
БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

НЕФРОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА EDL ПРИ ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧЕК РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

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

*Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина; *Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ; **ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, РФ; ***Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, РФ*

Пептид EDL оказывал нефропротективное действие на экспериментальных моделях гентамициновой нефропатии и ишемически-реперфузионного повреждения почек у крыс. Нефропротективное действие пептида EDL проявлялось в предотвращении развития олигурии и ретенционной азотемии, уменьшении протеинурии и экскреции натрия, предупреждении критического снижения активности антиоксидантных ферментов на фоне ограничения процессов ПОЛ и нормализации энергетического обеспечения клеток почек. Полученные данные свидетельствуют о перспективе дальнейшего исследования нефропротективных свойств пептида EDL при различных патологиях почек.

Ключевые слова: острое повреждение почек, пептид EDL, нефропротекция

В течение последних 25 лет частота возникновения острого повреждения почек возросла в 20 раз [12] и составляет в среднем 13-20% всех госпитализаций [8]. При этом 38-76% случаев сопровождается развитием острого тубулярного некроза ишемического или токсического происхождения, часто обусловленного применением потенциально нефротоксичных лекарственных препаратов [10]. Это делает актуальным поиск веществ, обладающих нефропротективным действием.

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии синтезирован пептид EDL, обладающий гепатопротективными и нефропротективными свойствами в физиологических условиях и при развитии патологии. Этот пептид не токсичен и не вызывает аллергических реакций [11]. Пептид EDL стимулирует рост органотипических культур клеток почек и печени, регулирует экспрессию маркера ремоделирования межклеточного матрикса MMP-14, усиливает сосудистую и канальцевую проницаемость клеток [2,6]. Активирует рост клеток, снижает экспрессию маркеров старения p16,

p21, p53 и повышает экспрессию белка SIRT-6. По данным молекулярного моделирования пептид EDL образует энергетически выгодные комплексы с последовательностью d(ATATATATAT)₂ в малой бороздке ДНК, что может указывать на его регуляторное действие в отношении экспрессии генов белков-маркеров старения и функциональной активности клеток почек [7]. Установлено нефропротективное действие пептида EDL при экспериментальном цисплатининдуцированном и рабдомиолитическом остром повреждении почек [3,4].

Цель данного исследования — изучить нефропротективное действие пептида EDL на моделях токсической гентамициновой нефропатии и ишемии-реперфузии почек у крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Были проведены две серии экспериментов. В работе использовали нелинейных белых крыс массой 150-200 г ($n=42$), находившихся в стандартных условиях вивария с поддержанием постоянной температуры и влажности, свободным доступом к воде и пище (комбикорм полнорационный).

Адрес для корреспонденции: miayu@yandex.ru. Линькова Н.С.

Все исследования проведены в соответствии с Директивой Европейского союза 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях.

В I серии крыс рандомизировали в 3 группы (по 7 особей в каждой): 1-я группа — контрольная, 2-я — животные с гентамициновой нефропатией, которую воспроизводили введением 4% раствора гентамицина сульфата (“Галичфарм”) в дозе 80 мг/кг однократно в течение 6 сут [13,14]. Животным 3-й группы через 40 мин после каждой инъекции гентамицина внутривенно вводили пептид EDL в дозе 3 мкг/кг. Пептид в этой дозе показал нефропротективную активность [3,4]. Через 24 ч после последней инъекции гентамицина животных выводили из эксперимента и брали материал для исследования.

Во II серии крысы также были распределены на 3 группы (по 7 особей в каждой): 1-я — ложнооперированные животные, 2-я — моделирование ишемически-реперфузионного повреждения, 3-я — введение пептида EDL в дозе 3 мкг/кг в течение 3 сут до моделирования патологии. Ишемию моделировали в асептических условиях под общей анестезией (этаминал натрия, 40 мг/кг) путем наложения зажима на каждую почечную ножку на 60 мин с последующей 24-часовой реперфузией [8,9], после чего в течение 2 ч собирали мочу в условиях индуцированного водного диуреза (энтеральное внутривенное введение подогретой до 37°C питьевой воды в объеме 5% от массы тела). Животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом.

