

ПЕПТИДЫ ВОССТАНАВЛИВАЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК ПРИ ЦИСПЛАТИНОВОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

И.И.Заморский, Т.С.Щудрова, Н.С.Линькова^{**,***}, Т.Е.Ничик^{***}, В.Х.Хавинсон^{*,**}

*Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина; *Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, РФ; **ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург, РФ; ***Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ*

Изучено влияние полипептидного комплекса почек и коротких пептидов AED, EDL и AEDG на функции почек при цисплатиновой острой почечной недостаточности у крыс. Пептид AED снижал экскрецию белка и концентрацию электролитов в моче. Полипептидный комплекс почек и пептиды EDL и AEDG нормализовывали диурез, концентрацию креатинина в моче и его экскрецию, скорость клубочковой фильтрации, абсолютную реабсорбцию ионов натрия, снижали концентрацию белка в моче и его экскрецию, концентрацию ионов натрия и калия в моче и другие показатели. При этом наиболее выраженным нефропротективным эффектом обладал пептид EDL. Поскольку известно, что полипептидный комплекс почек и короткие пептиды восстанавливают экспрессию сигнальных молекул — маркеров функционального состояния почек, эти пептидные вещества могут оказывать нефропротективный эффект при различной почечной патологии.

Ключевые слова: острая почечная недостаточность, цисплатин, пептиды

Патология почек находится на 11-м месте среди причин снижения качества жизни и повышения смертности у людей разного возраста. При этом у 40% пациентов острая почечная недостаточность (ОПН) развивается в пожилом и старческом возрасте [4]. Причиной развития ОПН в 20-30% случаев является действие химических агентов, причем 18-27% случаев приходится на побочное действие фармакотерапии [5,11]. Цисплатин представляет собой один из антинеопластических препаратов, побочным эффектом которого является нефротоксичность. У 20-30% пациентов после терапии цисплатином развивается ОПН [11,12]. В эпителиальных клетках S3-сегмента проксимальных канальцев почек цисплатин расщепляется до нефротоксических метаболитов, а его концентрация в моче в 5 раз превышает этот показатель

в плазме крови. Противоопухолевый и токсический эффекты цисплатина обеспечиваются поражением митохондриальной и в меньшей степени ядерной ДНК, что объясняет высокую чувствительность проксимальных канальцев почек, где плотность митохондрий максимальная [11,12]. Цисплатин вызывает нарушение функции митохондрий, что приводит к снижению активности АТФаз, угнетению транспортных систем, изменению концентрации катионов в клетках, генерации АФК и прогрессирующему дефициту АТФ. Прямое и вторичное поражение канальцев почек является причиной снижения тубулярной функции и потери электролитов. Механизмы нефротоксичности цисплатина включают в себя развитие оксидативного стресса, воспаления, фиброгенеза, активацию некроза высокими дозами или индукцию митохондриально опосредованного апоптоза клеток канальцев почек меньшими дозами препарата [11-14].

Адрес для корреспонденции: tshchudrova@gmail.com. Щудрова Т.С., linkova@gerontology.ru. Линькова Н.С.

Для решения одной из задач нефрологии и геронтологии, поиска новых более эффективных и безопасных методов лечения ОПН у людей пожилого и старческого возраста в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии разработаны пептидные биорегуляторы, обладающие протективными свойствами в отношении ткани почек [2,9]. Полипептидный комплекс почек (ПКП) показал свою эффективность в модели экспериментального нефролитиаза у животных, где наблюдалось снижение концентрации оксидантных ионов в моче, количества кальциевых отложений в ткани почек и интенсивности процессов свободнорадикального окисления, а также у пациентов с почечной патологией [2]. ПКП и пептиды AED и EDL стимулировали рост органотипических культур клеток почек молодых и старых животных. В первичных диссоциированных культурах клеток почек при их старении ПКП и пептиды AED и EDL регулировали экспрессию маркеров клеточного обновления (Ki-67, p53), ремоделирования межклеточного матрикса (MMP-14) и синтез ИЛ-8 [7]. По результатам недавно проведенных экспериментов, ПКП и пептиды AED и EDL активируют рост клеток, снижая экспрессию маркеров старения p16, p21, p53 и повышая экспрессию белка SIRT-6, снижение синтеза которого является одним из признаков старения в культурах клеток почки [4,7]. На основании полученных теоретических и экспериментальных данных были предложены молекулярные модели взаимодействия пептидов AED и EDL с различными участками ДНК. Предполагается, что оба пептида образуют наиболее энергетически выгодные комплексы с последовательностью d(ATATATATAT)₂ в малой бороздке ДНК. Показано, что связывание пептидов AED и EDL с этой последовательностью может влиять на экспрессию генов белков — маркеров старения клеток почек [4,7,9]. Однако нефропротективное действие коротких пептидов AED и EDL в экспериментальных моделях ОПН до сих пор не изучено. Пептид AEDG, имеющий структурное сходство с AED, обладает антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и регуляторными свойствами, что делает его потенциальным средством для влияния на основные механизмы поражения почек. Кроме того, пептид AEDG стимулирует выработку мелатонина, который является нефропротектором [10]. Ранее установлена нефропротективная активность пептида AEDG при рабдомиолитической ОПН [15].

