

DOI: 10.26693/jmbs06.05.063

УДК 612.015.34:616-008.9-099-06:616.61:615.275

Бевзо В. В.

РІВЕНЬ ЕНДОГЕННІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

Метою роботи було дослідити вміст речовин низької й середньої молекулярної маси, загальних і тирозинвмісних пептидів та оцінити рівень ендогенної інтоксикації організму щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону.

Матеріал та методи. Нефропатію моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення фолієвої кислоти у дозі 250 мг/кг. Глутатіон вводили інтрагастрально (100 мг/кг) впродовж 7 днів після інтоксикації фолієвою кислотою.

Результати. В умовах нефропатії в сироватці крові щурів збільшення рівня молекул середньої маси збільшувалось в 2 рази, низькомолекулярних речовин – в 1,6 рази порівняно з контролем.

Щоденне введення глутатіону тваринам з експериментальною нефропатією протягом 7 днів призводило до зниження рівня речовин середньої та низької молекулярної маси на 21 % і 27 % порівняно з показниками тварин із нефропатією, однак все ще достовірно відрізнявся від показників контролю.

На фоні зростання вмісту загальних олігопептидів в 2,2 рази в сироватці крові щурів з нефропатією збільшувався рівень тирозинвмісних пептидів в 1,8 рази у порівнянні з контролем. Введення глутатіону щурам з нефропатією привело до зниження цих параметрів на 40 і 35 % відповідно порівняно з контролем.

В результаті встановлених змін рівня альбумінів та молекул середньої маси в сироватці крові тварин в умовах нефропатії підвищення коефіцієнту ендогенної інтоксикації спостерігалось в 2,3 рази. Цей дисбаланс вказує на порушення процесів детоксикації ендогенних метаболітів в печінці тварин в умовах нефропатії.

У групах тварин з нефропатією, яким вводили антиоксидант, коефіцієнт ендогенної інтоксикації знижувався на 41 % у порівнянні з тваринами, що

не отримували глутатіон, але до рівня контрольних значень цей показник не повертався.

Висновки. За умов експериментальної нефропатії в сироватці крові щурів спостерігали підвищення вмісту загальних і тирозинвмісних пептидів, речовин низької й середньої молекулярної маси, а також зростання значень коефіцієнту інтоксикації, що опосередковано вказує на порушення процесів детоксикації ендогенних метаболітів у печінці дослідних тварин при патології нирок.

В групі тварин з нефропатією, які отримували відновлений глутатіон впродовж 7 днів, відмічали лише тенденцію до нормалізації досліджуваних показників, що характеризують рівень ендогенної інтоксикації за умов експериментальної нефропатії.

Ключові слова: нефропатія, ендогенна інтоксикація, відновлений глутатіон, щури.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом НДР «Стрес-індуковані морфофункціональні та біохімічні зміни хроноперіодичної та гепаторенальної систем у ссавців», № державної реєстрації 0114U002472.

Вступ. Захворювання нирок – одна з найпоширеніших та найактуальніших проблем сучасної медицини. Основою патогенезу ниркової патології є розвиток оксидативного стресу, що супроводжується оксидантно-антиоксидантним дисбалансом, і як наслідок – ураження печінки – головного детоксикаційного органу [1]. Процес розвитку нефропатії характеризується метаболічними порушеннями і токсичним ураженням організму, що призводить до синдрому ендогенної інтоксикації. Протягом багатьох десятиліть для оцінки функції нирок та рівня ендогенної інтоксикації використовували визначення креатиніну та сечовини в сироватці крові. Однак, ці показники недостатньо чутливі при швидко наростаючих змінах ниркових функцій та можуть бути пов'язані з екстраренальними причинами.