Функцию почек оценивали по показателям диуреза, концентрации креатинина в плазме крови (P_{Cr}), клиренса креатинина (Cl_{Cr}), экскреции белка с мочой (E_{Pr}), фракционной экскреции (FE_{Na}) и реабсорбции (R_{Na}) ионов натрия [5]. Концентрацию креатинина в плазме определяли по методу Поппера в модификации Мерзона, в моче — по методу Фолина. Содержание белка в моче определяли сульфосалициловым методом. Концентрацию ионов натрия в плазме крови и моче — методом пламенной фотометрии [3]. Показатели функции почек стандартизировали, пересчитывая их абсолютные величины на единицу массы тела или объема клубочкового фильтрата. При изучении состояния прооксидантно-антиоксидантного равновесия в ткани почек содержание МДА определяли по реакции с ТБК, активность каталазы — по реакции с молибдатом аммония, активность глутатионпероксидазы (ГП) — по количеству восстановленного глутатиона. Для оценки состояния энергетического обмена определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в ткани почек по интенсивности восстановления феррицианида калия [1].

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе “SPSS Statistics 17.0”. Характер распределения показателей определяли по критерию Колмогорова—Смирнова. Различия между выборками оценивали с использованием параметрического t критерия Стьюдента (при нормальном распределении переменных), непараметрического U критерия Манна—Уитни (при отсутствии согласия данных с нормальным распределением). Наличие корреляционной взаимосвязи между показателями определяли с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r). Минимальный уровень значимости был равен $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прямая гломерулярная токсичность и аккумуляция гентамицина в эпителиальных клетках почечных канальцев приводит к дестабилизации клеточных мембран, генерации свободных радикалов, активации апоптоза, массивному протеолизу, энергетическому дисбалансу и воспалению, что вызывает развитие тубулярного некроза и нарушение функционального состояния почек [13].

В I серии экспериментов введение гентамицина животным в течение 6 сут оказывало выраженный нефротоксический эффект, который проявлялся нарушением экскреторной функции почек с развитием олигурии (снижение диуреза на 54%), ретенционной азотемии (увеличение P_{Cr} в 3.3 раза на фоне снижения Cl_{Cr} на 74%), а также выраженной протеинурии с увеличением E_{Pr} в 2.3 раза по сравнению с контрольными значениями. Поражение проксимальных канальцев нефрона привело к одновременному угнетению транспортных систем, что проявлялось повышением FE_{Na} до 4.55% (в 9.7 раза) на фоне снижения на 5% показателя R_{Na} (табл. 1).

Применение пептида EDL способствовало ослаблению нефротоксического влияния гентамицина, на что указывает увеличение диуреза на 72%, предотвращение развития ретенционной азотемии за счет увеличения Cl_{Cr} в 2.9 раза, а также снижение показателя E_{Pr} на 43% по сравнению с группой нелеченых животных. Защитное действие пептида по отношению к клеткам проксимальных канальцев проявлялось ограничением потери натрия с мочой, что подтверждается сохранением показателя FE_{Na} на контрольном уровне и повышением показателя R_{Na} на 3% по сравнению с группой нелеченых животных. Достоверное улучшение всех изученных показателей указывает на ограничивающее влияние пептида как на гломерулярный, так и на тубулярный компонент нефротоксичности гентамицина и подтверждается достоверной прямой

корреляционной связью между показателями R_{Na} и Cl_{Cr} ($r=0.96$), R_{Na} и E_{Pr} ($r=0.77$).