Целью данного исследования являлось изучение влияния ПКП и пептидов AED, EDL и AEDG на состояние экскреторной и ионорегулирующей

функций почек в условиях развития цисплатиновой ОПН.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 3-месячных нелинейных белых крысах ($n=42$) массой 120-200 г, которые находились в стандартных условиях вивария при постоянной температуре и влажности, свободном доступе к воде и пище (комбикорм полнорационный для лабораторных животных (ООО «Кормотех»). Животные были распределены на 6 равных групп методом стратификационной рандомизации: 1-я группа — интактные крысы, которых выводили из эксперимента одновременно с опытными для определения контрольных показателей; 2-я группа — крысы с цисплатиновой ОПН; 3-я группа — животные с цисплатиновой ОПН, которым вводили ПКП в дозе 300 мкг/кг; 4-я группа — пептид EDL в дозе 3 мкг/кг; 5-я группа — пептид AED в дозе 3 мкг/кг; 6-я группа — пептид AEDG в дозе 7 мкг/кг.

В соответствии с общепринятыми методами моделирования поражения почек для фармакологических исследований [8,13] экспериментальную модель цисплатиновой ОПН у крыс вызывали путем однократного внутривентрального введения цисплатина («EBEWE Pharma») в дозе 6 мг/кг за 72 ч до выведения животных из эксперимента. Пептиды животным 3-6-й групп вводили внутривентрально в течение 4 сут до и 3 сут после введения цисплатина 1 раз в день в утренние часы. Дозы пептидов определяли путем пересчета рекомендованных для человека доз на единицу массы тела животных с учетом коэффициента видовой специфичности. Растворы пептидов готовили непосредственно перед началом серии экспериментов путем растворения в необходимом количестве воды для инъекций.

Для оценки функционального состояния почек через 72 ч после введения цисплатина в условиях индуцированного водного диуреза (энтеральное введение внутривентрально зондом подогретой до 37°C питьевой воды в объеме 5% от массы тела) на протяжении 2 ч собирали мочу. Животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

Экскреторную функцию почек оценивали по показателям диуреза, скорости клубочковой фильтрации (СКФ), концентрации креатинина в плазме крови и моче, концентрации и экскреции белка с мочой. Концентрацию креатинина в плазме

определяли по методу Поппера в модификации Мерзона, в моче — по методу Фолина. Содержание белка в моче определяли сульфосалициловым методом [3]. Ионорегулирующую функцию почек оценивали по показателям концентрации и экскреции натрия с мочой, реабсорбции, показателям проксимального, дистального транспорта и клиренса ионов натрия, концентрации и экскреции калия с мочой [6]. Концентрацию ионов калия и натрия в плазме крови и моче определяли методом пламенной фотометрии на “ФПЛ-1” [3]. Стандартизацию показателей функции почек проводили пересчетом их абсолютных величин на единицу массы тела или объема клубочкового фильтрата.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе “SPSS Statistics 17.0”. Характер распределения определяли по критерию Колмогорова—Смирнова. Оценку различий между выборками проводили с использованием параметрического t критерия Стьюдента (при нормальном распределении переменных), непараметрического U критерия Манна—Уитни (при отсутствии согласия данных с нормальным распределением). Критический уровень значимости был принят за $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Развитие цисплатиновой ОПН сопровождалось значительными изменениями функционального состояния почек крыс. Первичное токсическое поражение проксимальных канальцев почек привело к угнетению транспортных систем клеток, в результате чего нарушились процессы реабсорбции ионов натрия и калия в проксимальных и дистальных канальцах, что сопровождалось увеличением экскреции этих ионов (таблица). Концентрация ионов натрия в моче увеличилась в 4.6 раза, экскреция — в 3.5 раза. При этом абсолютная реабсорбция ионов натрия снизилась в 2.6 раза, что объясняется ухудшением проксимального транспорта в 2.4 раза, дистального — в 3.2 раза. Как известно, повышенное поступление NaCl к *macula densa* приводит к повышению сосудистого сопротивления по механизму тубуло-гломерулярной обратной связи и приводит к снижению почечного кровотока с последующим снижением СКФ [1]. Этот эффект был выявлен у животных 2-й группы: наблюдалось снижение диуреза в 2.6 раза с развитием олигурической стадии ОПН, СКФ — в 2.2 раза, экскреция креатинина снизилась в 1.5 раза, что сопровождалось соответствующим увеличением концентрации креатинина в плазме крови и указывало на развитие ретенционной азотемии. У животных с

