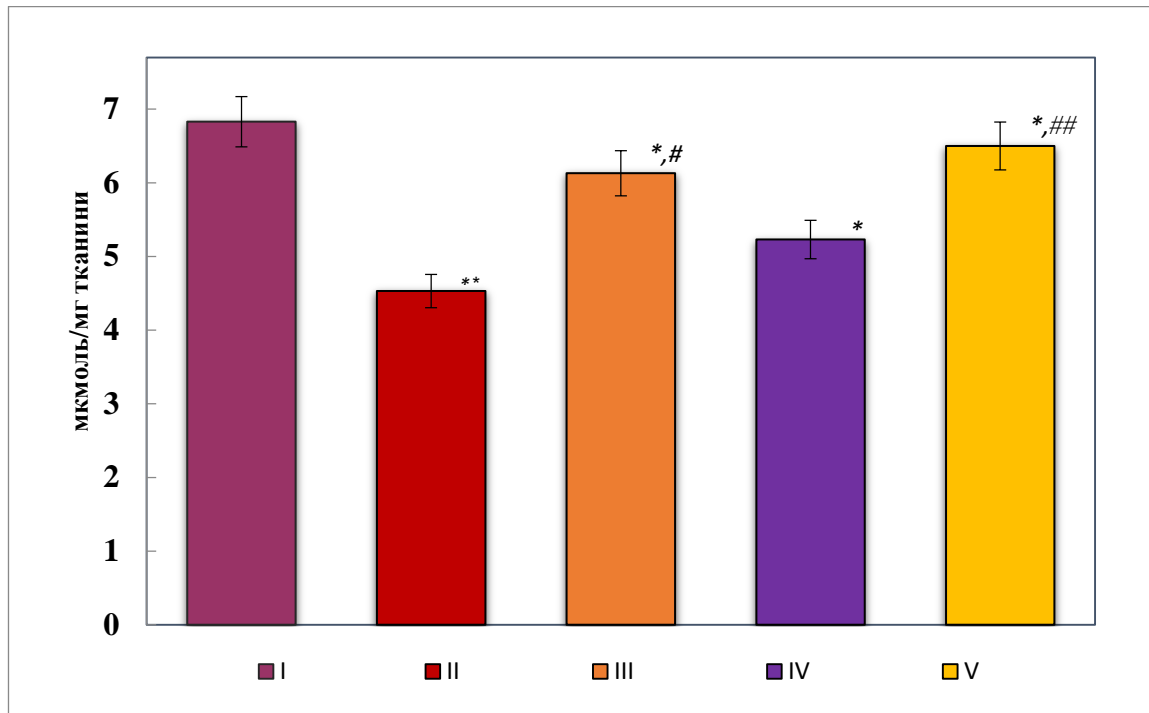


Рис. 4.6. Вміст глутатіону у печінці тварин за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,01$.

Захист клітин відбувається різними шляхами і залежить від ендо- або екзогенного походження АФО, що пов'язано з нездатністю окремих видів АФО проникати крізь мембрани, отже, екзогенні АФО впливають на клітину опосередковано, через стимуляцію ПОЛ у плазматичній мембрані.

Тому захист від ушкодження екзогенними видами АФО спрямований на утилізацію жирнокислотних і ліпідних гідропероксидів — продуктів ПОЛ, які викликають вільнорадикальні реакції ліпідного окислення за принципом ланцюгової реакції.

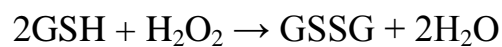
Основна роль у цьому процесі належить глутатіонпероксидазі, експресія якої приводить до значного підвищення стійкості клітин до екзогенних окислювачів [45, 182]. Інша частина вільнорадикальних продуктів у мембрані знешкоджується завдяки перехопленню SH-групами мембранних протеїнів.

Отже, глутатіонпероксидаза здатна знешкоджувати пероксид водню та ліпопероксидази, які генеруються в надлишку при ушкодженні тканин, є важливою ланкою захисту біомолекул від окиснення [183].

Ензим каталізує реакцію відновлення глутатіоном нестійких органічних гідропероксидів, гідропероксидів поліненасичених жирних кислот, оксикислот:



Спорідненість GPx до пероксиду водню вища, ніж у каталази, тому вона ефективніша при його низьких концентраціях:



Нами було встановлено зниження GPx на 3 експериментальну добу на 11,6%, на 7 добу – на 36,5%, що свідчить про вичерпання ресурсів глутатіону за умов нефропатії (рис. 4.7).

Глутатіонпероксидаза забезпечує захист мембран від руйнівної дії пероксидних радикалів, каталізує розпад пероксиду гідрогену, окиснює глутатіон, і зі зменшенням активності GPx знижується стійкість організму до окиснювального ураження, що може призводити до розвитку вільнорадикальної патології.

Активність глутатіонпероксидази, яка впливає на швидкість утилізації АФО, захищаючи клітину від оксидативного стресу, залежить від внутрішньоклітинної концентрації GSH.

На 3-ю добу після введення глутатіону спостерігали зростання глутатіонпероксидазної активності на 7%, а після введення глутатіону

протягом семи днів рівень зростання активності ензиму склав 23% порівняно з групою тварин із нефропатією (рис. 4.7).

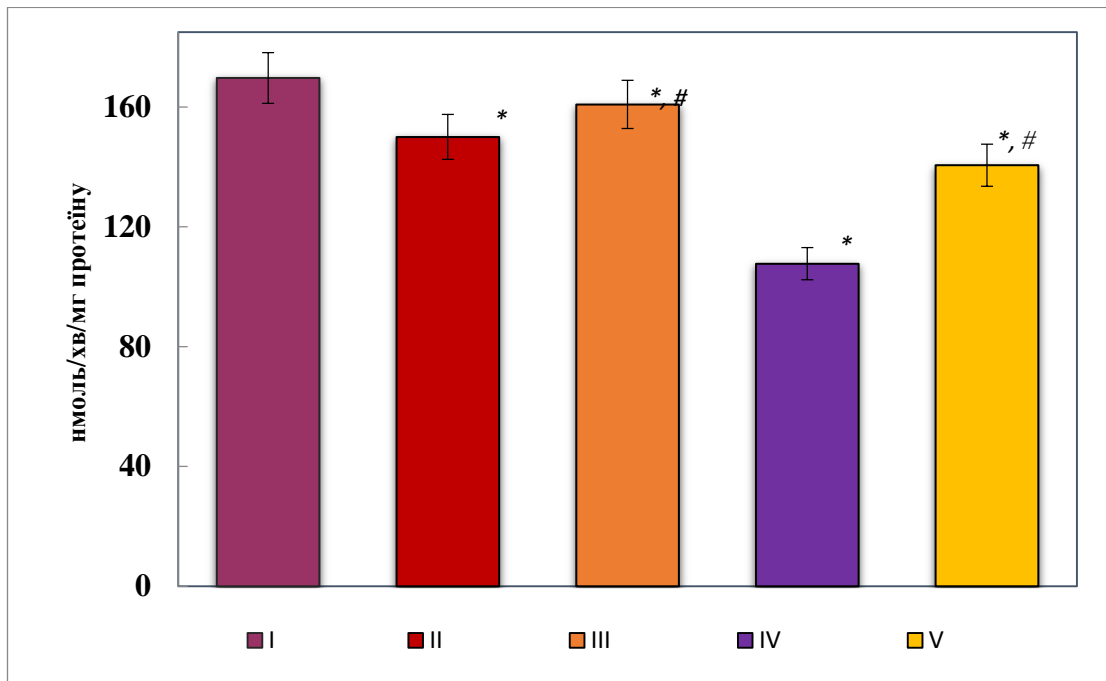


Рис. 4.7. Активність глутатіонпероксидази у печінці щурів за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$.

GST є одним з ключових ензимів антиоксидантної системи організму, основною функцією якого є руйнування і інактивація токсичних сполук кисню – пероксиду гідрогену і гідропероксидів, і максимальна концентрація ензиму, у зв'язку з його детоксикаційною властивістю, виявлена в печінці. Ензим перешкоджає деструктивному впливу оксидативного стресу, бере участь в утворенні та метаболізмі гормонів (простагландинів, естрогенів), взаємодіє з катіонами (печінка, нирки,

кишечник) і аніонами (легені, головний мозок, селезінка, плацента, еритроцити).

GST здатна відновлювати гідропероксидні групи окиснених фосфоліпідів у мембранах без їх попереднього фосфоліпідного гідролізу вільними жирними кислотами, ензим кон'югує з глутатіоном токсичні продукти ПОЛ, тому є важливим компонентом антиоксидантного захисту, особливо від ендогенних метаболітів, утворених у результаті окиснювального стресу.

Здатність GST брати участь у катаболізмі продуктів окисативного стресу доповнюється регуляцією клітинного редокс-залежного сигналу різними шляхами (JNK1, TRAF2-ASK1, MAPK, Trx, p38, p53) та методом протеїн-протеїнових взаємодій з кіназами, контролюючими клітинну відповідь на стрес, проліферацію та стимуляцію апоптозу, тому терапевтичний потенціал GSH-модулюючих агентів у клінічній практиці активно досліджується [183].

За умов нефропатії в гепатоцитах тварин спостерігається зниження активності GST на 22,5% на 3 день дослідження та на 9% – на 7 експериментальний день (рис. 4.8). Введення глутатіону нормалізувало показники активності досліджуваного ензиму до значень контролю тільки при семиденному застосуванні.

Отже, ензими GPx та GST, а також глутатіон, забезпечують стабільний захист від АФО, токсичних сполук та відповідають за оптимальний редокс-потенціал клітин.

З'ясовано, що за умов динамічної рівноваги між окиснювальними процесами і антиоксидантним захистом, введення екзогенного глутатіону впродовж трьох діб не вплинуло на абсолютні значення активності ензимів антиоксидантного захисту системи глутатіону у супернатантах печінки щурів з нефропатією.

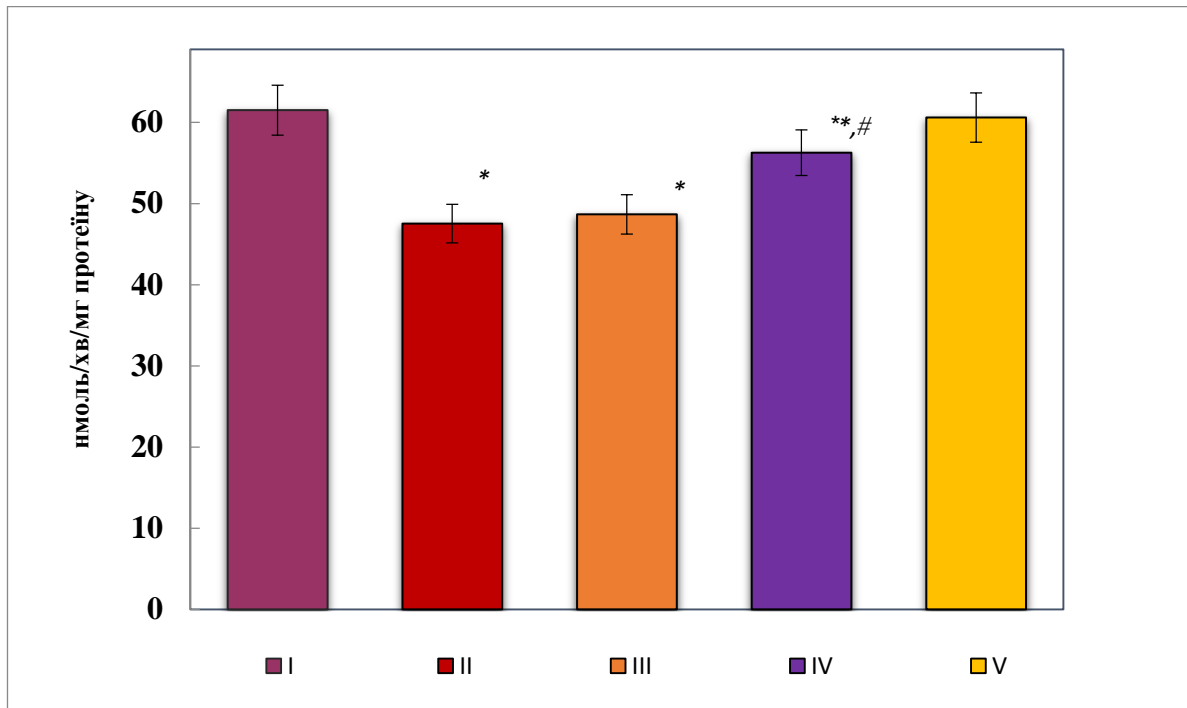


Рис. 4.8. Активність глутатіон-S-трансферази у печінці щурів за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$.

Суттєве пригнічення вмісту трипептиду та активності ензимів системи глутатіону (глутатіон-S-трансферази і глутатіонпероксидази) у тварин з нефропатією вказує на неспроможність системи антиоксидантного захисту гепатоцитів повністю протистояти ушкоджуючому впливу патології на етапах її активного розвитку.

Отже, у печінці при нирковій недостатності відбувається активація окисних реакцій, про що свідчить посилене утворення ТБК-активних продуктів, зниження вмісту глутатіону та SH-груп у мітохондріях.

Продукція АФО мітохондріями може призвести до окислювального ураження мітохондріальних протеїнів та ДНК, погіршення здатності мітохондрій синтезувати АТФ та виконувати широкий спектр інших метаболічних функцій, які є основними для нормальної роботи більшості клітин, – цикл трикарбонових кислот, окислення жирних кислот, цикл сечовини, метаболізм амінокислот, синтез гему тощо.