Останніми роками широко дискутується питання пошуку нових маркерів ушкодження нирок та оцінки рівня ендогенної інтоксикації організму. Серед широкого кола метаболітів, які володіють здатністю виявляти токсичну дію на організм, заслуговують на увагу середньомолекулярні продукти протеолізу або молекули середньої маси (не вище 5000 Д). Розвиток ендогенної інтоксикації в організмі при різних патологічних станах – це результат дисбалансу між надходженням токсинів у кров та їх детоксикацією. Вважають [2], що саме молекули середньої маси є універсальним біохімічним маркером та відображають рівень патологічного білкового метаболізму, що корелює з основними лабораторними критеріями метаболічних порушень.

Швидкість прогресування ниркової патології обґрунтовує пошук антиоксидантів із нефропротекторною дією. Незважаючи на великий арсенал лікарських засобів, що використовуються для терапії захворювань нирок різної етіології, пошук нових нефропротекторів, що поєднують високу активність та низьку токсичність не втрачає актуальності.

Захист від окиснювальних стресів в організмі здійснюють різні антиоксиданти, одними з яких є відновлений глутатіон. Відомо [3, 4, 5], що найінтенсивніше епітеліальні клітини, в тому числі епітелій проксимальних ниркових каналців, захоплюють та використовують циркулюючий глутатіон, що дає підґрунтя для дослідження його ролі при розвитку нефропатії. Глутатіон присутній в клітинах в основному у відновленій формі й відіграє вагомий роль у клітинному обміні, бере участь у підтримці окиснювально-відновного потенціалу, процесах детоксикації ксенобіотиків ендо- та екзогенного походження як безпосередньо, так як субстрат для ферментів біотрансформації. Нестача відновленого глутатіону сприяє ризику виникнення окиснювального пошкодження клітин та появи патологічних станів.

Метою роботи було дослідити вміст речовин низької й середньої молекулярної маси (МСМ), загальних і тирозинвмісних пептидів та оцінити рівень ендогенної інтоксикації організму щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону.

Матеріал та методи дослідження. Експеримент проводили на нелінійних білих щурах масою 160-180 г. Тварини перебували в умовах віварію зі сталим температурним режимом (18–22°C), відносній вологості повітря (50–55%) в окремих обмінних клітках у сформованих групах, на постійному збалансованому режимі харчування з вільним доступом до води та їжі. Всі дослідження виконано з дотриманням нормативів Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються для

наукової мети, ухвалених І національним конгресом України з біоетики.

Нефропатію моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення фолієвої кислоти в дозі 250 мг/кг маси тіла [6]. Відновлений глутатіон вводили щоденно інтрагастрально впродовж 7 днів у дозі 100 мг/кг маси тіла після моделювання нефропатії. Для досліджень використовували сироватку крові тварин, яку отримували шляхом центрифугування цільної крові без антикоагулянта при 1500 об/хв протягом 15 хв.

Для оцінки рівня ендогенної інтоксикації за умов експериментальної нефропатії в сироватці крові дослідних та інтактних щурів визначали вміст речовин низької (МНМ) й середньої молекулярної маси (МСМ) за методом Н.І. Габриелян, [7], загальних і тирозинвмісних пептидів за методом В.Б. Гаврилова [8], альбуміну за загальноприйнятою методикою [9], коефіцієнт ендогенної інтоксикації розраховували за методом В.Б. Гаврилова [10].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням непараметричного критерію Вілкоксона. Достовірними вважали відмінності при $p \leq 0,01$.

Результати дослідження та їх обговорення.

За умов експериментальної нефропатії в сироватці крові щурів спостерігали збільшення рівня МСМ (2000-5000 Д), які визначалися при довжині хвилі 280 нм. При цьому рівень МСМ в сироватці крові дослідних тварин перевищував контрольні значення в 2 рази. Для низькомолекулярних речовин (до 2000 Д) сироватки крові щурів, що визначалися при довжині хвилі 254 нм, реєстрували вірогідні зміни даного показника на 7 добу експерименту, які перевищували контрольні значення на 60 % (**таблиця**).