ОПН наблюдалась выраженная протеинурия с увеличением концентрации белка в моче в 4.5 раза, а также показателя его экскреции в 4 раза. Развитие ОПН сопровождалось увеличением экскреции ионов калия в 5.3 раза, что, по-видимому, связано с усилением влияния альдостерона на клетки собирательных трубочек вследствие активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [1]. При этом наблюдалось снижение в 1.3 раза концентрации ионов калия в плазме крови, что указывает на развитие гипокалиемии, являющейся характерным побочным эффектом при терапии цисплатином [11,12,14].

Применение исследуемых пептидных биорегуляторов у животных с ОПН привело к улучшению функционального состояния почек. При введении ПКП у животных с ОПН диурез увеличился в 1.7 раза, пептида EDL — в 2 раза, пептида AEDG — в 1.9 раза, что объясняется соответствующим возрастанием СКФ и позволяет говорить о предупреждении развития олигурии и, соответственно, более благоприятном прогнозе по сравнению с нелечеными животными. Экскреция креатинина достоверно увеличивалась при введении ПКП в 1.3 раза, EDL — в 1.7 раза, AEDG — в 1.6 раза по сравнению с группой ОПН, что привело к уменьшению выраженности гиперазотемии. Все изученные пептиды снижали концентрацию белка в моче: ПКП — в 2.4 раза, EDL — в 1.9 раза, AED — в 2 раза и AEDG — в 1.9 раза. Кроме того, пептиды снижали экскрецию белка: ПКП — в 2.8 раза, EDL — в 2.6 раза, AED — в 2.5 раза и AEDG — в 1.9 раза. Экскреция ионов натрия с мочой также снижалась под влиянием пептидов: в 3.7 раза (ПКП), в 4.3 раза (EDL), в 2.1 раза (AEDG) по сравнению с группой ОПН. Ограниченные потери ионов с мочой объясняется защитным действием пептидов по отношению к клеткам канальцев, что подтверждается улучшением процессов реабсорбции ионов натрия при введении ПКП в 1.7 раза, EDL — в 2.2 раза, AEDG — в 1.9 раза. При этом введение ПКП достоверно увеличивало показатели как проксимального, так и дистального транспорта ионов натрия в 1.7 раза, применение AEDG — в 1.9 раза, что указывает на сохранение механизмов канальцево-канальцевого баланса. EDL также усиливал проксимальный и дистальный транспорт ионов натрия в 2.2 и 1.9 раза соответственно. При введении EDL экскреция ионов калия достоверно снижалась в 2.1 раза, все олигопептиды нормализовывали уровень ионов калия в крови и предупреждали развитие гипокалиемии.

Введение ПКП и коротких пептидов AED, EDL и AEDG в профилактическом и лечебном режимах

Влияние пептидов на показатели функционального состояния почек при цисплатиновой ОПН у крыс ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (1-я группа)	ОПН (2-я группа)	ОПН+ПКП (3-я группа)	ОПН+пептид EDL (4-я группа)	ОПН+пептид AED (5-я группа)	ОПН+пептид AEDG (6-я группа)
Диурез, мл	4.12±0.17	1.50±0.25**	2.62±0.31**	3.02±0.51**	1.81±0.14	2.89±0.28**
Концентрация креатинина в плазме крови, мкмоль/л	64.90±3.91	94.91±12.92*	67.43±9.29*	68.95±5.13*	82.60±5.89	77.54±10.44
Экскреция креатинина, мкмоль/2 ч	3.83±0.17	2.45±0.34*	3.31±0.35*	4.26±0.48**	2.94±0.25	3.88±0.28**
СКФ, мкл/мин	502.90±37.82	240.8±46.88**	433.3±41.43**	543.9±89.68**	305.1±33.08	469.9±70.93*
Концентрация белка в моче, г/л	0.011±0.002	0.049±0.007**	0.020±0.002**	0.026±0.003**	0.025±0.002**	0.026±0.003**
Экскреция белка, мг/100 мкл КФ	0.009±0.002	0.037±0.012**	0.013±0.002**	0.014±0.002**	0.015±0.001**	0.019±0.005
Концентрация Na ⁺ в моче, ммоль/л	0.63±0.05	2.94±0.16**	0.85±0.10**	0.79±0.55**	1.47±0.11**	1.20±0.18**
Экскреция Na ⁺ , мкмоль/100 мкл КФ	0.54±0.08	1.94±0.23**	0.53±0.07**	0.45±0.14**	1.45±0.38	0.93±0.25*
Абсолютная реабсорбция Na ⁺ , мкмоль/мин	69.69±10.66	26.38±5.37*	45.09±3.95*	57.13±9.49*	32.60±3.30	51.05±8.28*
Проксимальный транспорт Na ⁺ , ммоль/2 ч	7.33±0.65	3.00±0.63**	5.13±0.47*	6.54±1.09*	3.72±0.39	5.81±0.97*
Дистальный транспорт Na ⁺ , мкмоль/2 ч	533.87±22.38	162.6±28.5**	276.2±36.2*	316.2±52.7*	192.3±13.7	314.9±35.4**
Концентрация K ⁺ в плазме крови, ммоль/л	5.29±0.28	4.11±0.21**	4.39±0.24	5.71±0.32**	5.68±0.29**	5.11±0.27**
Экскреция K ⁺ , мкмоль/100мкл КФ	3.97±0.49	21.25±4.55**	12.49±1.68	9.94±0.97**	14.52±1.23	15.22±3.71