Оксидативный стресс является одним из основных механизмов развития гентамициновой нефропатии, поэтому исследование антиоксидантных свойств потенциального нефропротектора в условиях развития данной патологии необходимо для комплексной оценки защитного действия. Под действием гентамицина наблюдалась значительная активация процессов пероксидации в ткани почек, что проявлялось увеличением содержания МДА на 93% на фоне угнетения активности ферментов антиоксидантной защиты (ГП в 2.8 раза, каталазы в 2.2 раза). Введение пептида EDL в некоторой степени компенсировало данные нарушения, на что указывает снижение содержания МДА в ткани почек на 41% при увеличении активности каталазы на 74%, ГП на 65% по сравнению с группой нелеченых животных (табл. 1).

Также установлено выраженное влияние пептида EDL на состояние энергообмена в ткани почек: введение гентамицина привело к снижению активности СДГ на 75%, а применение пептида на фоне гентамицина способствовало сохранению активности фермента на уровне контрольных значений. Способность пептида EDL влиять на основные звенья патогенеза гентамициновой нефропатии подтверждается наличием достоверных корреляционных связей между показателями активности СДГ и каталазы ($r=0.76$), активности СДГ и R_{Na} ($r=0.89$), активности СДГ и Cl_{Cr} ($r=0.89$), а также между активностью ГП и R_{Na} ($r=0.75$), FE_{Na} и содержанием МДА в ткани почек ($r=0.63$).

Во II серии экспериментов моделирование 60-минутной ишемии с последующей 24-часовой реперфузией привело к развитию острого сосудистого и тубулярного повреждения, что сопровождалось снижением диуреза на 49%, повышением креатинемии в 2 раза на фоне снижения Cl_{Cr} на 73%, а также увеличением экскреции белка в 2.8 раза по сравнению с группой ложноперированных животных. Угнетение канальцевой реабсорбции привело к потере ионов натрия, на что указывает повышение показателя FE_{Na} в 5.8 раза (табл. 2).

Введение пептида EDL способствовало предотвращению развития выраженного нарушения функции почек животных. Показатели диуреза и P_{Cr} находились на уровне контрольных значений, что свидетельствует о сохранении экскреторной функции почек и объясняется достоверным увеличением Cl_{Cr} в 2.3 раза по сравнению с нелечеными животными. Защитное действие пептида снижало выраженность протеинурии: показатель E_{Pr} снизился на 62% по сравнению с нелеченой группой. Применение пептида EDL привело к компенсаторному увеличению реабсорбции натрия, что, в свою очередь, привело к снижению показателя FE_{Na} до контрольного уровня.

Протективное действие пептида EDL опосредовано способностью влиять на важные патогенетические механизмы развития острого повреждения почек — развитие оксидативного стресса и энергетического дефицита [7]. Установлено, что в условиях ишемии-реперфузии значительно активируются свободнорадикальные процессы, что подтверждается увеличением содержания МДА в

Таблица 1. Показатели функционального состояния почек, прооксидантно-оксидантного баланса и активности СДГ в ткани почек у крыс при введении пептида EDL на фоне развития гентамициновой нефропатии ($M \pm m$)

| Показатель | Контроль | Гентамициновая нефропатия | Гентамициновая нефропатия+EDL |
|---|-------------|---------------------------|-------------------------------|
| Функциональное состояние почек | | | |
| Диурез, мл | 4.83±0.13 | 2.21±0.50** | 3.80±0.62 ⁺ |
| Креатинин плазмы, мкмоль/л | 55.63±5.98 | 182.73±15.08*** | 68.27±2.31 ⁺⁺⁺ |
| Клиренс креатинина, мкл/мин | 56.49±6.34 | 14.88±3.61* | 43.03±7.63 ⁺⁺ |
| Экскреция белка, мг/2 ч | 0.088±0.015 | 0.20±0.03** | 0.116±0.03 ⁺⁺ |
| Фракционная экскреция ионов натрия, % | 0.47±0.08 | 4.55±0.60*** | 0.87±0.18 ⁺⁺⁺ |
| Реабсорбция ионов натрия, % | 99.07±0.22 | 94.03±1.31** | 97.09±0.64 ⁺ |
| Прооксидантно-антиоксидантный баланс и активность СДГ | | | |
| Активность ГП, нмоль/(мин×мг белка) | 149.34±2.4 | 53.59±2.50*** | 88.51±11.80 ⁺⁺ |
| Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ /(мин×мг белка) | 7.85±0.08 | 3.65±0.17** | 6.34±0.07 ⁺⁺ |
| Содержание МДА, мкмоль/г белка | 19.08±1.69 | 36.85±1.56*** | 21.68±1.93 ⁺⁺ |
| Активность СДГ, нмоль сукцината/(мин×мг белка) | 13.35±0.50 | 3.34±0.86*** | 12.89±0.45 ⁺⁺⁺ |