Припускають [11], що значне підвищення вмісту МСМ у сироватці крові за умов експериментальної нефропатії є прогностично несприятливим показником, так як продукти деградації біополімерів можуть чинити виражений нефротоксичний вплив. МСМ порушують фізико-хімічні властивості клітинних мембран і роблять їх більш доступними для різного роду пошкоджуючих впливів, включаючи процеси вільно-радикального окиснення ліпідів.

Щоденне введення відновленого глутатіону тваринам з експериментальною нефропатією протягом 7 днів призводило до зниження рівня МСМ (280 нм) та низькомолекулярних речовин (254 нм) на 21 % і 27 % порівняно з показниками тварин із нефропатією, однак все ще достовірно відрізнявся від показників контролю (**таблиця**).

Крім речовин низької й середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів за умов експериментальної нефропатії визначали вміст загальних і тирозинвмісних пептидів при довжині хвилі 290 нм

і лужному рН 13,0, які мають більшу діагностичну чутливість, специфічність і точність при порушенні метаболізму білків. Встановлено, що на фоні зростання вмісту загальних олігопептидів в 2,2 рази в сироватці крові щурів з нефропатією збільшувався рівень тирозинвмісних пептидів в 1,8 рази у порівнянні з інтактними тваринами (таблиця).

7-ми денне введення відновленого глутатіону щурам з нефропатією мало позитивний вплив на досліджувані показники, рівень яких знизився на 40 і 35 % відповідно порівняно з експериментальним контролем. Разом з тим залишалася вірогідна різниця вмісту загальних і тирозинвмісних пептидів у порівнянні з інтактними тваринами (таблиця).

Для оцінки рівня ендogenous інтоксикації розраховували коефіцієнт, що відображає дисбаланс між накопиченням і детоксикацією токсинів в крові на основі відношення двох показників МСМ (D_{254}) і концентрації альбумінів ($D_{254}/\text{Альбумін}$) в сироватці крові. Дослідження показали, що вірогідні зміни фракції альбумінів в сироватці крові тварин з нефропатією були менше контрольних значень на 30 % (таблиця).

Як наслідок встановлених змін рівня альбумінів та молекул середньої маси в сироватці крові тварин, за умов експериментальної нефропатії, спостерігали підвищення коефіцієнту ендogenous інтоксикації, так як дисбаланс між накопиченням токсичних продуктів і здатністю альбумінів до їх зв'язування збільшувався в 2,3 рази (таблиця). Такий дисбаланс є прогностично несприятливим показником, що вказує на посилення метаболічних порушень, насамперед процесів детоксикації ендogenous метаболітів у клітинах печінки тварин за умов експериментальної нефропатії [12].

У групах тварин з нефропатією, яким протягом 7 днів вводили антиоксидант, рівень альбумінів в сироватці крові зростав на 24 % порівняно з показниками тварин із нефропатією, що мало позитивний вплив і на коефіцієнт ендogenous інтоксикації, який знижувався на 41 % у порівнянні з тваринами, що не отримували відновлений глутатіон, але до рівня контрольних значень цей показник не повертався (таблиця).

Таким чином, враховуючи ендogenous походження загальних і тирозинвмісних пептидів в крові, підвищений рівень речовин низької й середньої молекулярної маси, а також зростання значень

Таблиця – Показники рівня ендogenous інтоксикації організму щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону

Показники	Контроль, n=10	Нефропатія, 7 день, n=10	Нефропатія + глутатіон, 7 день, n=10
Вміст МСМ (λ 280 нм), ум.од/мл	0,142 ± 0,009	0,282 ± 0,025 ^a	0,223 ± 0,011 ^{a,b}
Вміст МНМ (λ 254 нм), ум.од/мл	0,110 ± 0,001	0,176 ± 0,012 ^a	0,129 ± 0,009 ^{a,b}
Вміст загальних ліпідів, ум.од/мл	2,82 ± 0,16	6,21 ± 0,35 ^a	3,72 ± 0,14 ^{a,b}
Вміст тирозинвмісних пептидів, ммоль/л	1,33 ± 0,07	2,34 ± 0,12 ^a	1,52 ± 0,08 ^{a,b}
Вміст альбуміну, г/л	37,4 ± 2,61	26,2 ± 1,57 ^a	32,5 ± 1,98 ^{a,b}
Коефіцієнт ендogenous інтоксикації	2,94 ± 0,16	6,72 ± 0,39 ^a	3,97 ± 0,21 ^{a,b}