Встановлене нами зниження вмісту SH-груп та глутатіону, активація АФО здатні викликати набухання мітохондрій, зумовлюють руйнування їх мембран та зниження активності антиоксидантних ензимів. Зокрема, зміни, спричинені впливом нефропатії, можуть розглядатися як сигнал для перебудови енергопродукуючих функцій мітохондрій як в нирках, так і у віддалених органах. Антиоксидантні властивості GSH зумовлені його та властивістю стабілізувати структури мембран завдяки здатності до хімічної взаємодії із синглетними формами кисню, супероксидом, радикалами гідроксилу та до безпосереднього руйнування вільних радикалів.

Розуміння енергетичного обміну в фізіологічних та патофізіологічних умовах допоможе покращити комплексні терапевтичні стратегії для пацієнтів із захворюваннями нирок та печінки.

Висновки до розділу 4

Виявлено, що за умов нефропатії у гепатоцитах щурів спостерігається мітохондріальна дисфункція, яка проявляється зменшенням кількості SH-груп та зниженням енергопродуктивності органел.

Встановлено, що нефропатія, викликана фолієвою кислотою, посилює окислювальний стрес у печінці, про що свідчить зростаюче утворення ТБК-активних продуктів, зниження вмісту глутатіону, активності глутатіон-залежних ензимів.

Виявлено корегуючу дію глутатіону на розвиток біоенергетичного стресу та мітохондріальної дисфункції, які присутні за умов нефропатії.

Позитивний ефект застосування глутатіону за умов розвитку нефропатій може бути обумовленим його протизапальними, антиапоптозними і імуномодуляторними властивостями.

Результати власних досліджень розділу викладено у статті та апробовано на наукових форумах:

1. Ferenchuk YeO, Gerush IV. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24 [184]
2. Ференчук ЕА, Коляник ІО. Влияние трехкратного введения экзогенного глутатиона на активность ферментов энергетического обмена в условиях нефропатии. XX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей; Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье; 22 апреля 2017, Санкт-Петербург; Санкт-Петербург: СПбГУ; 2017. с. 580 [185]
3. Геруш И, Ференчук Е, Коляник И. Влияние глутатиона на изменение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов в условиях экспериментальной нефропатии. Материалы 72-й научно-практической конференции студентов-медиков и молодых ученых с международным участием; Актуальные проблемы современной медицины; Самарканд, 11-12 мая, 2018; 2018. с. 313 [186]
4. Ferenchuk YeO, Gerush IV, Koliyanik IO, Bevzo VV, Dikal M. Effect of 3 days glutathione introduction on energy metabolism in the liver mitochondria of rats with nephropathy. Abstracts of the XI Parnas Conference – Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3–5 September 2018; Ukr.Biochem.J; 90; 2018. p. 97 [187]

РОЗДІЛ 5

СТАН СИСТЕМИ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ЗА УМОВ НЕФРОПАТІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАТІОНУ

Гідроген сульфід бере участь у різних каталітичних, антиоксидантних та енергетичних процесах організму. Дослідження метаболізму H_2S у печінці за умов нефропатії є важливим, адже розуміння особливостей метаболічних шляхів за патофізіологічних умов допоможе вдосконалювати терапевтичні стратегії для підвищення ефективності лікування та профілактики нефропатій і їх ускладнень.

Завдання розділу – вивчення показників обміну гідроген сульфідом (активності H_2S -синтезуючих ензимів, концентрації та продукції H_2S) у печінці щурів із експериментальною нефропатією та дослідження впливу глутатіону на показники обміну сірководню.

5.1. Зміни у системі утворення гідроген сульфідом в печінці за умов нефропатії

Сірководень розширює судини, знижує артеріальний тиск, впливає на ангиогенез та проникність судин і гальмує розвиток атеросклерозу. Загалом він проявляє вазопротекторний ефект, зумовлений антиоксидантними, антиапоптичними, протизапальними та вазоактивними властивостями. Під час ниркової гіпоксії, H_2S регулює видільну функцію нирок шляхом впливу на клубочкову фільтрацію та гальмування транспортерів натрію в клітинах каналців [86, 106-108]. Газотрансмітер впливає на звільнення реніну юкстагломерулярними клітинами, модулюючи артеріальний тиск. H_2S разом з NO регулює функцію верхнього і нижнього сечового тракту і відіграє вирішальну роль у релаксації гладеньких м'язів сечового міхура. Зміни вмісту H_2S спостерігаються при багатьох захворюваннях [109-113], а у разі

застосування донорів сірководню, спостерігається протизапальна, антиоксидантна та антиапоптотична дія сигнальної молекули [96, 114, 115].

Ниркові дисфункції можуть співіснувати із захворюваннями печінки або стимулювати їх розвиток. Метаболізм H_2S у печінці взаємопов'язаний із метаболізмом глюкози, чутливістю до інсуліну, синтезом ліпопротеїнів, мітохондріальним енергетичним забезпеченням [188, 189].

За умов трьохденної експериментальної нефропатії спостерігалосся зниження концентрації (рис. 5.1) на 37,92% та продукції (рис. 5.2) гідроген сульфїду на 34,84% відповідно порівняно з контрольною групою.

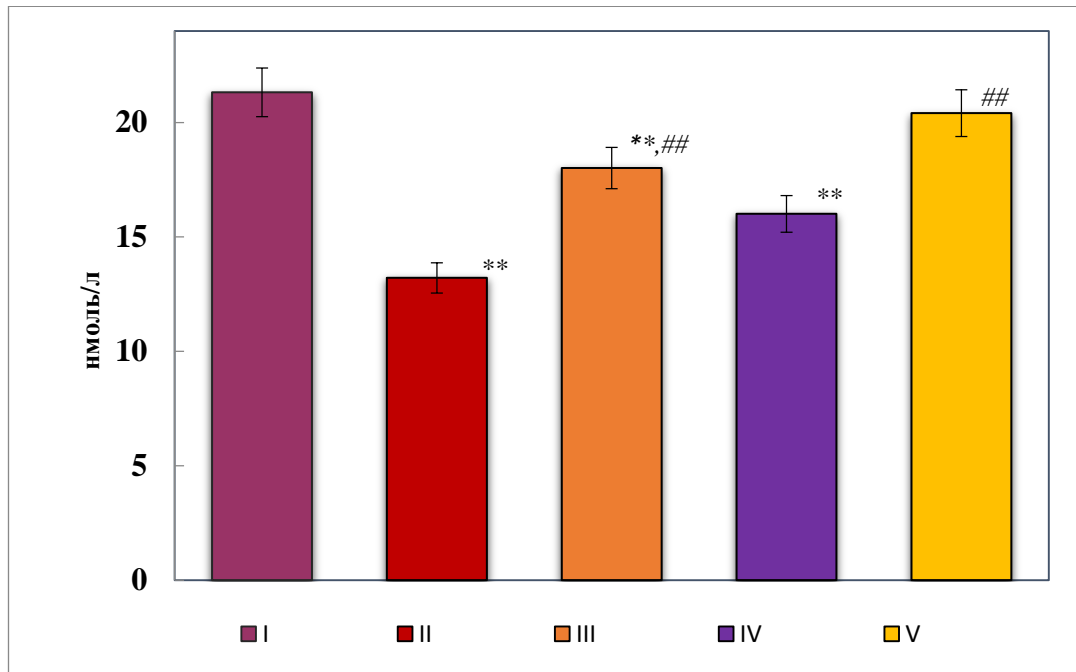


Рис. 5.1. Концентрація гідроген сульфїду у печінці тварин за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,01$.

За умов семиденної експериментальної нефропатії концентрація H_2S знизилася на 45,3% (рис. 5.1), а продукція сірководню – на 27,8% порівняно з контрольною групою (рис. 5.2).

H_2S -генеруючі активності CSE, CBS та CAT у печінці щурів із 3-денною нефропатією були знижені на 38,98%, 33,73% та 26,76% відповідно у порівнянні з тваринами контрольної групи (табл. 5.1). Такі зміни можуть зумовлюватися порушенням регуляції внутрішньоклітинного обміну, підвищеною потребою в синтезі глутатіону та інших важливих біологічно активних сполук.

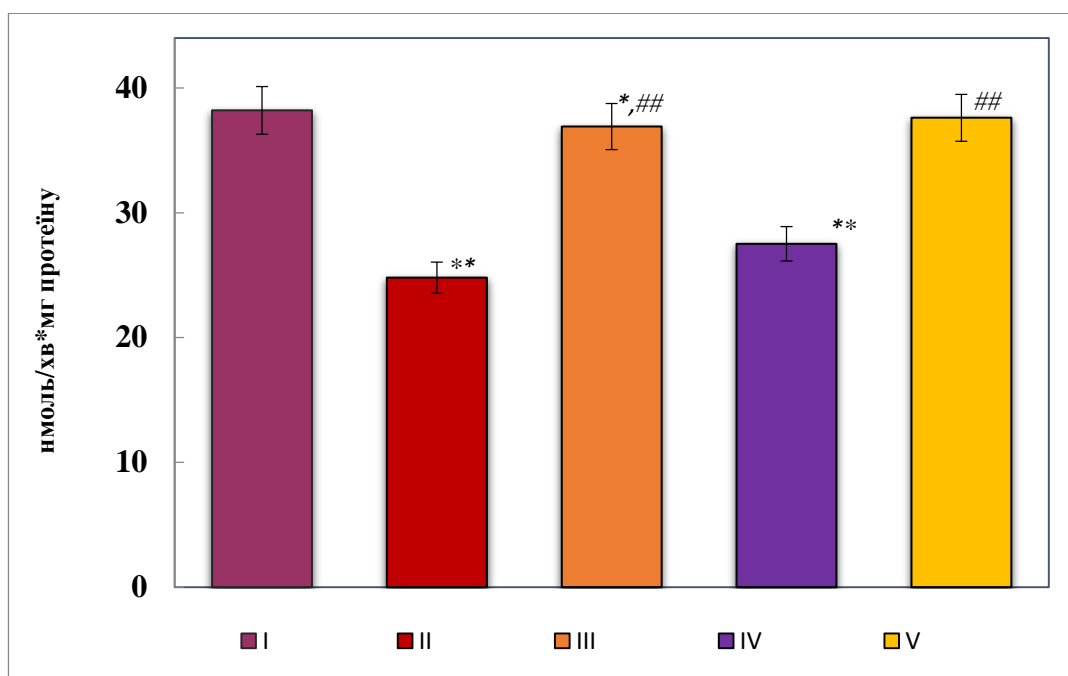


Рис. 5.2. Продукція гідроген сульфїду у печінці тварин за умов нефропатії та застосування глутатіону (I – контроль; II – тварини з 3-денною нефропатією; III – тварини з нефропатією та 3-денним введенням глутатіону; IV – тварини з 7-денною нефропатією; V – тварини з нефропатією та 7-денним введенням глутатіону)

Примітка.

Дані представлено у вигляді середня \pm стандартна помилка середньої ($M \pm m$);

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,01$.

Гідроген сульфід володіє цитопротекторними властивостями, є ендogenousним модулятором біологічних функцій організму [188], й у межах фізіологічних концентрацій здатний проявляти антиоксидантні та протизапальні властивості, але активність ензимів, які беруть участь у синтезі H_2S , у печінці щурів із семиденною нефропатією знизилася: CSE – на 31%, CBS – 32,12% та CAT – на 32,7% порівняно з групою контрольних тварин (табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

Активності H_2S -генеруючих ензимів у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування глутатіону ($M \pm m$)

Група / Показник	Контроль n=36	Нефропатія 3 день, n=25	Нефропатія + глутатіон, 3 день, n=23	Нефропатія 7 день, n=24	Нефропатія + глутатіон, 7 день, n=23
CSE, нмоль H_2S /хв/мг протеїну	3,31±0,06	2,02±0,13**	2,65±0,13**,#	2,26±0,11**	2,46±0,13**
CBS, нмоль H_2S /хв/мг протеїну	2,49±0,06	1,65±0,13**	2,28±0,15**,#	1,69±0,15**	2,16±0,15##
CAT, нмоль H_2S /хв/мг протеїну	2,69±0,05	1,97±0,12**	2,96±0,11**,#	1,81±0,10**	2,71±0,13##

Примітка

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,05$;

** – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками контрольної групи тварин, $p < 0,01$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,05$;

– статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи тварин із нефропатією, $p < 0,01$.

Такі зміни можуть бути зумовлені порушенням внутрішньоклітинного обміну під час розвитку та прогресування захворювання, та використанням цистеїну в процесах синтезу глутатіону.

Глутатіон бере участь у підтримці окислювально-відновного потенціалу в процесах детоксикації безпосередньо ендогенних та екзогенних ксенобіотиків; є важливим для захисту клітинних мембран від дії вільних радикалів, інактивації продуктів пероксидного окислення ліпідів, тому на третій день експериментального дослідження інтрагастрально введений трипептид підвищував рівень гідроген сульфід у збільшенням активностей CSE та CBS на 31% та 33,55% в порівнянні з групою тварин із нефропатією відповідно (табл. 5.1). Введення трипептиду підвищувало активність САТ на 49,3% та перевищувало показники активності контрольної групи тварин. В той же час введення глутатіону привело до зростання продукції на 36,32% та концентрації газотрансміттера на 48,4% в порівнянні з показниками тварин із нефропатією.

Введення глутатіону протягом семи днів призвело до збільшення продукції газотрансміттера на 36%, а його концентрація зросла на 43% порівняно з тваринами з нефропатією. Такі зміни в концентрації та продукції гідроген сульфід за умов застосування глутатіону були досягнуті завдяки підвищенню активності CBS на 27% та активності САТ – на 49,7% порівняно з групою тварин з нефропатією. Слід зазначити, що активність цистатіонінамінотрансферази за умов введення антиоксиданту протягом 7 днів перевищила показник контрольної групи тварин. У той же час трипептид мав найменший вплив на активність CSE, яка після введення глутатіону залишалася значно нижчою за показник контрольної групи експериментального дослідження.

5.2. Взаємозв'язок глутатіону та системи обміну гідроген сульфід

Сульфгідрильні групи цистеїну, які входять до складу трипептиду, відомі науковцям як потужні нуклеофільні агенти, які за умов розвитку патології в організмі є основною мішенню для електрофільної атаки хімічних речовин або їх метаболітів. Це приводить до інактивації потенційно токсичних екзогенних сполук та попереджає збільшення АФО.

Глутатіон є ефективною антиоксидантною пасткою для різних форм вільних радикалів. Реакції за участю трипептиду можуть відбуватися як неензиматично, так і за участю ензимів, в яких глутатіон виступає в ролі косубстрату, а ключова функціональна ланка у молекулі GSH – залишок цистеїну. Відомо, що метаболічні шляхи глутатіонової системи та системи обміну H_2S є взаємопов'язаними, і висока концентрація гідроген сульфід сприяє підвищенню рівня глутатіону.

Науковцями доведено взаємозв'язок між H_2S , амінокислотою цистеїн та GSH, зокрема описана роль сигнальної молекули в стимуляції підвищення внутрішньоклітинного рівня антиоксиданта шляхом стимуляції нуклеарного транскрипційного фактору Nrf2, який стимулює синтез і транспорт GSH, а також пригнічення активності ензимів розпаду глутатіону; посилення активності γ -глутамілцистеїнсинтетази [190 - 193]. Відомо про механізм впливу H_2S на внутрішньоклітинну продукцію GSH завдяки перетворенню цистину: H_2S , потрапляючи в міжклітинний простір, перетворює цистин в цистеїн, який імпортується в клітини власним транспортером і використовується далі для синтезу GSH [194].

Також існує дослідження про роль H_2S у збільшенні продукції внутрішньоклітинного GSH позитивною регуляцією каталітичної та регуляторної субодиниць глутаматцистеїнлігази.

Цикл γ -глутамінової кислоти дозволяє використовувати GSH як неперервне джерело цистеїну, адже однією з важливих функцій GSH є запасання та збереження амінокислоти, яка нестабільна у позаклітинних

умовах і швидко окислюється до цистину в процесах, продуктами яких є потенційно токсичні АФО.

Тому ми припускаємо, що цистеїн, присутній в складі глутатіону, використовується у реакціях синтезу гідроген сульфід, а антиоксидантні та детоксикаційні властивості глутатіону [11] додатково сприяють покращенню досліджуваних показників у печінці тварин із експериментальною нефропатією. Також відомо [9, 45], що трипептид може брати участь у трансмембранному перенесенні електронів і є можливим утворення H_2S із глутатіону шляхом нуклеофільного заміщення α -вуглецю.

Отже, активність H_2S -продукуючих ензимів за умов експериментальної нефропатії у печінці щурів знижується. Введення глутатіону підвищувало вміст H_2S та сприяло зростанню активності H_2S -генеруючих ензимів у печінці щурів із нефропатією, можливо, завдяки його детоксикаційним та антиоксидантним властивостям, а також безпосередній участі у біосинтезі гідроген сульфід, оскільки ключовим функціональним елементом молекули GSH є залишок цистеїну.

Висновки до розділу 5

Показано, що експериментальна нефропатія призводить до зниження активності H_2S -генеруючих ензимів, яка зумовлює зменшення продукції та концентрації гідроген сульфід у печінці щурів.

Встановлено тісний зв'язок метаболічних шляхів глутатіонової системи та гідроген сульфід: введення глутатіону сприяло зростанню продукції і вмісту гідроген сульфід та підвищенню активності H_2S -генеруючих ензимів у печінці щурів із нефропатією завдяки включенню трипептиду як джерела цистеїну в процеси синтезу гідроген сульфід, а також завдяки його детоксикаційним та антиоксидантним властивостям.

Результати власних досліджень розділу викладено у статтях, апробовано на науковому форумі:

1. Ferenchuk EO, Gerush IV. Effect of 7-day introduction of glutathione on activities of H₂S-producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. *Medical and Clinical Chemistry*. 2019; (1): 5-9 [195]
2. Ференчук Є, Геруш І. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфід у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. *Укр.біофарм.журнал*. 2018; 1 (58): 18-21 [196]
3. Ferenchuk Ye. Glutathione influence on biochemical indices of serum in experimental nephropathy. *Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11, 13, 18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с. 111 [169]*

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В Україні та світі невпинно зростає кількість нефрологічних хвороб. Причинами ураження клубочкового апарату та паренхіми нирок можуть бути впливи нефротоксичних отрут, ендокринні патології, ускладнення цукрового діабету тощо. Характерними клініко-лабораторними ознаками захворювання є набряки, протеїнурія, підвищення артеріального тиску. Досить часто захворювання нирок виникають внаслідок вживання лікарських засобів: гострий некроз канальців, ішемічний некроз, гострий інтерстиціальний нефрит – нефропатії, які проявляються гострою нирковою недостатністю внаслідок дії ліків та їх метаболітів. Патогенез нефропатії, як і ускладнення, які супроводжують захворювання видільної системи, є багатограним та складним процесом, обумовленим різними чинниками.

Є чимало наукових праць [3, 5, 18, 89] про те, що захворювання нирок активізує окислювальний стрес, знижує рівень антиоксидантів, регулює експресію молекул, що сприяє пошкодженням інших тканин, однак точні механізми дисфункції органів, спричиненої захворюванням нирок, потребують детальних експериментальних та клінічних досліджень. Відомо, що адаптивні реакції організму при стресових впливах спрямовуються на підтримання гомеостазу, і в цьому процесі пріоритетну роль відіграють нирки та печінка, і оскільки головним чинником ураження є оксидативний стрес, використання антиоксидантів – цілеспрямований грамотний підхід до корекції порушень функціональної активності печінки за умов нефропатії.

Науковці зацікавлені в детальному вивченні цитопротекторів природнього походження з різноспрямованими механізмами дії та високим ступенем безпечності застосування. Система глутатіону є життєво необхідною для підтримання окисно-відновного гомеостазу нормальних

клітин організму та має ряд переваг у якості цитопротектора: глутатіон має природній метаболічний шлях, нетоксичний, володіє детоксикаційними та антиоксидантними характеристиками, але водночас чимало ефектів глутатіону на метаболізм організму, зокрема, за умов нефропатії ще потребують детального вивчення.

Захворювання нирок та печінки, порушення балансу оксидант-антиоксидантної системи, яке їх супроводжує, впливатиме на концентрацію основного компонента антиоксидантної системи, глутатіону, оскільки в нирках сполука інтенсивно використовується під час транспорту амінокислот через мембрану в γ -глутаміловому циклі Мейстера, а більша частина вмісту GSH плазми крові забезпечується його синтезом в печінці. Отже, порушення функціональності цих органів може призводити до системного міжорганного порушення гомеостазу глутатіону.

Експериментальна модель нефропатії, викликана ін'єкцією високої дози фолієвої кислоти, повторює послідовність патологічних (набряк ниркових епітеліальних клітин, атрофія ниркових каналців, апоптоз) та адаптивних реакцій, які спостерігаються у людей за умов гострої ниркової недостатності, та дозволяє вивчати механізми ушкодження нефротичних каналів та поступовий фіброз тканин [6, 21,118].

Експериментальну нефропатію моделювали шляхом введення високої дози фолієвої кислоти (250 мг/кг маси тіла тварини). Наявність захворювання підтверджували морфологічно: виявлено відкладання кристалів фолієвої кислоти всередині ниркових каналців у кірковій речовині нирок. Питомий об'єм епітеліоцитів проксимальних каналців у стані альтерації у середньому становив 84,8%, окисна модифікація протеїнів (згідно коефіцієнту R/V при забарвленні бромфеноловим синім за Mikel Calvo) зростала, а вміст глікогену знижувався.

У проксимальному відділі нефрону відбуваються основні процеси реабсорбції профільтрованих клубочками речовин, і пошкодження епітелію

каналців проксимального відділу нефрону із подальшою проліферацією тубуло-інтерстиціального розпаду на усі шари нирок зумовило зниження фільтруючої здатності нирок. Швидка поява кристалів фолієвої кислоти всередині ниркових каналців викликає альтерацію епітелію проксимальних каналців нирки, запальну інфільтрацію клітин та згодом зумовлює некроз і появу кортикальних рубцювань.

Результати наших досліджень крові показали, що в процесі розвитку ФК-нефропатії накопичуються азотовмісні сполуки: на третю добу експерименту спостерігається збільшення рівня креатиніну на 59%, яке підкреслює погіршення фільтраційної функції і здатності нирок до виведення з кровотоку продуктів азотного обміну. На сьому добу експерименту імовірно компенсаторне відновлення функції нирок – рівень креатиніну порівняно з контрольною групою виріс на 30%. Суттєві зміни концентрації креатиніну дозволяють використовувати сполуку для раннього діагностування стану нирок та підтвердження моделі нефропатії.

За умов застосування глутатіону протягом трьох діб рівень креатиніну знижувався на 16%, а семиденне введення прирівнює показники креатиніну у сироватці крові експериментальних тварин до контрольних показників, що вказує на відновлення функціональної активності нирок та підвищення активності виведення продуктів азотистого обміну.

На третю добу експерименту за умов фолієвої нефропатії у сироватці тварин дослідної групи вміст сечовини внаслідок посиленої пасивної реабсорбції в ниркових каналцях виріс на 27%, а на 7 день – на 15% у порівнянні з групою контролю. Концентрація сечовини підвищується при послабленій видільній функції нирок. Також на 3 та 7 доби після моделювання захворювання та введення трипептиду встановлено, що вміст сечовини наближається до показників контрольної групи тварин, і свідчить про нормалізацію фільтраційної здатності нирок щодо виведення продуктів азотистого обміну. Показники креатиніну та сечовини в крові

використовуються для оцінки швидкості клубочкової фільтрації, а їх підвищені рівні спостерігаються за умов ниркової недостатності.

Про загальну інтоксикацію організму за умов експерименту свідчить достовірне зниження концентрації загального протеїну та альбуміну плазми крові дослідних тварин протягом всього експериментального періоду, і за умов застосування глутатіону концентрація досліджуваних сполук зростала, але до значень, отриманих у групі контрольних тварин, не прирівнювалась.

Підвищення рівня пероксидного окиснення протеїнів є однією з ланок розвитку патологічних станів внаслідок окисного стресу. Вважають, що деструкція протеїнів є більш показовою при окиснювальних пошкодженнях тканин, ніж ПОЛ, оскільки продукти ОМП є стабільнішими порівняно з продуктами окиснення ліпідів [153, 157].

Окисна модифікація протеїнів пов'язана з пошкодженням як поліпептидного ланцюга, так і окремих амінокислот з утворенням декількох типів радикалів. Рівні ОМП зростали у крові щурів з нефропатією, але глутатіон, проявляючи захисну роль від оксидативного стресу, знижував рівень ОМП, що вказує на відновлення рівноваги між процесами окиснення молекул протеїнів та активності протеаз. Інтенсивність окисної модифікації протеїнів є фактором, що впливає на стан антиоксидантної системи, та може бути маркером ступеня інтенсивності пероксидних процесів та адаптаційних реакцій організму [159].

За умов нефропатії спостерігали збільшення концентрації АФО та вмісту ТБК-ап (на 21% – третій день експерименту та 22,5% – на сьомий день) – кінцевих продуктів вільнорадикальних реакцій, що може викликати модифікацію ензимів та руйнування біоантиоксидантів, зміну структурних і функціональних властивостей мембран, зниження їх проникності, і вказує на окислювальний стрес у тварин. Семиденне введення тваринам антиоксиданту приближує рівень ТБК-активних продуктів до контрольних значень, що свідчить про здатність трипептиду зменшувати інтенсивність ПОЛ.

Рівень церулоплазміну у тварин з нефропатією збільшувався на 28% та 43% на 3-ю та 7-у добу відповідно. Максимальне зростання церулоплазміну спостерігається в період загострення нефропатії, на 7-у добу експерименту, що дозволяє використовувати його в ролі біомаркера для встановлення першої стадії нефропатії та фази загострення захворювання. Церулоплазмін проявляє оксидазну активність, бере участь у окисно-відновних реакціях, знешкоджуючи супероксидні аніони в позаклітинному середовищі, пригнічує ліпідну пероксидазу. За умов введення глутатіону спостерігали приближення рівня церулоплазміну до контролю на 3-ю експериментальну добу та зниження його вмісту на 35% на 7-й день порівняно з групою тварин без корекції.

Рівень SH-груп у крові щурів із нефропатією був нижчим на 26% на 3-й день та на 9% на 7-й день експерименту порівняно зі значеннями контролю, що є характерною метаболічною ознакою гострої гіпоксії.

Глутатіон завдяки своїй структурі та антиоксидантній властивості відновлював вміст SH-груп до показника контролю протягом усього експериментального періоду.

Стан антиоксидантної системи крові оцінювали за активністю таких ензимів як каталаза, супероксиддисмутаза та глутатіонпероксидаза.

Каталаза крові тварин після введення фолієвої кислоти знижувалася на 25% протягом обох експериментальних днів порівняно з тваринами контрольної групи, що ми розглядаємо як реакцію організму на розвиток нефропатії і знижений захист від вільних радикалів, який і призводить до посилення пероксидного окислення ліпідів та протеїнів. Введення глутатіону викликало незначне підвищення активності ензиму на 3-ю добу експериментального дослідження, але на 7-й експериментальний день достовірних змін не було виявлено.

Зниження активності глутатіонпероксидази у крові, яке ми спостерігали під час експерименту (на 40% – 3-й день та на 20% – 7-й день

дослідження), є одним із показників ураження нирок. Знижена реакція організму на утворення пероксиду гідрогену і пероксидів ліпідів як результат одночасного пригнічення активності GPx та КАТ робить нирки більш вразливими до окислювального стресу, спричиненого фолієвою кислотою.

Введення глутатіону збільшує активність GPx, прирівнюючи показники до контрольного значення протягом усіх експериментальних днів порівняно з групою тварин без введення трипептиду.