Примечание. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем; ⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$ по сравнению с показателем при гентамициновой нефропатии.

Таблица 2. Показатели функционального состояния почек и прооксидантно-оксидантного баланса, а также активности СДГ в ткани почек крыс при введении пептида EDL в условиях ишемии-реперфузии почек ($M \pm m$)

| Показатель | Ложнооперированные животные | Ишемия-реперфузия | Ишемия-реперфузия+EDL |
|---|-----------------------------|-------------------|-----------------------|
| Функциональное состояние почек | | | |
| Диурез, мл | 4.12±0.10 | 2.11±0.14** | 3.97±0.34** |
| Креатинин плазмы, мкмоль/л | 65.24±6.08 | 138.57±9.60** | 78.39±3.58* |
| Клиренс креатинина, мкл/мин | 66.40±8.05 | 17.85±1.57** | 40.26±4.64** |
| Экскреция белка, мг/100 мкл | 0.016±0.001 | 0.082±0.05** | 0.031±0.003** |
| Фракционная экскреция ионов натрия, % | 0.37±0.06 | 2.16±1.26** | 0.55±0.23** |
| Реабсорбция ионов натрия, % | 98.89±0.31 | 96.80±0.41** | 97.88±0.39* |
| Прооксидантно-антиоксидантный баланс и активность СДГ | | | |
| Активность ГП, нмоль/(мин×мг белка) | 128.76±3.76 | 63.75±2.86*** | 101.08±2.91** |
| Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ /(мин×мг белка) | 6.91±0.13 | 4.85±0.31** | 7.31±0.14** |
| Содержание МДА, мкмоль/г белка | 23.66±1.22 | 34.87±1.05** | 26.34±0.58** |
| Активность СДГ, нмоль сукцината/(мин×мг белка) | 12.82±0.18 | 2.71±0.23*** | 14.57±0.81** |

Примечание. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с ложнооперированными животными; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с ишемией-реперфузией.

ткани почек на 47%, а также снижением активности каталазы и ГП на 30 и 50% соответственно. В свою очередь, снижение активности СДГ на 79% указывает на значительное нарушение энергообеспечения нефронов в условиях ишемического повреждения (табл. 2).

В группе животных, которым вводили пептид EDL, наблюдалось повышение активности ГП на 59%, каталазы на 51%, что обеспечило предотвращение развития окислительного стресса со снижением содержания МДА на 25% по сравнению с группой ишемии-реперфузии. Введение пептида привело к повышению активности СДГ в 5.4 раза, что указывает на способность пептида поддерживать функционирование клеток в условиях энергетического дефицита. При анализе взаимосвязей показателей в группе животных, которым вводили пептид EDL, было установлено наличие корреляционной зависимости между активностью СДГ и содержанием МДА ($r = -0.67$), FE_{Na} ($r = -0.7$), Cl_{cr} ($r = 0.62$), между активностью каталазы и FE_{Na} ($r = -0.86$), а также между содержанием МДА и Cl_{cr} ($r = -0.6$), активностью ГП ($r = -0.82$).