Примітки: Результати представлені як $M \pm SEM$. a – достовірність різниці порівняно з контролем; b – достовірність різниці порівняно з групою тварин із нефропатією, n – кількість тварин у групі, $p < 0,01$.

коефіцієнту інтоксикації можна припустити, що за умов експериментальної нефропатії відбуваються деструктивні зміни в організмі тварин, які обумовлені, можливо, як протеолізом білків, так і зниженням метаболічних процесів в гепатоцитах, і насамперед, процесів детоксикації, що негативно впливає на структурно-функціональний стан печінки та свідчить на розвиток ендogenous інтоксикації організму при захворюваннях нирок.

Відновлений глутатіон володіє здатністю безпосередньо знешкоджувати токсичні сполуки й активувати антиоксидантні ензими та захищати клітинні мембрани від окиснювального пошкодження [13], але за даної схеми введення, його вплив був недостатньо ефективним на досліджувані показники, що характеризують рівень ендogenous інтоксикації у щурів за умов експериментальної нефропатії.

Висновки. За умов експериментальної нефропатії в сироватці крові щурів спостерігали підвищення вмісту загальних і тирозинвмісних пептидів, речовин низької й середньої молекулярної маси, а також зростання значень коефіцієнту інтоксикації, що опосередковано вказує на порушення процесів детоксикації ендogenous метаболітів у печінці дослідних тварин при патології нирок.

В групі тварин з нефропатією, що отримували відновлений глутатіон впродовж 7 днів, відмічали лише тенденцію до нормалізації досліджуваних показників, які характеризують рівень ендogenous інтоксикації за умов експериментальної нефропатії.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно дослідити механізми антиоксидантного захисту за умов нефропатії та розвитку ендogenous інтоксикації викликані фолієвою кислотою та застосування відновленого глутатіону.