Примечание. КФ — клубочковый фильтрат. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.05$ по сравнению с ОПН.

оказало восстанавливающее действие на функциональное состояние почек крыс при цисплатиновой ОПН. AED способствовал снижению концентрации белка, ионов натрия и калия в моче. ПКП и EDL, AEDG нормализовывали исследуемые показатели функций почек. Наибольший нефропротективный эффект показал пептид EDL.

Таким образом, ПКП оказался эффективным средством лечения экспериментальной ОПН у животных, что коррелирует с полученными ранее данными о его применении у пациентов с подагрической нефропатией. При проведении лечения с применением ПКП в 78% случаев наблюдались улучшение показателей общеклинического исследования крови и мочи, биохимического анализа крови и положительная динамика при УЗИ почек [2]. В условиях экспериментальной цисплатиновой ОПН короткие пептиды, особенно пептид EDL, также проявили выраженный нефропротективный эффект. Эти данные имеют важное значение, поскольку короткие пептиды обладают меньшей иммуногенностью по сравнению с полипептидными комплексами и мо-

гут использоваться в качестве потенциальных лекарственных средств у пациентов с нарушениями функций иммунной системы. Поскольку ранее было показано, что в основе действия изученных пептидов лежит их способность регулировать синтез белков, участвующих в процессах клеточного обновления и замедляющих темп старения почечной ткани [7,9], полученные данные открывают новые перспективы исследования ПКП и пептидов AED, EDL и AEDG в качестве нефропротекторов при широком спектре почечной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гоженко А.И. // Патология. 2008. Т. 5, № 3. С. 66-75.
2. Евразийский патент № 010723. Средство, нормализующее функцию почек и способ его получения / В.Х. Хавинсон, В.В. Малинин, Г.А. Рыжак // Дата публикации 30.10.2008.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М., 2009.
4. Ничик Т.Е., Линькова Н.С., Красковская Н.А. и др. // Успехи физиол. наук. 2014. Т. 45, № 2. С. 49-56.

5. Пентюк О.О., Волощук Н.І., Машевська О.В. // Рац. фармакогер. 2009. № 1. С. 6-15.
6. Рябов С.И., Наточин Ю.В. Функциональная нефрология. СПб., 1997.
7. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Полякова В.О. и др. // Бюл. экспер. биол. 2014. Т. 157, № 2. С. 227-230.
8. Штриголь С.Ю., Лісовий В.М., Зупанець І.А. Методи експериментального моделювання ураження нирок для фармакологічних досліджень. Методичні рекомендації. Київ., 2009.
9. Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Trofimov A.V. et al. // Biol. Bull. Rev. 2011. Vol. 1, N 4. P. 389-393.
10. Kilic U., Kilic E., Tuzcu Z. et al. // Nutr. Metab. (Lond.). 2013. Vol. 10, N 1. P. 7.
11. Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G., Reeves W.B. // Toxins (Basel). 2010. Vol. 2, N 11. P. 2490-2518.
12. Pabla N., Dong Z. // Kidney Int. 2008. Vol. 73, N 9. P. 994-1007.
13. Singh A.P., Junemann A., Muthuraman A. et al. // Pharmacol. Rep. 2012. Vol. 64, N 1. P. 31-44.
14. Yao X., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K. // Am. J. Med. Sci. 2007. Vol. 334, N 2. P. 115-124.
15. Zamorskii I.I., Shchudrova T.S. // Biophysics. 2014. Vol. 59, N 5. P. 834-836.

Получено 10.07.14