Анализ результатов проведенных исследований позволил установить наличие нефропротективной активности у пептида EDL как при нефропатии токсического генеза, так и при ишемии-реперфузии почек. Сравнительная оценка влияния пептида на течение острой почечной патологии различного генеза указывает на цитопротективное действие по отношению к клеткам почечных канальцев, что подтверждается нормализацией показателей транспорта ионов натрия, вследствие чего значительно возрастает скорость клубочковой фильтрации по

механизму канальцево-клубочковой обратной связи. В свою очередь, восстановление фильтрационной функции почек способствует предупреждению развития ретенционной азотемии и олигурии. При этом установлено, что профилактическое введение пептида при ишемии-реперфузии почек в большей степени, чем при токсической нефропатии, снижало выраженность протеинурии. В условиях развития гентамициновой нефропатии пептид проявлял более эффективное, чем при ишемическом повреждении, антиоксидантное действие, на что указывает более выраженное снижение содержания МДА в ткани почек и повышение активности каталазы под влиянием пептида.

Таким образом, пептид EDL обладает защитным действием по отношению к почечной ткани на моделях токсического гентамицинового и ишемически-реперфузионного повреждения, о чем свидетельствует восстановление экскреторной функции почек, улучшение энергообеспечения нефронов, ограничение свободнорадикальных процессов на фоне сохранения активности ферментов антиоксидантной защиты, а также наличие корреляционных взаимосвязей между показателями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб., 2000.
2. Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Ли О.А. Матриксные металлопротеиназы в патогенезе острых и хронических заболеваний почек (обзор литературы) // Нефрология и диализ. 2008. Т. 10, № 2. С. 105-111.

3. *Заморский И.И., Шудрова Т.С.* Основные механизмы повреждения почек при рабдомиолизе и их коррекция органоспецифическими пептидами // *Биофизика*. 2014. Т. 59, № 5. С. 1023-1026.
4. *Заморский И.И., Шудрова Т.С., Линькова Н.С., Ничик Т.Е., Хавинсон В.Х.* Пептиды восстанавливают функциональное состояние почек при дисплатиновой острой почечной недостаточности // *Бюл. экспер. биол.* 2015. Т. 159, № 6. С. 708-712.
5. *Камышников В.С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М., 2009.
6. *Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Полякова В.О., Дурнова А.О., Ничик Т.Е., Кветной И.М.* Пептиды регулируют экспрессию сигнальных молекул в клеточных культурах почек при старении *in vitro* // *Бюл. экспер. биол.* 2014. Т. 157, № 2. С. 227-230.
7. *Хавинсон В.Х., Соловьев А.Ю., Тарновская С.И., Линькова Н.С.* Механизм биологической активности коротких пептидов: проникновение в клетку и эпигенетическая регуляция экспрессии генов // *Успехи соврем. биол.* 2013. Т. 133, № 3. С. 310-316.
8. *Acute kidney injury: Prevention, detection and management of acute kidney injury up to the point of renal replacement therapy.* NICE Clinical Guidelines, N 169. London, 2013 Aug.
9. *El Sabbahy M., Vaidya V.S.* Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2011. Vol. 3, N 5. P. 606-618.
10. *Gill N., Nally J.V. Jr, Fatica R.A.* Renal failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis and management // *Chest*. 2005. Vol. 128, N4. P. 2847-2863.
11. *Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V., Ryzhak G.A.* Peptide stimulating liver tissue regeneration, pharmacological substance based thereon and method of its application. Eurasia Patent. EA 010156. 30.06.2008.
12. *Murugan R., Kellum J.A.* Acute kidney injury: what's the prognosis? // *Nat. Rev. Nephrol.* 2011. Vol. 7, N 4. P. 209-217.
13. *Singh A.P., Junemann A., Muthuraman A., Jaggi A.S., Singh N., Grover K., Dhawan R.* Animal models of acute renal failure // *Pharmacol. Rep.* 2012. Vol. 64, N 1. P. 31-44.
14. *Quiros Y., Vicente-Vicente L., Morales A.I., Lopez-Novoa J.M., Lopez-Hernandez F.J.* An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin // *Toxicol. Sci.* 2011. Vol. 119, N 2. P. 245-256.

Получено 12.08.16