Результати нашого дослідження показали, що активність супероксиддисмутази за умов експерименту змінювалася, але значні зміни спостерігалися лише у групі тварин з нефропатією на сьомий день патології, що підтверджує посилену роботу інших антиоксидантних ензимів та їх виснаження у процесі розвитку ниркової дисфункції.

Попередні дослідження гістологічних та біохімічних параметрів тканин нирок показали, що патогенною ознакою індукованої ФК нефропатії є мітохондріальна дисфункція – зменшення копій мтДНК, пригнічення експресії мітохондріальних генів mt-COX1 і mt-ND1, зниження рівня АТФ, надмірна продукція АФО та окислювальний стрес, що, в свою чергу, посилює патологію.

Хоча утворення АФО є нормальним фізіологічним процесом та медіатором важливих міжклітинних сигнальних шляхів, дія ушкоджувальних факторів призводить до збільшення їх продукції, тому АФО розглядаються як один з основних чинників ініціації та прогресування супутніх захворювань при нефропатії, зокрема печінки, яка особливо чутлива до АФО та токсичних речовин. Токсичне ураження печінки опосередковується цитокінами, фактором некрозу (TNF- α), інтерлейкінами, трансформуючими факторами росту (TGF- α і - β), вільними кисневими радикалами, оксидом азоту, які продукуються активованими прозапальними клітинами [4, 149].

Мітохондрії відіграють ключову роль у координації найважливіших клітинних функцій, є не тільки джерелом енергії, а й мішенню

внутрішньоклітинних сигналів, генератором вторинних месенджерів та проапоптотичних факторів. Припускають, що дисфункція мітохондрій є початковим етапом проявів гепато- та нефротоксичності, оскільки енергетичні станції клітин виступають первинною мішенню для токсинів.

Результати досліджень вказують на порушення метаболізму за умов нефропатії, зокрема про ушкодження гепатоцитів свідчить зниження протеїнсинтезувальної функції печінки, підвищена проникність біологічних мембран клітинних оболонок, що спричиняє підвищення активності ензимів АЛТ та γ -глутамілтранспептидази у сироватці крові.

Відомо, що глутатіон відіграє вирішальну роль у сигналізації клітин за двома шляхами: модифікацією окислювально-відновної системи, що пов'язують зі зниженням концентрації GSH та (або) збільшенням GSSG, що допомагає активувати фактори транскрипції, синтез генів та протеїнів із антиоксидантними властивостями; та утворення дисульфідного зв'язку між тіоловими групами (P-SH) протеїнів – GSH генерує змішані (білкові та небілкові) дисульфіди, S-глутатильовані протеїни (PSSG). Важливим механізмом впливу глутатіону й глутатіон-S-трансферази на організм є участь у детоксикації ксенобіотиків, тому застосування глутатіону знижує активність АЛТ та γ -глутамілтранспептидази.

Результати досліджень, проведених у крові тварин із різних експериментальних груп, показують, що тварини із захворюваннями нирок мають порушення антиоксидантної системи крові, про які свідчать зменшення активностей глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази та каталази, зниження рівня концентрації SH-груп, збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, рівнів окисної модифікації протеїнів і вмісту церулоплазміну.

Активация вільнорадикального окиснення макромолекул та знижена активність системи антиоксидантного захисту тільки прискорює розвиток патологічних процесів у нирках, та через накопичення АФО і токсичних

метаболітів є провідним механізмом у розвитку супутніх захворювань печінки.

Отримані результати демонструють прояв захисних та ефективність антиоксидантних властивостей глутатіону за умов патології: трипептид завдяки підвищенню рівня SH-груп сприяє корекції активності глутатіонпероксидази та опосередковано позитивно впливає на активність інших антиоксидантних захисних ензимів зниженням вмісту ТБК-активних продуктів, рівня окисної модифікації протеїнів та церулоплазміну.

Вивчення структурно-функціонального стану мітохондрій та особливостей біотрансформації енергії у мітохондріях за умов негативних впливів є цікавою сферою досліджень. Сучасні науковці дедалі частіше встановлюють взаємозв'язки між енергетичним балансом, оксидативним стресом, генетичними порушеннями та розвитком патологій [197-200]. Враховуючи те, що ниркові дисфункції супроводжуються метаболічними порушеннями і токсичним ураженням організму, призводять до оксидативного стресу у клітинах, ми провели дослідження системи енергозабезпечення мітохондрій та стану АОС печінки як головного детоксикаційного органу.

Функціонування мітохондрій безпосередньо пов'язане з підтриманням клітинного редокс-балансу та енергетичного обміну. Важливою складовою мітохондріальної АОС є глутатіон, куди сполука транспортується з цитоплазми, і оскільки концентрація антиоксиданту у гепатоцитах за умов патології була низькою, у мітохондріях гепатоцитів теж спостерігалось зниження SH-груп на 31% та 33% – 3-й та 7-й експериментальний день відповідно, що говорить про прогресування оксидативного стресу в гепатоцитах.

Ми припускаємо, що глутатіон може відігравати важливу роль у захисті мітохондріальної мембрани від окислювального пошкодження – введення антиоксиданта сприяло підвищенню SH-груп на 17% та 24%

відповідно до діб експерименту, порівняно з групами тварин з нефропатією. Відомо, що основна роль у підтримці редокс-гомеостазу клітин належить глутатіону завдяки його участі в тіол-дисульфідному обміні, регуляції генної експресії ензимів, метаболічних шляхах антиоксидантного захисту.

Виявлене зменшення кількості SH-груп у мітохондріях спонукало з'ясувати вплив патології на систему енергозабезпечення гепатоцитів і дослідити ефективність введення екзогенного глутатіону для покращення стану організму при захворюваннях нирок та печінки.

Мітохондрії вважаються основним джерелом розвитку АФО, які впливатимуть на внутрішньо-клітинні сигнали, регуляцію функцій клітин та неспецифічну імунну відповідь, викликатимуть окисне пошкодження мітохондріальних протеїнів, мембран, ДНК, стимулюватимуть апоптоз клітини, порушуватимуть здатність клітин до синтезу АТФ та участі в інших метаболічних процесах – циклі трикарбонових кислот, окисненні жирної кислоти, циклі сечовини, обміні амінокислот, синтезі гему [61, 66, 69, 201-203]. Мітохондріальний рівень АФО збільшується в умовах гіпоксії, ішемії, стресу та при багатьох патофізіологічних станах та їх лікуванні [82], а mGSH є найважливішим компонентом, що запобігає дії АФО або відновлює стан органел [73].

Клітини печінки характеризуються активним метаболізмом – гепатоцити гостро реагують на нестачу макроергічних сполук при виникненні мітохондріальних порушень. Результати експерименту вказують на зниження активності NADH-дегідрогенази і сукцинатдегідрогенази у мітохондріях гепатоцитів щурів із нефропатією на третю добу порівняно з контрольною групою, ймовірно, внаслідок порушення структурної функціональної організації ланцюга дихальних комплексів I та II в експериментальних умовах.

Відомо, що навіть незначні зниження активності комплексу I здатні призвести до поступової деполяризації внутрішньої мітохондріальної

мембрани та утворення АФО, що може посилити окислювальний стрес та ініціювати відкриття мітохондріальної апоптичної пори. Комплекс I дихального ланцюга піддається зворотньому S-глутатіонуванню за допомогою Grx2, а порушення цього процесу часто пов'язують із розвитком патологій.

Активність другого комплексу дихального ланцюга відображає енергетичний потенціал клітини, оскільки сукцинатдегідрогеназа міцно зв'язана із внутрішньою мембраною мітохондрій, і її функція від системи NAD/NADH⁺ не залежить, що дозволяє комплексу II зберігати енергосинтезуючу активність в умовах гіпоксії.

Сукцинатдегідрогенний комплекс – єдиний у дихальному ланцюзі мітохондрій, який не містить поліпептидів, залежних від мітохондріальної ДНК, тому менше піддається інгібуючому впливу стресових факторів.

За умов 3-денної патології знижена на 26,8% активність сукцинатдегідрогенази вказує на початкові етапи формування тканинної гіпоксії. При 7-денному ураженні нирок зниження активності ензиму у печінці (на 16,7%) свідчить про прогресування захворювання та порушення метаболічних шляхів гепатоцитів, спричинене токсичним ураженням клітин печінки.

У той же час активність цитохромоксидази зменшилася на 50% протягом усіх експериментальних днів, у тому числі після введення глутатіону, порівняно з показниками, отриманими у контрольній групі тварин. Дефіцит ензиму протягом всього експериментального періоду свідчить про пригнічення енергетичного метаболізму в мітохондріях та можливий зсув окислювального метаболізму в сторону гліколізу – як механізм адаптації клітини в умовах гіпоксії та активації активних форм кисню.

Активність H⁺-АТФази у гепатоцитах щурів з нефропатією зменшувалася на 37,52% на 3-й день експерименту та на 33% на 7-й експериментальний день.

Отримані результати підтверджують важливість реакцій S-глутатіонування для модуляції продукції АТФ і знешкодження АФО у мітохондріях, демонструють важливу регуляторну роль глутатіону у процесі енергоутворення. Введення глутатіону збільшує кількість АТФ гепатоцитах підвищенням активностей ензимів комплексів I, II, V (на 7,8%, 31% та 20% на 3-й експериментальний день, і на на 7-у добу – 17,7% та 26,7% активності ензимів II та V комплексів).

Останні дослідження вказують на те, що не лише I та III комплекси дихального ланцюга, а й комплекс II, може бути джерелом АФО за умов порушень метаболізму, а S-глутатіонування комплексу необхідне для захисту сукцинатдегідрогенази від окислювальної дезактивації та порушення протеїн-протеїнових взаємодій ензиму з комплексом III. Відомо, що сукцинатдегідрогеназа має в складі тіольні групи, від яких залежить її активність, тому застосування глутатіону є найбільш ефективним для регуляції комплексу II та підтримки синтезу АТФ завдяки зростанню FAD-залежного шляху перенесення електронів [173, 179, 204-205].

Отже, глутатіон проявляє в мітохондріях декілька шляхів захисту від оксидативного стресу в печінці тварин з нефропатією: безпосередньо знешкоджує O_2^- , $\cdot OH$, $HOCl$, $RO\cdot$, $RO_2\cdot$ та підтримує S-глутатіонілювання протеїнів, яке є важливим для регулювання функції протеїнів дихальних комплексів I, III і V через дію глутатіон-S-трансферази.

Виявлені зміни у системі енергозабезпечення в печінці тварин із експериментальною нефропатією спонукали з'ясувати, чи впливає патологія на антиоксидантну систему гепатоцитів, тому наступним етапом роботи стало дослідження стану системи глутатіону в клітинах печінки.

У експериментальних групах тварин за умов нефропатії посилювалися процеси вільнорадикальних ушкоджень молекул у печінці: зафіксовано зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 17% на 3-й день та на 27% на 7-й день експерименту, в той же час зниження інтенсивності ПОЛ було

очевидним лише на 7-й день експерименту за умов застосування трипептиду, вміст якого у печінці тварин з нефропатією знижувався на 33% на 3-й експериментальний день, та на 23% - на 7-й через посилену продукції АФО і підвищені активності системи антиоксидантного захисту та детоксикації печінки. Застосування глутатіону, як на 3-й, так і на 7-й день експерименту приводило показник до меж норми: антиоксидант здійснює зниження рівня мікросомальної пероксидації ліпідів, і має вирішальне значення для захисту високонасичених жирних кислот мікросомальної мембрани від вільних радикалів, що інтенсивно утворюються при дисфункції нирок.

Молекулярні зміни в системі GSH при патологіях можуть впливати на чутливість до лікарських засобів та їх засвоєння. Існує чимало досліджень [36, 41, 51] про роль глутатіону в регуляції росту пухлин та використання препаратів на основі трипептиду для специфічного націлювання на детокс-систему при лікуванні канцерогенезу з метою підвищення терапевтичної відповіді і зниження стійкості до хіміотерапії. Було показано [46-50], що GSH відіграє важливу роль в радіосенсибілізації гіпоксичних клітин, а можливість застосування GSH в реакціях хіміотерапії обґрунтовуються детоксикацією H_2O_2 та інших пероксидів за допомогою глутатіонпероксидази, нуклеофільними реакціями між GSH та лікарськими засобами, зв'язуванням ліків із GSH, завдяки GSH-трансферазі, та антиоксидантним характеристикам шляхом запобігання виробництву гідроксильних радикалів та підтримання відповідного окислювально-відновного балансу для попередження або відновлення окисних модифікацій, що призводять до пошкодження мембрани і загибелі клітин.

Зниження вмісту антиоксиданта, яке ми спостерігали у печінці тварин за умов нефропатії, відобразилося на активності GPx, яка за умов патології була нижчою порівняно з показниками контролю, внаслідок чого знижується стійкість організму до окиснювального ураження, проте після семиденного

введення глутатіону рівень зростання активності ензиму склав 23% порівняно до показника, отриманого у групі тварин із нефропатією.

Також за умов нефропатії в гепатоцитах відбулося зниження активності GST на 22,5% на 3-й день дослідження та на 9% – на 7-й експериментальний день. З'ясовано, що за умов динамічної рівноваги між окиснювальними процесами і антиоксидантним захистом, трьохразове уведення екзогенного глутатіону не вплинуло на абсолютні значення активності ензимів антиоксидантного захисту системи глутатіону. Нормалізація показника активності GST до значень контролю, зокрема, відбулася тільки при семиденному застосуванні.

У мітохондріях печінки щурів відбувається активація генерації активних кисневих метаболітів, що викликало порушення мембранних структур мітохондрій. Наслідком встановлених у гепатоцитах цитоплазматичних та мітохондріальних змін є порушення синтезу енергії АТФ, що несе негативні метаболічні наслідки для всього організму, оскільки печінка потребує великої кількості енергії для перебігу всіх обмінних процесів – вона є центральним органом хімічного гомеостазу, де створюється єдиний обмінний та енергетичний пул для метаболізму протеїнів, вуглеводів та ліпідів.