References

1. Gozhenko AI. Patogenez toksicheskikh nefropatij [Pathogenesis of toxic neuropathies]. *Akt Probl Transp Med.* 2006; 4(2): 9-15. [Russian]
2. Gromashevskaya LL. Srednie molekuly kak odin iz pokazateley metabolicheskoy intoksikatsii v organizme [Medium molecules as one of the indicators of metabolic intoxication in the body]. *Klin Lab Diagnost.* 2007; 1: 11-16. [Russian]
3. Dominko K, Đikić D. Glutathionylation: a regulatory role of glutathione in physiological processes. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2018; 69(1): 1-24. PMID: 29604197. doi: 10.2478/aiht-2018-69-2966
4. Allen J, Bradley RD. Effects of Oral Glutathione Supplementation on Systemic Oxidative Stress Biomarkers in Human Volunteers. *J Altern Complement Med.* 2011; 17(9): 827-833. PMID: 21875351. PMCID: PMC3162377. doi: 10.1089/acm.2010.0716
5. Hong YA. Catalytic antioxidants in the kidney. *Antioxidants.* 2021; 10: 130-140. PMID: 33477607. PMCID: PMC7831323. doi: 10.3390/antiox10010130
6. Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri S. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Exp Toxicol Patholog.* 2012; 64(3): 225-232. PMID: 20833517. doi: 10.1016/j.etp.2010.08.010
7. Gabrielyan NI, Lipatova VI. Opyt ispolzovaniya pokazatelja srednich molekul v krovi dlja diagnostiki nephrologicheskikh zabolevanij u detej [Experience of using the indicator of average molecules in the blood for the diagnosis of nephrological diseases in children]. *Lab Delo.* 1984; 3: 138-140. [Russian]
8. Gavrilov VB, Lobko NF, Konev SV. Opreddenije tirozin- i triptohpansoderhgashich peptidov v plazme krovi po poglohscheniju v UHP-oblasti spectra [Determination of tyrosine and tryptophan-containing peptides in blood plasma by absorption in the UV spectrum range]. *Klin Lab Diagnost.* 2004; 3: 12-16. [Russian]
9. Roitberg GE, Strutynskyy AV. *Laboratorna ta instrumentalna diagnostyka zachvorjuvan vnutrishnih organiv* [Laboratorium diagnostica instrumentorum morborum viscerum internorum]. K: Binom; 1999. [Ukrainian]
10. Gavrilov VB, Bidula MM, Furmanchuk DA. Ocenka intoksikatsiji organizma po narusheniju balansa mezhdru nakoplenijem i svjazyvanijem toksinov v plazme krovi [Assessment of the body intoxication by the imbalance between the accumulation and binding of toxins in the blood plasma]. *Klin Lab Diagnost.* 1999; 2:13-17. [Russian]
11. Hoste EJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2018; 14(10): 607-625. PMID: 30135570. doi: 10.1038/s41581-018-0052-0
12. Ferenchuk EO, Gerush IV. Effect of three-day Glutathione introduction on hydrogen sulfide metabolism in liver of rats under experimental nephropathy conditions. *Ukr Biopharmaceut J.* 2019; 1(58): 18-21. doi: 10.24959/ubphj.19.200
13. Irazabal MV, Torres VE. Reactive oxygen species and redox signaling in chronic kidney disease. *Cells.* 2020; 9(6): 1342-1352. PMID: 32481548. PMCID: PMC7349188. doi: 10.3390/cells9061342

УДК 612.015.34: 616-008.9-099-06: 616.61: 615.275

**УРОВЕНЬ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ КРЫС
В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕФРОПАТИИ
И ПРИМЕНЕНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА**

Бевзо В. В.

Резюме. Целью работы было исследовать содержание веществ низкой и средней молекулярной массы, общих и тирозинсодержащих пептидов и оценить уровень эндогенной интоксикации организма крыс в условиях экспериментальной нефропатии и применения восстановленного глутатиона.

Материал и методы. Нефропатию моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения фолиевой кислоты в дозе 250 мг/кг. Глутатион вводили внутривенно (100 мг/кг) в течение 7 дней после интоксикации фолиевой кислотой.

Результаты. В условиях нефропатии в сыворотке крови крыс увеличение уровня молекул средней массы наблюдалось в 2 раза, низкомолекулярных веществ - в 1,6 раза по сравнению с контролем.

Ежедневное введение глутатиона к животным с экспериментальной нефропатией в течение 7 дней привело к снижению уровня веществ средней и низкой молекулярной массы на 21% и 27% по сравнению с показателями животных с нефропатией, но значительно отличаются от контроля.

На фоне увеличения содержания общих олигопептидов на 2,2 раза в сыворотке крови экспериментальных крыс с нефропатией уровень тирозинсодержащих пептидов увеличился в 1,8 раза по сравнению с контролем. Введение глутатиона крысам с нефропатией привело к снижению этих параметров на 40 и 35% соответственно, по сравнению с контролем.

В результате установленных изменений уровня альбумина и средних весовых молекул в сыворотке крови животных в условиях нефропатии увеличение коэффициента эндогенной интоксикации наблюдалось в 2,3 раза. Этот дисбаланс указывает на нарушение процессов детоксикации эндогенных метаболитов в печени животных в условиях нефропатии.

В группах животных с нефропатией, которым вводили антиоксидант, коэффициент эндогенной интоксикации снизился на 41% по сравнению с животными, которые не получали глутатион, но к уровню контрольных значений этот показатель не вернулся.