Отже, глутатіон відіграє важливу роль у захисті мітохондріальної мембрани гепатоцитів від окисного пошкодження та контролює виробництво АТФ; трипептид знижує вміст ТБК-ап, підвищує рівень SH-груп та нормалізує активність ензимів комплексів I та II дихального ланцюга, чим забезпечує покращення енергопродукуючої функції клітин.

Позитивні зміни, які спостерігалися при введенні глутатіону, можуть розглядатися як сигнал для перерозподілу мітохондріальної енергії з метою стабілізації енергетичного метаболізму, а, отже, зниження рівня АФО та збереження усіх метаболічних шляхів за умов патології.

Зміни ряду параметрів, що характеризують функціональну активність мітохондрій і клітин печінки, в першу чергу, активність ензимів енергетичного метаболізму, рівень GSH, носять коливальний характер, відображаючи розвиток компенсаторних механізмів у гепатоцитах при інтоксикації, що забезпечують метаболічну адаптацію за умов нефропатії.

Хоча організм має значні потужності для синтезу та відновлення трипептиду, в умовах, коли порушено синтез АТФ або піридиновий нуклеотидний окисно-відновний статус, є доцільним застосування екзогенного глутатіону.

Встановлене зниження енергопродукуючого стану гепатоцитів, виявлені порушення в стані антиоксидантного захисту та інтенсивна генерація АФО на фоні зниженої протеїнсинтезувальної функції печінки за умов нефропатії робить цікавим дослідження показників обміну гідроген сульфід у печінці щурів з експериментальною ФК-нефропатією та за умов впливу глутатіону.

Відомо [110, 183], що H_2S бере участь у відновлювальному гомеостазі та антиоксидантних реакціях, регуляції запальних реакцій, продукуванні АТФ. У малих концентраціях H_2S стимулює транспорт електронів, виступаючи в ролі їх донора. H_2S може запускати запрограмовану загибель клітин із залученням мітохондріального шляху апоптозу, активацією каспази-3 і родини MAP-кіназ.

Проапоптотичний ефект гідроген сульфід у високих концентраціях супроводжується генерацією АФО, зниженням вмісту глутатіону, але за умов низьких концентрацій газотрансмітер має цитопротекторний ефект, обумовлений його здатністю нейтралізувати активні форми молекул.

Досліджуваний нами рівень H_2S у крові щурів із нефропатією був нижчим за показник контрольної групи тварин на 35,5% на 3-й день та на 25,7% на 7-й день експерименту, і асоціювався зі специфічним об'ємом епітеліальних клітин проксимальних каналців нирки. Глутатіон збільшив

рівень газотрансміттера (на 14,3% на 3-й та на 11% на 7-й експериментальний день) у плазмі крові щурів порівняно з групою тварин без введення антиоксиданта.

У печінці тварин за умов експериментальної нефропатії спостерігалось зниження концентрації гідроген сульфїду та продукції гідроген сульфїду, порівнюючи з контрольною групою, через пригнічення активностей ензимів цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін- β -синтази та цистеїноамінотрансферази.

Вважаємо, що знижене енергопостачання печінки є однією з передумов зниження синтезу гідроген сульфїду в гепатоцитах.

Також, взявши до уваги те, що внутрішньоклітинна концентрація цистеїну є регуляторною та обмежувальною у швидкості синтезу трипептиду в умовах підвищеної потреби в антиоксидантному захисті глутатіонової системи, ми припустили, що амінокислота використовується на синтез глутатіону, знижуючи інтенсивність обміну сірководню. Тому нами було висуното гіпотезу про використання цистеїну, присутнього в складі глутатіону, у реакціях синтезу сірководню.

Введення глутатіону привело до значного зростання активностей ензимів, та, відповідно, продукції та концентрації газотрансміттера в порівнянні з групою тварин із нефропатією відповідно. Проте трипептид мав найменший вплив на активність CSE, і, зважаючи на те, що ензим вважається основним для синтезу гідроген сульфїду в печінці, ми вважаємо, що його знижена активність пов'язана з ушкодженням гепатоцитів та розвитком гіпоксії за умов нефропатії.

Метаболізм H_2S пов'язаний з тиодисульфідним обміном та синтезом глутатіону [3, 94], і висока концентрація гідроген сульфїду сприяє підвищенню рівня глутатіону. Трипептид може брати участь у трансмембранному перенесенні електронів, і є можливим шлях утворення H_2S із глутатіону шляхом нуклеофільного заміщення α -вуглецю [55].

Результатами наших експериментальних досліджень підтверджено участь глутатіону у підтримці активностей ензимів синтезу H_2S : встановлено тісний зв'язок метаболічних шляхів глутатінової системи та гідроген сульфїду завдяки включенню трипептиду як джерела цистеїну в процеси синтезу гідроген сульфїду (рис.6.1).

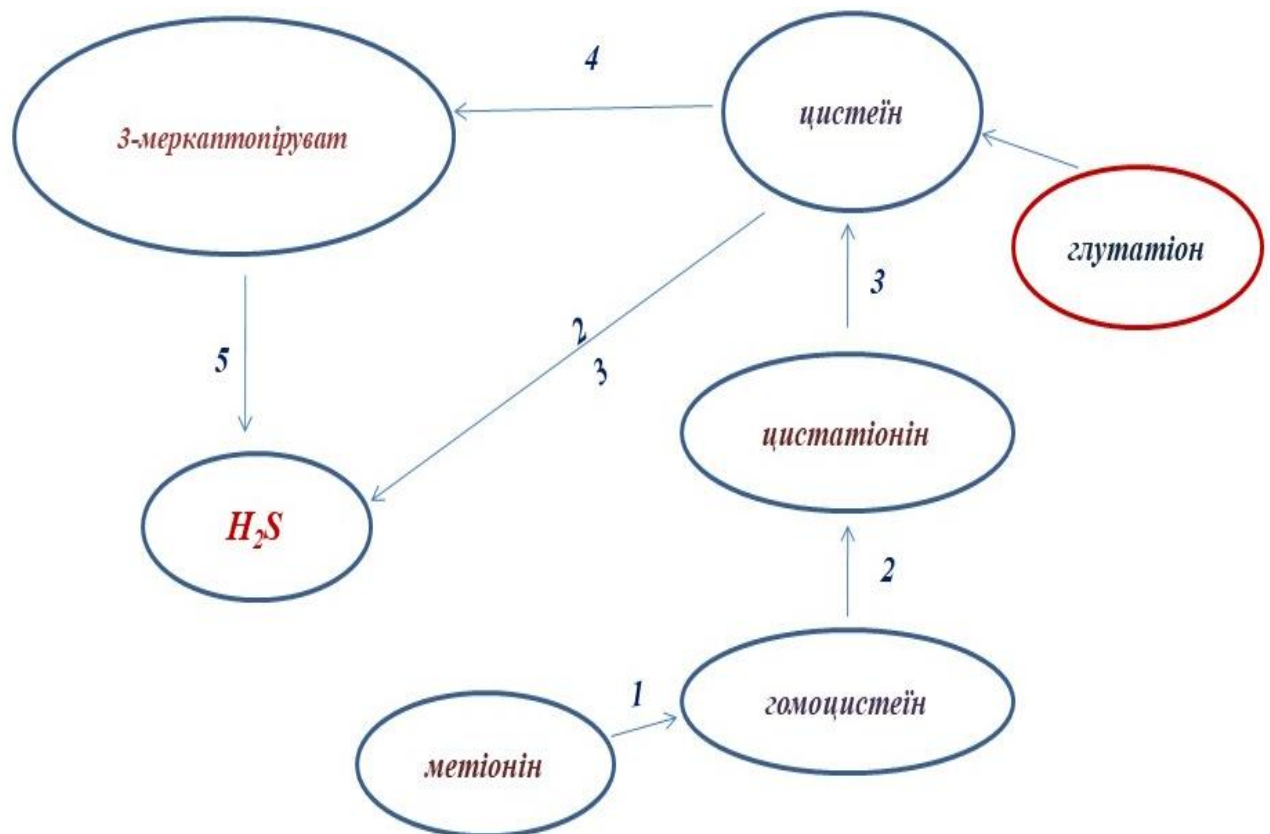


Рис. 6.1. Схема включення глутатіону у біосинтез гідроген сульфїду
 1 - метіонінаденозилтрансфераза, 2 - цистатіонін- β -синтаза, 3 – цистатіонін- γ -ліаза, 4 – цистеїнамінотрансфераза, 5 – меркаптопіруватсульфурттрансфераза

Слід звернути увагу, що при семиденному застосуванні глутатіону активність САТ перевищила показник контрольної групи тварин, що підтверджує зростання ресурсу амінокислоти цистеїну в гепатоцитах.

Антиоксидантні та детоксикаційні властивості глутатіону додатково сприяють покращенню досліджуваних показників обміну гідроген сульфїду шляхом знешкодження АФО у крові та печінці тварин із експериментальною нефропатією.

Активация процесів пероксидного окислення ліпідів, порушення стану антиоксидантного балансу та зміни в енергетичному метаболізмі ми розглядаємо як порушення метаболічних процесів у печінці при нефропатії. Результати нашої роботи демонструють позитивний вплив екзогенного глутатіону на метаболізм та свідчать про доцільність застосування антиоксиданта за умов нефропатії завдяки його участі в тіол-дисульфідному обміні, регуляції активності антиоксидантних ензимів, підтримці синтезу АТФ мітохондріях.

Висновки, сформовані за проведеними дослідженнями, допоможуть розширити уявлення наукової спільноти про стан оксидантно-антиоксидантної системи, енергозабезпечення мітохондрій гепатоцитів та особливості обміну гідроген сульфідом в печінці в умовах розвитку нефропатії та застосування глутатіону.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота містить теоретичне узагальнення та науково обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують задачу встановлення біохімічних особливостей стану оксидантно-антиоксидантної системи крові й печінки, системи енергозабезпечення та утворення гідроген сульфїду за умов експериментальної нефропатії і застосування глутатіону.

1. Експериментальна нефропатія викликає порушення оксидантно-антиоксидантного балансу крові щурів, супроводжується зниженням активності ензимів антиоксидантної системи захисту (каталази (на 25% ($p < 0,01$) на 3-й та 7-й дні експерименту), глутатіонпероксидази на 40% ($p < 0,05$) на 3-й та на 20% ($p < 0,05$) на 7-й день експерименту), інтенсифікацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, збільшенням рівня показників азотистого обміну (креатиніну (на 59% ($p < 0,05$) на 3-й та 30% ($p < 0,05$) – 7-й день експерименту), сечовини на 27% ($p < 0,05$) на 3-й та 15% ($p < 0,05$) – 7-й день експерименту), зростанням активностей γ -глутамілтранспептидази та аланіламінотрансферази. Застосування глутатіону регулює метаболізм через GSH-залежні шляхи, проявляючи антиоксидантні та детоксикаційні функції, та сприяє нормалізації досліджуваних показників.

2. Виявлено пригнічення активностей NADH-дегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази, H^+ -АТФ-ази дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів, і порушення синтезу АТФ за умов нефропатії. Уведення екзогенного глутатіону підтримує енергосинтезуючі функції ензимів дихального ланцюга та відновлює енергетичний обмін мітохондрій, що є важливим критерієм гепатопротекції за умов прогресування ниркової дисфункції. Введення глутатіону збільшувало активності сукцинатдегідрогенази на 31% ($p < 0,05$) та H^+ -АТФ-ази на 20% ($p < 0,05$) на 3-й експериментальний день, і на 17,7% ($p < 0,05$) та 26,7% ($p < 0,05$) відповідно – на 7 добу експерименту порівняно з щурами з нефропатією.

3. Встановлено, що нефропатія призводить до змін в оксидантно-антиоксидантній системі печінки, про що свідчить підвищений вміст ТБК-активних продуктів (на 17% ($p < 0,01$) – 3-й та 27% ($p < 0,05$) – 7-й день експерименту), зниження концентрації глутатіону (на 33% ($p < 0,01$) – 3-й та 23% ($p < 0,05$) – 7-й день експерименту), активності глутатіон-S-трансферази (на 22,5% ($p < 0,05$) – 3-й та 9% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту) і глутатіонпептидази (на 11,6% ($p < 0,05$) – 3-й та 36,5% ($p < 0,05$) – 7-й день експерименту), та кількості SH-груп (на 31% ($p < 0,05$) – 3-й та 33% ($p < 0,05$) – 7-й день експерименту) у мітохондріях. Виявлено корегуючу дію глутатіону на розвиток окислювального стресу у гепатоцитах за умов нефропатії.

4. Доведено, що в печінці щурів із нефропатією зменшуються H_2S -продукуючі активності ензимів: цистатіонін- γ -ліази (на 38,98% ($p < 0,01$) – 3-й та 31% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту), цистатіонін- β -синтази (на 33,73% ($p < 0,01$) – 3-й та 32,12% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту), цистеїн-амінотрансферази (на 26,76% ($p < 0,01$) – 3-й та 32,7% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту), що зумовлює зниження концентрації (на 37,92% ($p < 0,01$) – 3-й та 45,3% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту) та продукції гідроген сульфід (на 34,84% ($p < 0,01$) – 3-й та 27,8% ($p < 0,01$) – 7-й день експерименту) за умов нефропатії порівняно з контрольною групою тварин.

5. З'ясовано, що введення глутатіону сприяє зростанню продукції і вмісту гідроген сульфід та підвищенню активності H_2S -генеруючих ензимів у печінці щурів із нефропатією завдяки включенню трипептиду як джерела цистеїну в процесі синтезу гідроген сульфід, а також завдяки його детоксикаційним та антиоксидантним властивостям. Після 3-х та 7-денного введення глутатіону щурам з нефропатією спостерігалось зростання концентрації гідроген сульфід на 48,4% ($p < 0,01$) і 43% ($p < 0,01$) та його продукції на 36,3% ($p < 0,01$) і 36% ($p < 0,01$), збільшення гідроген сульфід-продукуючої активності цистатіонін- β -синтази – на 33,5% ($p < 0,01$) та 27% ($p < 0,01$), цистеїнамінотрансферази – на 49,3% ($p < 0,01$) і 49,7% ($p < 0,01$) на 3-й

та 7-й день відповідно, а також цистатіонін- γ -ліази на 31% ($p < 0,01$) за умов 3-денного експерименту. Встановлено взаємозв'язок між метаболічними шляхами глутатіонової системи та синтезом гідроген сульфїду.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Dienemann T, Fujii N, Orlandi P, Nessel L, Furth SL, Hoy W E, Feldman HI. International Network of Chronic Kidney Disease cohort studies (iNET-CKD): a global network of chronic kidney disease cohorts. *BMC Nephrol.* 2016; 17 (1): 121.
2. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED, Kellum JA. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nature Reviews Nephrology.* 2017; 13(4): 241–57.
3. Balakumar P, Chakkarwar VA, Kumar V, Jain A, Reddy J, Singh M. Experimental models for nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2008; 9(4): 189-95.
4. Li X, Zou Y, Xing J, Fu YY, Wang KY, Wan PZ, Zhai XY. Pretreatment with Roxadustat (FG-4592) Attenuates Folic Acid-Induced Kidney Injury through Antiferroptosis via Akt/GSK-3 β /Nrf2 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2020: 1–17.
5. Metz-Kurschel U, Kurschel E, Wagner K, Aulbert E, Graben N, Philipp T. Folate nephropathy occurring during cytotoxic chemotherapy with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil. *Ren Fail.* 1990;12(2): 93–7.
6. Nikolic T, Petrovic D, Matic S et al. The influence of folic acid-induced acute kidney injury on cardiac function and redox status in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2020; 393: 99–109.
7. Gyurászová M, Gurecká R, Bábíčková J, Tóthova L. Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2020: 1–11.
8. Vincent I, Okusa M. Biology of Renal Recovery: Molecules, Mechanisms, and Pathways. *Nephron Clinical Practice.* 2014; 127(1-4): 10–14.

9. Dominko K, Đikic D. Glutathionylation: a regulatory role of glutathione in physiological processes. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2018; 69(1): 1–24.
10. Forman H, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009; 30 (1-2): 1–12.
11. Xu C, Jin-Song B. The Role of Hydrogen Sulfide in Renal System. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 385-92.
12. Feliers D, Lee HJ, Kasinath B. Hydrogen Sulfide in Renal Physiology and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016; 25 (13): 720-731.
13. Chen Y, Jenq C, Hsu C et al. Acute kidney disease and acute kidney injury biomarkers in coronary care unit patients. *BMC Nephrol*. 2020; 21: 207.
14. Milkovic L, Cipak Gasparovic A, Cindric M, Mouthuy P, Zarkovic N. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cell*. 2019; 8: 793.
15. Shiao C, Wu P, Huang T, Lai T, Yang W, Wu KD. Long-term remote organ consequences following acute kidney injury. *Critical Care*. 2015; 19(1): 438.
16. Córdoba-David G, Duro-Castano A, Castelo-Branco R et al. Effective Nephroprotection Against Acute Kidney Injury with a Star-Shaped Polyglutamate-Curcuminoid Conjugate. *Sci Rep*. 2020; 10: 2056.
17. Singh A, Muthuraman A, Jaggi A. Animal models of acute renal failure. *Pharmacological Reports*. 2012; 64: 31-44.
18. Salem E, Salem N, Kamel M. Amelioration of gentamicin nephrotoxicity by green tea extract in uninephrectomized rats as a model of progressive renal failure. *Ren. Fail*. 2010; 32 (10): 1210-15.
19. Мазуркевич АЙ. Морфофункціональні зміни тканини нирок лабораторних тварин при експериментальній гліцероловій моделі гострої ниркової недостатності. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2012; 172 (4): 117-22.

20. Велика АЯ. Показники про-/антиоксидантної системи у нирках щурів за умов сольового навантаження на тлі токсичного ураження сулемою. Укр. журнал медицини, біології та спорту. 2018; 3(5): 19-24.
21. Baserga R, Thatcher D, Marzi D. Cell proliferation in mouse kidney after a single injection of folic acid. *Lab Invest.* 1968; 19: 92-6.
22. Schubert G, Welte K, Otten G. Chronic folic acid-nephropathy. *Res. Exp. Med.* 1974; 162:17–36.
23. Klinger EL, Evan AP, Anderson RE. Folic acid-induced renal injury and repair: correlation of structural and functional abnormalities. *Arch Pathol Lab Med.* 1980; 104:87–93.
24. Newbury LJ, Wang J, Hung G et al. Inhibition of Kirsten-Ras reduces fibrosis and protects against renal dysfunction in a mouse model of chronic folic acid nephropathy. *Sci Rep.* 2019; 9: 14010.
25. Taylor DM, Threlfall G, Buck AT. Stimulation of renal growth in the rat by folic acid. *Nature.* 1966; 212: 472-4.
26. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77: 1745-70.
27. Fink M, Henry M, Tange JD. Experimental folic acid nephropathy. *Pathology.* 1987; 19:143-9
28. Lash LH. Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2005; 204(3): 329-42.
29. Santangelo F, Witko-Sarsat V, Drueke T, Descamps-Latscha B. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2015; 19 (8): 1951-55.
30. Meister A, Tate S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. *Annu. Rev. Biochem.* 1976; 45: 559-604.
31. Meister A, Anderson M. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983; 52: 711-60.

32. Deponte M. The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures. *Antioxid. Redox Signal.* 2017; 27: 1130-61.
33. Bhattacharjee A, Chakraborty K, Shukla A. Cellular copper homeostasis: Current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. *Metallomics.* 2017; 9: 1376-1388.
34. Fahcy RC, and Sundquist AR. Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol.* 1991; 64: 1-53.
35. Aw TY, Wierzbicka G, Jones DP. Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. *Chem Biol Interact.* 1991; 80(1): 89-97.
36. Flagg EW, Coates RJ, Eley JW, Jones DP, Gunter EW, Byers TE, Block GS, Greenberg RS. Dietary glutathione intake in humans and the relationship between intake and plasma total glutathione level. *Nutr Cancer.* 1994; 21(1): 33-46.
37. Favilli F, Marraccini P, Iantomasi T, Vincenzini MT. Effect of orally administered glutathione on glutathione levels in some organs of rats: role of specific transporters. *Br J Nutr.* 1997; 78(2):293-300.
38. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004; 134(3): 489-92.
39. Hagen TM, Wierzbicka GT, Sillau AH, Bowman BB, Jones DP. Bioavailability of dietary glutathione: effect on plasma concentration. *Am J Physiol.* 1990b; 259 (4 Part 1): G524-G529.
40. Колесниченко ЛС. Исследование функциональных эффектов направленного изменения концентрации глутатиона. *Сибирский мед. журнал.* 2002; 1: 23-4.
41. Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH. The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992; 43(6):667-69.
42. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 2003; 333(1):19-39.

43. Park EY, Shimura N, Konishi T et al. Increase in the protein-bound form of glutathione in human blood after the oral administration of glutathione. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 6183-89.
44. Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants.* 2018; 7(5): 62.
45. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1823:1767-77.
46. Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Asp. Med.* 2009; 30: 13-28.
47. Belcastro E, Gaucher C, Corti A, Leroy P, Lartaud I, Pompella A. Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: Processes and targets in cardiovascular pathophysiology. *Biol. Chem.* 2017; 398: 1267-93.
48. Li JF, Huang PC, Wu FY. Highly selective and sensitive detection of glutathione based on anti-aggregation of gold nanoparticles via pH regulation. *Sens. Actuators B Chem.* 2017; 240: 553-59.
49. Pallardó FV, Markovic J, García JL, Viña J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Molecular Aspects of Medicine.* 2009; 30 (1-2): 77-85.
50. Yu X, Long YC. Crosstalk between cystine and glutathione is critical for the regulation of amino acid signaling pathways and ferroptosis. *Sci. Rep.* 2016; 6: 30033
51. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *The Journal of Cell Biology.* 2018; 217(7): 2291-98.
52. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary A, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014; 15: 4405-9.

53. Corso CR, Acco A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2018; 128: 43–57.
54. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43: 883-98.
55. Hendrix S, Jozefczak M, Wójcik M, Deckers J, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione: A key player in metal chelation, nutrient homeostasis, cell cycle regulation and the DNA damage response in cadmium-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.006>.
56. Alanazi AM, Mostafa G, Al-Badr AA. Glutathione. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 2015; 40: 43-158.
57. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: Potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*. 2012: 736837.
58. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 2004; 134: 489-492.
59. Altmann R. *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Veit, Leipzig. 1890.
60. Benda C. *Über die Spermatogenese*. *Arch Anal Physiol*. 1898; 393–8.
61. Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*. 2017; 391:42–53.
62. Laan M, Horvath SE, Pfanner N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr Opin Cell Biol*. 2016; 41: 33–42.
63. Bailey R. *Electron Transport Chain and Energy Production Explained*. 148 In: ThoughtCo. <https://www.thoughtco.com/electron-transport-chain-and-energy-production>. 2018; 4136143. Режим доступу: 17 червня 2020.

64. Ugarte-Uribe B, García-Sáez AJ. Apoptotic foci at mitochondria: in and around Bax pores. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2017; 372 (1726): 20160217.
65. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018; 285(3): 416-31.
66. Ma L, Ainsworth HC, Snipes JA et al. APOL1 Kidney-Risk Variants Induce Mitochondrial Fission. *Kidney Int Rep*. 2020; 5(6): 891-904.
67. Biasutto L, Azzolini M, Szabò I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(10): 2515.
68. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*. 2017; 86 (1): 715–48.
69. Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality. *Trends Biochem Sci*. 2016; 41: 261-73.
70. Friesen C, Kiess Y, Debatin K. M. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death and Differentiation*. 2004; 11: 73-85.
71. Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW, Peehl DM, Knox SJ. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death and Differentiation*. 2002; 9 (3): 252-63.
72. Xiao W, Loscalzo J. Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2020; 32(18):1330-47
73. Custodio J. B. A., Cardoso C. M. P., Almeida L. M. Thiol protecting agents and antioxidants inhibit the mitochondrial permeability transition promoted by etoposide: implications in the prevention of etoposide-induced apoptosis // *Chemico-Biological Interactions*. 2002. 140 (2): 169-84.

74. Calabrese G, Morgan B, Riemer J. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017; 27(15): 1162-77. doi:10.1089/ars.2017.7121
75. Pedrajas JR, McDonagh B, Hernandez-Torres F, MirandaVizuete A, Gonzalez-Ojeda R, Martinez-Galisteo E, Padilla CA, and Barcena JA. Glutathione is the resolving thiol for thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle. *Antioxid Redox Signal*. 2016; 24: 115-28.
76. Lash LH. Mitochondrial glutathione transport: Physiological, pathological and toxicological implications. *Chem. Biol. Interact*. 2006; 163: 54–67.
77. Beiraghi-Toosi A, Askarian R, Haghighi FS, Safarian M, Kalantari F, Hashemy S.I. Burn-induced Oxidative Stress and Serum Glutathione Depletion; a Cross Sectional Study. *Emergency*. 2017; 6 (1): e54.
78. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012; 149: 274-93.
79. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol*. 2012; 226: 274-86.
80. Saitoh T, Satoh H, Nobuhara M et al. Intravenous glutathione prevents renal oxidative stress after coronary angiography more effectively than oral N-acetylcysteine. *Heart Vessels*. 2011; 26(5): 465-72.
81. Circu ML, Moyer MP, Harrison L, Aw TY. Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med*. 2009; 47: 1190-8.
82. Gilkerson R, Bravo L, Garcia I, Gaytan N, Herrera A, Maldonado A, Quintanilla B. The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2013; 5: a011080.
83. Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*. 2012; 51: 2959-73.

84. Guha M, Avadhani NG. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion*. 2015; 13(6): 577-91.
85. Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11): 2685-700.
86. Korge P, Calmettes G, Weiss JN. Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1847(6-7): 514-25
87. Szabo C. Hydrogen sulfide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 6: 917-35.
88. Dugbartey GJ. H₂S as a possible therapeutic alternative for the treatment of hypertensive kidney injury. *Nitric Oxide* 2017; 64:52-60.
89. Dugbartey GJ, Bouma HR, Lobb I, Sener A. Hydrogen sulfide: A novel nephroprotectant against cisplatin-induced renal toxicity. *Nitric Oxide*. 2016; 57:15-20.
90. Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxid. Redox Signal*. 2014; 20: 770-82.
91. Wang P, Isaak CK, Siow YL. Downregulation of cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase expression stimulates inflammation in kidney ischemia-reperfusion injury. *Phys. Reports*. 2014; 2(12): e12251.
92. Giuffrè A, Vicente JB. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018: 1–31.
93. Dugbartey GJ. The smell of renal protection against chronic kidney disease: Hydrogen sulfide offers a potential stinky remedy. *Pharmacological Reports*. 2018; 70 (2): 196–205.

94. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.* 1982; 206 (2): 267-277.
95. Заичко НВ, Ольховский АС, Мельник АВ. Влияние полимикроэлементного препарата «Эсмин» на содержание гидрогенсульфида и показателей про- и антиоксидантной системы в миокарде крыс разного возраста. *Ukr. Biochem. J.* 2014; 86 (3): 69-76.
96. Zhao W. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO Journal.* 2001; 20(21), 6008-16.
97. Zhang D, Wang X, Tian X, Zhang L, Yang G, Tao Y, Liang C, Li K, Yu X, Tang X, Tang C, Zhou J, Kong W, Du J, Huang Y and Jin H. The Increased Endogenous Sulfur Dioxide Acts as a Compensatory Mechanism for the Downregulated Endogenous Hydrogen Sulfide Pathway in the Endothelial Cell Inflammation. *Front. Immunol.* 2018; 9: 882.
98. Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y., & Jin, H. H₂S-Induced Sulphydration: Biological Function and Detection Methodology. *Frontiers in pharmacology.* 2017; 8: 608.
99. McBean Gethin J. Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes Antioxidants. 2017; 6 (62): 61-74. doi:10.3390/antiox6030062
100. Hsu CN, Tain YL. Hydrogen Sulfide in Hypertension and Kidney Disease of Developmental Origins. *International journal of molecular sciences.* 2018; 19 (5): 1438.
101. Kanagy NL, Szabo C, Papapetropoulos A. Vascular biology of hydrogen sulfide. *American journal of physiology. Cell physiology.* 2017; 312(5): 537-49. doi:10.1152/ajpcell.00329.2016
102. Li S, Hong M, Tan HY, Wang N, Feng Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity,* 2016: 4234061.

103. Olson KR, Gao Y, Arif F, Arora K, Patel S, DeLeon ER, Straub KD. Metabolism of hydrogen sulfide (H₂S) and Production of Reactive Sulfur Species (RSS) by superoxide dismutase. *Redox biology*. 2018; 15: 74–85.
104. Gerush IV, Ferenchuk YeO. Hydrogen sulfide and mitochondria *Biopolym. Cell*. 2019; 35(1): 3-15. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000998>
105. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *J. Gastroenterol*. 2006; 131: 259-71.
106. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*. 2012; 92: 791-896.
107. Bhatia M. Role of Hydrogen Sulfide in the Pathology of Inflammation. *Scientifica*. 2012; 10: 60-72.
108. Rodrigues C, Percival SS. Immunomodulatory Effects of Glutathione, Garlic Derivatives, and Hydrogen Sulfide. *Nutrients*. 2019; 11(2): 295.
109. Perridon BW, Leuvenink HG, Hillebrands JL, van Goor H, Bos EM. The role of hydrogen sulfide in aging and age-related pathologies. *Aging*. 2016; 8(10), 2264-89. doi:10.18632/aging.101026
110. Sen N. Functional and Molecular Insights of Hydrogen Sulfide Signaling and Protein Sulfhydration. *Journal of molecular biology*. 2017; 429(4), 543-61.
111. Shefa U, Yeo SG, Kim MS, Song IO, Jung J, Jeong NY, Huh Y. Role of Gasotransmitters in Oxidative Stresses, Neuroinflammation, and Neuronal Repair. *BioMed research international*. 2017: 1689341. doi:10.1155/2017/1689341
112. Villa Bianca d'Emmanuele, Fusco F, Mirone V, Cirino G, Sorrentino R. The Role of the Hydrogen Sulfide Pathway in Male and Female Urogenital System in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2017; 27(10): 654-68.
113. Levonen AL, Lapatto R, Saksela M., Raivio K. O. Human cystathionine gamma-lyase: developmental and in vitro expression of two isoforms. *The Biochemical journal*. 2000; 347 (1): 291-5.

114. Cheung SH, Lau J. Hydrogen sulfide mediates athero-protection against oxidative stress via S-sulfhydration. *PloS one*. 2018; 13(3): e0194176.
115. Carter RN, Morton NM. Cysteine and hydrogen sulphide in the regulation of metabolism: insights from genetics and pharmacology. *The Journal of pathology*. 2016; 238(2): 321-32.
116. Cao, X., Bian, J. S. The Role of Hydrogen Sulfide in Renal System. *Frontiers in pharmacology*. 2016; 7: 385.
117. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*. 276, 33-79.
118. Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri S. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Exper. and Toxic. Pathol*. 2012; 64(3): 225-32.
119. Aw TY, Wierzbicka G, Jones DP. Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. *Chemico-Biological Interactions*. 1991; 80(1): 89-97.
120. Давиденко ІС. Заходи стандартизації гістохімічної методики на окиснювальну модифікацію білків. *Український медичний альманах*. 2013;16(3):180-1.
121. Назаренко ОА, Сергеева ТА, Солдаткін ОП. Креатинін та методи його визначення. *Біотехнологія*. 2009; 2 (1): 107-116.
122. Drupt F. Colorimetric method for determination of albumin. *Pharm. Biol. J*. 1974; 9: 777-9.
123. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol*. 1957; 28 (1): 56.
124. Влізло ВВ, Федорук РС, Ратич ІБ та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: СПОЛОМ. 2012: 764 с.

125. Мещишен ІФ. Метод визначення окисно модифікованих білків плазми (сироватки) крові. Буковинський медичний вісник. 1998; 2(1): 156–158.
126. Камышников ВС. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: изд. Беларусь. 2002; 494 с.
127. Beutler E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods. Orlando: Grune & Stratton. 1990; 134 p.
128. Карпищенко АИ, Глушков СИ, Смирнов ВВ. Глутатионзависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном. Токсикологический вестник. 1997; 3: 17-23.
129. Мещишен ІФ, Григор'єва НП. Метод кількісного визначення HS-груп у крові. Буковинський медичний вісник. 2002; 6: 190-192.
130. Колб ВГ, Камышников ВС. Справочник по клинической химии. Минск: изд. Беларусь. 1982; 290 с.
131. Дубинина ЕЕ, Сальникова А. Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови. Лабораторное дело. 1983; 10: 30-33.
132. Григор'єва НП, Мацьопа ІВ. Хроноритми активності супероксиддисмутазы у нирках щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2008; 1: 41-43.
133. Королюк КА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1: 16-19.
134. Власова СН, Шабунина ЕИ, Персегина ИА. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. дело. 1990; 8:19-22.
135. Геруш ІВ, Мещишен ІФ. Стан глутатіонової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастродуоденальної зони та дії настойки ехінацеї пурпурової. Вісник проблем біол. та медицини. 1998; 7: 10-15.

136. Habig WH, Pabs MJ, Fleischner G. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1974; 71: 3879-82.
137. Weinbach EC. A procedure for isolating stable mitochondria from rat liver and kidney. *Anal Biochem*. 1961; 2(4): 335-43.
138. Sharova IV, Vekshin NL. Rotenone-insensitive NADH oxydation in mitochondrial suspension occurs by NADH dehydrogenase of respiratory chain fragments. *Biophysic*. 2004; 49 (5): 814-21.
139. Прохорова МИ. Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та. 1982: 193-194.
140. Остапченко ЛІ. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій. Київ: Київський університет. 2005: 268 с.
141. Габибов ММ. Влияние гипербарической оксигенации на активность протонной АТФ-азы митохондрий различных тканей крыс. *Укр. биохим. журн*. 1986; 58 (5): 81-83.
142. Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286: 678-85.
143. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982; 206: 267-277.
144. Yang G, Yang W, Wu L, Wang R. H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem*. 7; 282: 16567-76.
145. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-75.
146. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион. 2000: 320 с.

147. Kao CC, Yang WS, Fang JT, Liu KD, Wu VC. Remote organ failure in acute kidney injury. *Journal of the Formosan Medical.* 2018. doi:10.1016/j.jfma.2018.04.005
148. Haase M, Mertens PR. Biomarkers: more than just markers! *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30(1): 33-8.
149. Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, Carrasco S, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Nino M, Ruiz Ortega M, Egido J, Linkermann A, Ortiz A et al. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 2017; (28): 218-29.
150. Fontecha-Barriuso M, Martin-Sanchez D, Martinez-Moreno JM et al. PGC-1alpha deficiency causes spontaneous kidney inflammation and increases the severity of nephrotoxic AKI. *J. Pathol.* 2019; 249: 65-78.
151. Lee JW, Chou CL, Knepper MA. Deep sequencing in microdissected renal tubules identifies nephron segment-specific transcriptomes. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26: 2669-77.
152. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease-A Systematic Review and Meta-Analysis. 2016; 11: e0158765.
153. Yan LJ. Analysis of oxidative modification of proteins. *Curr Protoc Protein Sci.* 2009; Chapter 14: Unit144.
154. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 2017; 86: 715-48.
155. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J.* 2016; 473: 805-25.
156. Schoneich C. Thiyl radicals and induction of protein degradation. *Free Radic. Res.* 2016; 50: 143-9.
157. Devarie-Baez NO, Silva Lopez EI, Furdui CM. Biological chemistry and functionality of protein sulfenic acids and related thiol modifications. *Free Radic. Res.* 2016; 50: 172-94.

158. Mason RP. Imaging free radicals in organelles, cells, tissue, and in vivo with immuno-spin trapping. *Redox Biol.* 2016; 8: 422-29.
159. Rykaer M, Svensson B, Davies MJ, Hagglund P. Unrestricted mass spectrometric data analysis for identification, localization and quantification of oxidative protein modifications. *J. Proteome Res.* 2017; 16: 3978-88.
160. Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartesaghi S, Carballal S, Romero N, Alvarez B, Radi R. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem. Rev.* 2018; 118: 1338-1408.
161. Das S, Sahoo PK. Ceruloplasmin, a moonlighting protein in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2018 Nov; 82: 460-8.
162. Jerebtsova M, Saraf SL, Lin X, et al. Identification of ceruloplasmin as a biomarker of chronic kidney disease in urine of sickle cell disease patients by proteomic analysis. *Am J Hematol.* 2018; 93(2): E45-E47. doi:10.1002/ajh.2496
163. Pulka-Ziach K. Influence of reaction conditions on the oxidation of thiol groups in model peptidomimetic oligoureas. *J Pept Sci.* 2018; 24(8-9): e3096.
164. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathionedependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830: 3217-66.
165. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Ференчук ЄО. Вплив глутатіону на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. *Мед. і кл. хімія.* 2018; 3: 27-32. doi: 10.11603/mcch.2410 681X.2018.v0.i3.9552
166. Ferenchuk Ye, Gerush I, Grigorieva N. Effect of glutathione on oxidant-antioxidant system and the content of hydrogen sulphide in the blood by experimental nephropathy. *PharmacologyOnline.* 2020 Apr 30; 1: 113-120.
167. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Дікал МВ, Ференчук ЄО, Чернюх ОГ. Спосіб корекції біохімічних показників сироватки крові при експериментальній нефропатії у щурів. Пат. № 9668/3У/20, Україна, МПК (2020.01) А61В 5/00 А61К 31/00 А61Р 13/00 G09В 23/28. № и 2019 11811; заявл. 11.12.2019; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14.

168. Gerush I, Ferenchuk Ye. Effects of 3 days glutathione introduction on the activities of antioxidant enzymes in the blood of rats with nephropathy. 8th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry; 18-20 September 2017, Poland; Lublin; 2017. p. 47.
169. Ferenchuk Ye. Glutathione influence on biochemical indices of serum in experimental nephropathy. Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11, 13, 18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с. 111.
170. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147: 37–52.
171. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* 2012; 942: 93–136.
172. Mailloux RJ, Willmore WG. S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2014; 2. doi:10.3389/fcell.2014.00068
173. Hirst J. Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem.* 2013; 82: 551–75. doi: 10.1146/annurev-biochem-070511-103700
174. Brand MD, Goncalves RL, Orr AL, Vargas L, Gerencser AA, Borch JM et al. Suppressors of Superoxide-H₂O₂ Production at Site IQ of Mitochondrial Complex I Protect against Stem Cell Hyperplasia and Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.* 2016; 24: 582-92. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.012
175. Zhang W, Yang Y, Gao H, Zhang Y, Jia Z, Huang S. Inhibition of Mitochondrial Complex I Aggravates Folic Acid-Induced Acute Kidney Injury. *Kidney and Blood Pressure Research.* 2019: 1-12.
176. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009; 417:1-13.

177. Gerush IV, Bevzo VV, Ferenchuk Ye O. The effect of melatonin on lipid peroxide oxidation, oxidative modification of proteins and mitochondria swelling in the skeletal muscle tissue of rats under alloxan diabetes Ukr Biochem J. 2018; 90(3): 62-9.
178. Yang Y, Fu Y, Wang P, Liu S, Sha Y, Zhang Y, et al. Intervention of mitochondrial activity attenuates cisplatin-induced acute kidney injury. *Int Urol Nephrol*. 2019 Jul; 51(7): 1207–18.
179. Lê-Quốc K, Lê-Quốc D. Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. *J Biol Chem*. 1985; 260(12): 7422-28.
180. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС. Система глутатиона 1. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомед. Химия* 2009; 55(3): 255-70.
181. Dunning S, Ur Rehman A, Tiebosch MH, et al. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832(12): 2027-34. doi:10.1016/j.bbadis.2013.07.008
182. Singhal SS. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2015; 289: 361-70.
183. Awasthi YC. Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016.
184. Ferenchuk YeO, Gerush IV. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy *Ukr.Biochem.J*. 2019; 91 (3): 19-24. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.019>
185. Ференчук ЕА, Коляник ІО. Влияние трехкратного введения экзогенного глутатиона на активность ферментов энергетического обмена в условиях нефропатии. XX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей; Фундаментальная наука и клиническая медицина

- человек и его здоровье; 22 апреля 2017, Санкт-Петербург; Санкт-Петербург: СПбГУ; 2017. с. 580.
186. Геруш И, Ференчук Е, Коляник И. Влияние глутатиона на изменение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов в условиях экспериментальной нефропатии. Материалы 72–й научно-практической конференции студентов-медиков и молодых ученых с международным участием; Актуальные проблемы современной медицины; Самарканд, 11-12 мая, 2018; 2018. с. 313.
187. Ferenchuk YeO, Gerush IV, Kolianyk IO, Bevzo VV, Dikal M. Effect of 3 days glutathione introduction on energy metabolism in the liver mitochondria of rats with nephropathy. Abstracts of the XI Parnas Conference – Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3–5 September 2018; Ukr.Biochem.J; 90; 2018. p. 97.
188. Giuffrè A, Vicente J. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018: 1-31.
189. Xia M, Chen L, Muh R, Li PL, Li N. Production and Actions of Hydrogen Sulfide, a Novel Gaseous Bioactive Substance, in the Kidneys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009; 329(3): 1056-62.
190. Han S, Kim J, Park J, Park K. Hydrogen sulfide accelerates the recovery of kidney tubules after renal ischemia/reperfusion injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2015; 30: 1497-1506.
191. Azizi F, Seifi B, Kadkhodae M, Ahghari P. Administration of hydrogen sulfide protects ischemia reperfusion-induced acute kidney injury by reducing the oxidative stress. *Irish Journal of Medical Science*. 2015; 185 (3): 649-54.
192. Streeter E, Ng HH, Hart JL. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Med Gas Res*. 2013; 3(1): 9.

193. Elsey D, Fowkes R, Baxter G. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S) *Cell Biochemistry and Function*. 2010; 28: 95-106.
194. Kimura Y, Goto YI, Kimura H. Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. *Antiox. Redox Signal*. 2010; 12(1): 1-13. doi:10.1089/ars.2008.22823
195. Ferencuk EO, Gerush IV. Effect of 7-day introduction of glutathione on activities of H₂S-producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. *Medical and Clinical Chemistry*. 2019; (1): 5-9. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v0.i1.9992
196. Ференчук Є, Геруш І. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфід у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. *Укр.біофарм.журнал*. 2018; 1 (58): 18-21. doi: <https://doi.org/10.24959/ubphj.19.200>
197. Tang D, Kang R, Berghe T, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 2019; 29: 347-64.
198. Gammage PA, Viscomi C, Simard M, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nat Med*. 2018; 24: 1691-5. doi: 10.1038/s41591-018-0165-9
199. El-Hattab AW, Zarante AM, Almannai M et al. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Mol Genet Metab* 2017; 122:1-9. doi:10.1016/j.ymgme.2017.09.009
200. Kotrys Szczesny. Mitochondrial Gene Expression and Beyond – Novel Aspects of Cellular Physiology. *Cells*. 2019; 9(1): 17. doi:10.3390/cells9010017
201. Cui J, Wang L, Ren X, Zhang Y, Zhang H. LRPPRC: A Multifunctional Protein Involved in Energy Metabolism and Human Disease. *Front. Physiol*. 2019; 10: 595.
202. Sharma P, Sampath H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells* 2019; 8: 100.

203. Murphy MP, Hartley RC. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17: 865-86.
204. Letts JA, Sazanov LA. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol.* 2017; 24: 800-8. doi: 10.1038/nsmb.3460
205. Wong HS, Dighe PA, Mezera V, Monternier PA, Brand MD. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J Biol Chem.* 2017; 292: 16804-9. doi: 10.1074/jbc.R117.789271

ДОДАТКИ
ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Ференчук ЄО. Вплив глутатіону на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Мед. і кл. хімія. 2018; 3: 27-32. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i3.9552 *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*
2. Ferenchuk YeO, Gerush IV. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.019> *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*
3. Gerush IV, Ferenchuk YeO. Hydrogen sulfide and mitochondria Biopolym. Cell. 2019; 35(1): 3-15. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000998> *(Дисертантка опрацювала сучасні літературні джерела, підготувала статтю до друку).*
4. Ferenchuk EO, Gerush IV. Effect of 7-day introduction of glutathione on activities of H₂S-producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. Medical and Clinical Chemistry. 2019; (1): 5-9. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v0.i1.9992 *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*
5. Ференчук Є, Геруш ІВ. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфїду у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. Укр.біофарм.журнал. 2018; 1 (58): 18-21. doi: <https://doi.org/10.24959/ubphj.19.200> *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*

6. Ferenchuk Ye, Gerush I, Grigorieva N. Effect of glutathione on oxidant-antioxidant system and the content of hydrogen sulphide in the blood by experimental nephropathy. *PharmacologyOnLine*. 2020 Apr 30; 1: 113-120. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*
7. Ференчук ЕА, Коляник ИО. Влияние трехкратного введения экзогенного глутатиона на активность ферментов энергетического обмена в условиях нефропатии. XX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей; Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье; 22 апреля 2017, Санкт-Петербург; Санкт-Петербург: СПбГУ; 2017. с. 580. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*
8. Gerush I, Ferenchuk Ye. Effects of 3 days glutathione introduction on the activities of antioxidant enzymes in the blood of rats with nephropathy. 8th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry; 18-20 September 2017, Poland; Lublin; 2017. p. 47. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*
9. Геруш И, Ференчук Е, Коляник И. Влияние глутатиона на изменение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов в условиях экспериментальной нефропатии. Материалы 72–й научно-практической конференции студентов-медиков и молодых ученых с международным участием; Актуальные проблемы современной медицины; Самарканд, 11-12 мая, 2018; 2018. с. 313. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*

10. Ferenchuk YeO, Gerush IV, Koliannyk IO, Bevzo VV, Dikal MV. Effect of 3 days glutathione introduction on energy metabolism in the liver mitochondria of rats with nephropathy. Abstracts of the XI Parnas Conference – Young Scientists Forum; Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine; Kyiv, 3–5 September 2018; Ukr.Biochem.J; 90; 2018. p. 97. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження, опрацювала літературні джерела, проаналізувала отримані результати, підготувала матеріали до друку).*
11. Ferenchuk Ye. Glutathione influence on biochemical indices of serum in experimental nephropathy. Матеріали 100-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвяченої 75-річчю БДМУ; Чернівці, 11, 13, 18 лютого 2019; Чернівці: Медуніверситет; 2019: с. 111.
12. Геруш ІВ, Григор'єва НП, Дікал МВ, Ференчук ЄО, Чернюх ОГ. Спосіб корекції біохімічних показників сироватки крові при експериментальній нефропатії у щурів. Пат. № 9668/ЗУ/20, Україна, МПК (2020.01) А61В 5/00 А61К 31/00 А61Р 13/00 G09В 23/28. № и 2019 11811; заявл. 11.12.2019; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження та проаналізувала отримані результати).*

ДОДАТОК Б
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. XX международная медико-биологическая конференция молодых исследователей. Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье (Санкт-Петербург, 22 апреля 2017 г.);

(Ференчук ЕА, Коляник ИО. Влияние трехкратного введения экзогенного глутатиона на активность ферментов энергетического обмена в условиях нефропатии).

Форма участі – заочна.

2. 8th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry (Lublin, Poland, 18-20 September 2017);

(Gerush I, Ferenchuk Ye. Effects of 3 days glutathione introduction on the activities of antioxidant enzymes in the blood of rats with nephropathy).

Форма участі – виступ на секційному засіданні.

3. 72-я научно-практическая конференция студентов-медиков и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины» (Самарканд, Узбекистан, 11-12 мая 2018 г.);

(Геруш И, Ференчук Е, Коляник И. Влияние глутатиона на изменение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов в условиях экспериментальной нефропатии).

Форма участі – заочна.

4. XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Kyiv, 3–5 September 2018);

(Ferenchuk YeO, Gerush IV, Kolianyk IO, Bevzo VV, Dikal MV. Effect of 3 days glutathione introduction on energy metabolism in the liver mitochondria of rats with nephropathy).

Форма участі – постерна доповідь на секційному засіданні.

5. 100-а підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», присвячена 75-річчю БДМУ (Чернівці, 11, 13, 18 лютого 2019 р.);

(Ferenchuk Ye. Glutathione influence on biochemical indices of serum in experimental nephropathy).

Форма участі – виступ на секційному засіданні.

Додаток В1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор

з науково-педагогічної роботи

ВДНЗ України "Буковинський державний медичний університет"

Геруш І. В.

« 27 » травня 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Стан енергетичного метаболізму та системи обміну гідроген сульфідом за умов експериментальної нефропатії і застосування глутатіону
2. **Установа-розробник, автор:** ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м. Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Ференчук Є.О.
3. **Джерела інформації:**
 - 3.1. Ференчук Є, Геруш ІВ. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфідом у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. Укр.біофарм.журнал. 2018; 1 (58): 18-21.
 - 3.2. Ferenchuk YeO, Gerush IV. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24.
 - 3.3. Gerush IV, Ferenchuk YeO. Hydrogen sulfide and mitochondria Biopolym. Cell. 2019; 35(1): 3-15.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет»
5. **Термін впровадження:** лютий-травень 2020 року.
6. **Форма впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає
8. **Обговорено і затверджено на засіданні кафедри** (протокол № 13 від 2020 року)

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри біоорганічної і біологічної хімії
та клінічної біохімії
к.біол.н., доц.

Григор`єва Н. П.

Додаток В2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор



Науково-педагогічної роботи
ВДНЗ України "Буковинський
державний медичний університет"
Геруш І. В.

травень 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Стан енергетичного метаболізму та системи обміну гідроген сульфідом за умов експериментальної нефропатії і застосування глутатіону

2. Установа-розробник, автор: ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м. Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Ференчук Є.О.

3. Джерела інформації:

3.1. Геруш ІВ, Григор'єва НІ, Ференчук ЄО. Вплив глутатіону на біохімічні показники сироватки крові при експериментальній нефропатії. Мед. і кл. хімія. 2018; 3: 27-32. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i3.9552

3.2. Ferenchuk YeO, Gerush IV. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24.

3.3. Ferenchuk EO, Gerush IV. Effect of 7-day introduction of glutathione on activities of H₂S-producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. Medical and Clinical Chemistry. 2019; (1): 5-9. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v0.i1.9992

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної фізіології ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет»

5. Термін впровадження: лютий-травень 2020 року.

6. Форма впровадження: у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять.

7. Зауваження та пропозиції: немає

8. Обговорено і затверджено на засіданні кафедри (протокол № 10 від 2020 року)

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри патологічної фізіології
д.мед.н., проф.

Роговий Ю. Є.

Додаток ВЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Івано-Франківського національного
медичного університету
д. біол. н., професор
_____ Ерстенюк А.М.
« _____ » _____ 2019 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Стан енергетичного метаболізму та системи обміну гідроген сульфїду за умов експериментальної нефропатії і застосування глутатіону

2. Установа-розробник, автор: ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м. Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Ференчук Є.О.

3. Джерела інформації:

3.1. Ференчук Є. О. Геруш І.В. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфїду у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. Укр. біофарм. журн. 2019; 1 (58): 18-22.

3.2. Ferenchuk Ye.O., Gerush I.V. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy. Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24.

3.3. Ferenchuk, E. O., Gerush, I. V. Effect of 7 days introduction of glutathione on activities of H₂S-producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. Medical and Clinical Chemistry, 2019;1: 5-9.

4. Базова установа, яка проводить впровадження:

5. Термін впровадження: лютий-травень 2020 року.

6. Форма впровадження: у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять.

7. Зауваження та пропозиції: немає

8. Обговорено і затверджено на засіданні кафедри (протокол №9 від 12.05.2020р.)

Відповідальний за впровадження:

В. о. завідувача кафедри біологічної та медичної хімії
імені академіка Г.О. Бабенка,
к.б.н., доцент

Максимчук Т.П.

Додаток В4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

з науково-педагогічної роботи

Львівського національного

медичного університету

імені Данила Галицького

проф.  М.Р. Гжегоцький

« » 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Стан енергетичного метаболізму та системи обміну гідроген сульфідом за умов експериментальної нефропатії і застосування глутатіону

2. Установа-розробник, автор: ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м. Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Ференчук Є.О.

3. Джерела інформації:

3.1. Геруш І.В., Григор'єва Н. П., Ференчук Є. О. Вплив глутатіону на біохімічні показники крові при експериментальній нефропатії. Медична та клінічна хімія. 2018; 20 (3): 27-32.

3.2. Ferenchuk Ye.O., Gerush I.V. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy. Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24.

3.3. Gerush I.V., Ferenchuk Ye.O. Hydrogen sulfide and mitochondria. Biopolym. Cell. 2019; 35 (1): 3-15.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

5. Термін впровадження: вересень - листопад 2019 року.

6. Форма впровадження: у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять.

7. Зауваження та пропозиції: немає

8. Обговорено і затверджено на засіданні кафедри (протокол №6 від 26.11.2019 року)

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біологічної хімії,
д.мед.н., проф.



О.Я. Склярів

Додаток В5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

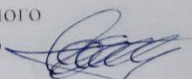
Проректор
з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
проф. І. КЛИЦ

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Стан енергетичного метаболізму та системи обміну гідроген сульфідом за умов експериментальної нефропатії і застосування глутатіону
2. **Установа-розробник, автор:** ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії (58001, м. Чернівці, вул. Богомольця, 2), аспірант Ференчук С.О.
3. **Джерела інформації:**
 - 3.1. 3.2. Ferenchuk Ye.O., Gerush I.V. Glutathione influence on energy metabolism in rat liver mitochondria under experimental nephropathy. Ukr.Biochem.J. 2019; 91 (3): 19-24.
 - 3.2. Ferenchuk, E.O., Gerush, I.V. Effect of 7 days introduction of glutathione on activities of H₂S producing enzymes in the liver of rats under experimental nephropathy conditions. Medical and Clinical Chemistry, 2019;1: 5-9.
 - 3.3. Ференчук С. О. Геруш І.В. Вплив триденного введення глутатіону на метаболізм гідроген сульфідом у печінці щурів за умов експериментальної нефропатії. Укр. біофарм. журн. 2019; 1 (58): 18-22.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України
5. **Термін впровадження:** лютий-травень 2020 року.
6. **Форма впровадження:** у науково-навчальний процес кафедри медичної біохімії
7. **Зауваження та пропозиції:** немає
8. **Обговорено і затверджено на засіданні кафедри (протокол № 7 від 08 вересня 2020 року)**

Відповідальний за впровадження:
д.б.н., професор кафедри медичної біохімії
Тернопільського національного медичного
університету імені І. Я. Горбачевського

 Петро ЛИХАЦЬКИЙ