Выводы. В условиях экспериментальной нефропатии в сыворотке крови крыс наблюдалось повышение содержания общих и тирозинсодержащих пептидов, веществ низкой и средней молекулярной массы, а также рост значений коэффициента интоксикации, что косвенно указывает на нарушение процессов детоксикации эндогенных метаболитов в печени экспериментальных животных при патологии почек.

В группе животных с нефропатией, которые получали восстановленный глутатион в течение 7 дней, отмечали лишь тенденцию к нормализации исследуемых показателей, характеризующих уровень эндогенной интоксикации в условиях экспериментальной нефропатии.

Ключевые слова: нефропатия, эндогенная интоксикация, восстановленный глутатион, крысы.

UDC 612.015.34: 616-008.9-099-06: 616.61: 615.275

Rat Endogenous Intoxication Level under Experimental Nephropathy and Reduced Glutathione Application

Bevzo V. V.

Abstract. *The purpose of the study, therefore, was to investigate the content of substances of low and medium molecular weight, total and tyrosine-containing peptides and to assess the level of endogenous intoxication of the rat organism under conditions of experimental nephropathy and the use of reduced glutathione.*

Materials and methods. The experiment was performed on nonlinear white rats weighing 160-180 g. The animals were in a vivarium with a constant temperature (18-22°C), relative humidity (50-55%) in individual exchange cells in the formed groups, on a constant balanced mode of a diet with free access to water and food.

Nephropathy was modeled by a single intraperitoneal injection of folic acid at a dose of 250 mg/kg. Glutathione was administered intragastrically (100 mg/kg) for 7 days after folic acid intoxication.

Results and discussion. Under conditions of nephropathy in the blood serum of rats, an increase in the level of molecules of average weight was observed by 2 times, as well as low-molecular substances by 1.6 times compared with the control.

Daily administration of reduced glutathione to animals with nephropathy for 7 days led to a decrease in the level of substances of medium and low molecular weight by 21% and 27% in comparison with the indicators of animals with nephropathy, but still significantly differed from the control indicators.

Against the background of an increase in the content of total oligopeptides by 2.2 times in the blood serum of experimental rats, the level of tyrosine-containing peptides increased by 1.8 times in comparison with the control. The introduction of glutathione to rats with nephropathy led to a decrease in these parameters by 40 and 35%, respectively, compared with the experimental control.

As a result of the established changes in the level of albumin and average weight molecules in the blood serum of animals, under conditions of nephropathy, an increase in the coefficient of endogenous intoxication was observed by 2.3 times. This imbalance indicates a violation of the processes of detoxification of endogenous metabolites in the liver of animals under conditions of nephropathy.

In the groups of animals with nephropathy, which were injected with an antioxidant, the coefficient of endogenous intoxication decreased by 41% compared with animals that did not receive glutathione, but this indicator did not return to the level of control values.

Conclusion. Thus, under the conditions of experimental nephropathy in the blood serum of rats, an increase in the content of total and tyrosine-containing peptides, substances of low and medium molecular weight, as well as an increase in the values of the intoxication coefficient was observed, which indirectly indicates a violation of the processes of detoxification of endogenous metabolites in the liver of experimental animals with kidney pathology.

In the group of animals with nephropathy that received reduced glutathione for 7 days, only a tendency towards normalization of the studied parameters characterizing the level of endogenous intoxication under conditions of nephropathy was noted.

Keywords: nephropathy, endogenous intoxication, reduced glutathione, rats.

ORCID and contributionship:

Valentyna V. Bevzo : 0000-0002-8764-652X ^{A-F}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Valentyna V. Bevzo

Bukovinian State Medical University,
Department of Bioorganic and Biological Chemistry and Clinical Biochemistry
1, Celana St., apt. 9, Chernivtsi 58001, Ukraine
tel: +380953393471, e-mail: bevzo61@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 01.09.2021 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування