

УДК 615.272.4.015.4:616.61-008.64-005.4

В. Г. ЗЕЛЕНЮК

Буковинський державний медичний університет

ЗВ'ЯЗОК НЕФРОПРОТЕКТОРНИХ ТА ПЛЕЙОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СТАТИНІВ ПРИ ІШЕМІЧНО-РЕПЕРФУЗИВНІЙ ГОСТРІЙ НИРКОВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ

В експерименті на білих щурах встановлені нефропротекторні властивості статинів (аторвастатину, ловастатину, симвастатину), які реалізувались у підвищенні швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), відновленні канальцевої реабсорбції та зменшенні протеїнурії завдяки нормалізації прооксидантно-антиоксидантного балансу та попередженні ушкодження мембран мітохондрій клітин проксимальних канальців.

Ключові слова: статини; гостра ниркова недостатність; ішемічно-реперфузивне ушкодження

ВСТУП

Ішемія з реперфузією нирок є поширеним серед експериментальних моделей методом індукції гострої ниркової недостатності (ГНН), яка включає механізми ушкодження клітин канальців нирок внаслідок виснаження запасів кисню та АТФ, що веде до прогресування порушень енергетичного обміну [6], викликає втрату мікроросинок щіткової облямівки та міжклітинних зв'язків, руйнування цитоскелету із порушенням функціонування Na^+/K^+ -АТФази та розвитком оксидативного стресу [11]. Активація процесів ліпопероксидації є однією з причин ураження мембран мітохондрій, їх загибелі і, як наслідок, прогресування порушення енергетичного обміну, що ускладнюється подальшою активацією процесів пероксидного окиснення, обумовлених надходженням кисню в клітини при реперфузії, внаслідок чого утворюється велика кількість вільних радикалів [10, 13].

Одним із напрямів фармакотерапії гострої ниркової недостатності є використання лікарських засобів з антиоксидантними властивостями [16, 21]. Статини, попри свою основну гіполіпідемічну дію, здатні виявляти антиоксидантні, протизапальні та імуномодуляторні ефекти, нормалізуючи функцію ендотелію [14, 18, 22]. Пригнічуючи синтез ліпопротеїнів низької щільності та, відповідно, утворення їх окиснених форм, що поглиблюють ішемію [19], статини здатні суттєво покращувати перебіг ГНН.

Мета дослідження – встановити зв'язок між нефропротекторними та плеїотропними властивостями деяких статинів (аторвастатин, ловастатин, симвастатин) при ішемічно-реперфузивній ГНН.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на 40 нелінійних статевозрілих білих щурах-самцях масою 140-180 г, які знаходились в умовах віварію з підтриманням постійної температури та вологості, вільним доступом до води та їжі. Тварин розподілили на 5 груп (n=8): I – контрольна група, яку склали псевдооперовані тварини; II – група нелікованих тварин, у яких моделювали ГНН; III, IV, V – групи тварин, яким вводили досліджувані препарати (аторвастатин, ловастатин, симвастатин) у дозі 20 мг/кг. Статини вводили протягом 3 днів до проведення операції внутрішньошлунково в 1 % розчині крохмалю з розрахунку 1 мл суспензії препарату на 100 г маси тіла. Ішемію моделювали із дотриманням умов асептики під загальною анестезією (етамінал-натрій, 40 мг/кг): виконували серединну лапаротомію, виділяли кожну нирку, накладаючи на ниркову ніжку затискач з метою перетискання артерії, вени та сечоводу терміном на 75 хв з наступною герметизацією черевної порожнини та дотриманням температурного режиму [4, 20]. Після видалення затискача черевну порожнину пошарово ушивали з наступною 24-годинною реперфузією та оцінкою функціонального стану нирок за умов індукованого діурезу (ентеральне введення питної води в об'ємі 5 % від маси тіла, збір сечі протягом 2 год). Після цього виводили тварин із експерименту шляхом декапітації під тіопенталовим (80 мг/кг) наркозом з метою забору крові та нирок [15].

Концентрацію креатиніну в плазмі крові визначали за методом Поппера у модифікації Мерзона, у сечі – за методом Фоліна [8], вміст білка в сечі – за реакцією із сульфосаліциловою кислотою [7]. Стан прооксидантно-антиоксидантного балансу оцінюва-

© Зеленюк В. Г., 2014

Таблиця 1

ВПЛИВ СТАТИНІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЩУРІВ ПРИ ІШЕМІЧНО-РЕПЕРФУЗИВНІЙ ГОСТРІЙ НИРКОВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ (ГНН) (M±m, n=8)

| Показники | Контроль | Патологія (ГНН) | ГНН + аторвастатин | ГНН + ловастатин | ГНН + симвастатин |
|---|---------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Діурез, мл/2 год | 2,93 ± 0,15 | 2,24 ± 0,09** | 2,97 ± 0,11## | 2,79 ± 0,26## | 2,99 ± 0,16## |
| Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв | 669,3 ± 97,1 | 223,5 ± 36,9** | 601,1 ± 68,2## | 569,9 ± 47,8## | 636,3 ± 62,4## |
| Реабсорбція води, % | 95,99 ± 0,45 | 89,94 ± 1,87** | 95,64 ± 0,39## | 95,73 ± 0,49## | 95,91 ± 0,36## |
| Концентрація білка в сечі, г/л | 0,022 ± 0,008 | 0,056 ± 0,004* | 0,029 ± 0,003## | 0,031 ± 0,004## | 0,023 ± 0,003## |
| Екскреція Na ⁺ , ммоль/2 год | 2,06 ± 0,38 | 3,51 ± 0,34* | 1,72 ± 0,25## | 2,10 ± 0,39# | 1,68 ± 0,23## |
| Проксимальний транспорт Na ⁺ , ммоль/2 год | 15,61 ± 2,42 | 4,85 ± 0,83** | 18,86 ± 0,75## | 10,88 ± 1,45## | 15,51 ± 1,60## |
| Дистальний транспорт Na ⁺ , ммоль/2 год | 0,59 ± 0,3 | 0,44 ± 0,02* | 0,58 ± 0,03## | 0,43 ± 0,04 | 0,63 ± 0,04## |
| Фракційна екскреція Na ⁺ , % | 0,51 ± 0,09 | 2,38 ± 0,46** | 0,15 ± 0,02## | 0,27 ± 0,07## | 0,13 ± 0,02## |
| Екскреція K ⁺ , ммоль/2 год | 25,50 ± 2,60 | 15,13 ± 2,18* | 26,23 ± 1,24# | 23,73 ± 2,39 | 24,79 ± 2,33# |
| Активність ГТП у сечі, ммоль/(год*л) | 0,09 ± 0,01 | 4,43 ± 0,42** | 0,70 ± 0,08## | 0,81 ± 0,08## | 0,50 ± 0,11## |

Примітка (тут і в табл. 2). Статистично значущі відмінності: 1. з даними групи інтактного контролю – * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01); 2. з даними групи модельної патології (ГНН) – # (p ≤ 0,05), ## (p ≤ 0,01); ГТП – γ-глутамілтранспептидаза.

ли за рівнем малонового діальдегіду (МДА) [9] та активністю глутатіонпероксидази (ГП) в тканині нирок [1]. Концентрацію іонів калію та натрію в сечі і плазмі крові оцінювали методом полум'яної фотометрії на «ФПЛ-1» (Україна) [8]. Концентрацію β-ліпопротеїнів (β-ЛП) у плазмі крові визначали турбідиметричним методом Бурштейна-Самая [2]. Стан енергетичного забезпечення нирок визначали за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ) [5]. Ступінь каналцевої мембранної патології [12, 17] оцінювали за активністю γ-глутамілтранспептидази (ГТП) [3]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» з використанням параметричного t-критерію Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричного U-критерію Манна-Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу). Кореляційний аналіз вибірок здійснювали за коефіцієнтом Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ішемія нирок з подальшою реперфузією призвела до виникнення олігурії. Так, у групі нелікованих тварин діурез зменшувався на 31 % порівняно з гру-

пою контролю, а застосування статинів забезпечувало відновлення сечовиділення до показника групи псевдооперованих тварин (табл. 1). При моделюванні патології відзначали значне у 3 рази падіння ШКФ. Уведення аторвастатину сприяло підвищенню ШКФ у 2,7 рази, ловастатину – у 2,5 рази, симвастатину – у 2,8 рази. У нелікованих тварин із ГНН спостерігали збільшення екскреції іонів натрію на 70 %, пов'язане із глибоким порушенням каналцевої реабсорбції. Це підтверджується підвищенням фракційної екскреції іонів натрію до 2,4 %, що свідчить про розвиток гострого каналцевого некрозу. Статини сприяли нормалізації електролітовидільної функції нирок, зменшуючи екскрецію іонів натрію, а також його фракційну екскрецію нижче 1 %, що відповідає показникам норми. У нелікованих тварин значно у 3,2 рази погіршувався проксимальний транспорт іонів натрію та в меншій мірі дистальний транспорт – в 1,3 рази. Досліджувані препарати відновлювали реабсорбцію іонів натрію, при чому аторвастатин покращував проксимальний транспорт відносно групи контролю на 21 %. Введення статинів сприяло зменшенню гіперкаліємії, яка розвинулась при ішеміч-

Таблиця 2

ВПЛИВ СТАТИНІВ НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС (M±m, n=8)

| Показники | Контроль | Патологія (ГНН) | ГНН + аторвастатин | ГНН + ловастатин | ГНН + симвастатин |
|---|---------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Вміст МДА у тканині нирок, ммоль/г | 33,19 ± 1,52 | 54,87 ± 2,35** | 40,07 ± 2,04## | 47,21 ± 4,46 | 35,31 ± 2,88## |
| Активність ГП у тканині нирок, ммоль/мг білка | 214,86 ± 9,46 | 82,67 ± 7,07** | 157,84 ± 11,46# | 129,87 ± 15,13# | 189,35 ± 12,9## |

Примітка: МДА – малоновий діальдегід; ГП – глутатіонпероксидаза.

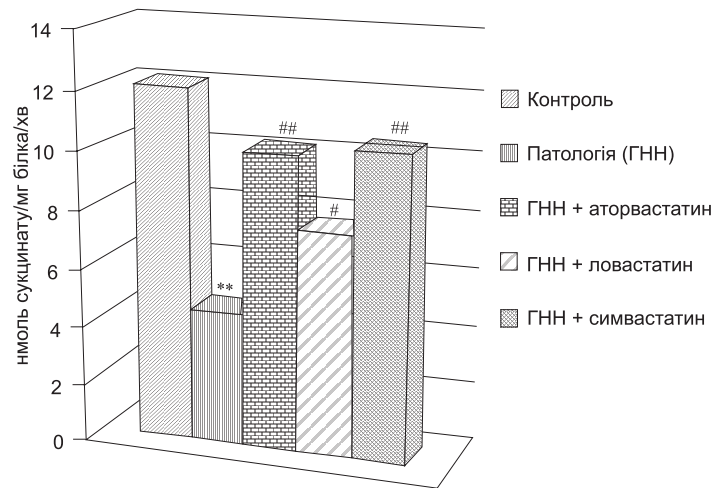


Рис. 1. Активність сукцинатдегідрогенази у тканині нирок щурів.

Примітка (тут і в рис. 2). Статистично значущі відмінності: 1 – з даними групи інтактного контролю – * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$); 2 – з даними групи модельної патології (ГНН) – # ($p \leq 0,05$), ## ($p \leq 0,01$); ГНН – гостра ниркова недостатність.

но-реперфузивній ГНН за рахунок підвищення екскреції іонів калію на 64 % в середньому для усіх препаратів. Аналогічну тенденцію спостерігали і щодо відновлення під впливом препаратів рівня реабсорбції води до показника групи контролю. Концентрація білка в сечі нелікованих тварин із ГНН перевищувала показник контрольних тварин у 2,5 рази, а застосування статинів сприяло значному зменшенню протеїнурії, причому найкращий результат відзначили в групі симвастатину – у 2,4 рази проти 1,9 рази та 1,8 рази в групах аторвастатину та ловастатину відповідно.

Про тяжкість перебігу ГНН свідчить також підвищення активності ГТП у 49 разів порівняно з групою контролю (табл. 1), що корелює із зростанням фракційної екскреції іонів натрію ($r=0,71$), зменшенням екскреції іонів калію ($r=0,81$) та протеїнурією ($r=0,69$). Значне зменшення активності ГТП під впливом статинів вказує на їх здатність сприяти захисту нефроцитів каналців при ішемічній ГНН, обмежуючи розвиток каналцевого некрозу та втрату щіткової облямівки.

Розвиток ішемічно-реперфузивної ГНН супроводжувався порушенням прооксидантно-антиоксидантного балансу в тканині нирок: вміст МДА зростав на 65 %, активність ГП зменшувалась у 2,6 рази (табл. 2). При застосуванні статинів відзначали зменшення рівня МДА на 34 % та збільшення активності ГП на 92 % (в середньому для усіх препаратів), причому кращі результати спостерігали в групі симвастатину – на 55 % та у 2,3 рази відповідно. Ушкодження мембран мітохондрій вільними радикалами, зумовлене розвитком ренальної ішемії, призвело до порушень енергетичного обміну та зменшення активності СДГ у тканині нирок у 2,6 рази (рис. 1), що підтверджується наявністю від'ємного кореляційного зв'язку між вмістом МДА у тканині нирок та активністю СДГ ($r=-0,88$), а також прямою залежністю між активністю ГП та СДГ ($r=0,72$). Завдяки пригніченню процесів вільнорадикального окиснення вдалося досягти позитивної тенденції у відновленні активності СДГ під впливом статинів: у 2,2 рази в групі аторвастатину, в 1,7 – ловастатину і 2,3 рази – симвастатину. Такий вплив препаратів можна пов'язати із зменшенням вмісту

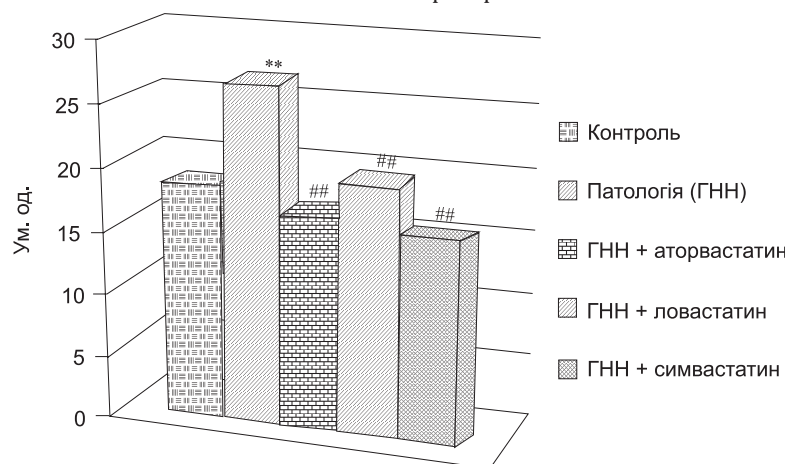


Рис. 2. Вміст β-ліпопротеїнів у плазмі крові щурів.

β -ЛП у плазмі крові щурів у середньому на 53 % (рис. 2), оскільки окрім свого атерогенного впливу β -ЛП здатні модифікуватись у окиснені форми та погіршувати перебіг ГНН, про що свідчить збільшення їх вмісту при патології на 50 % та зв'язок із рівнем МДА ($r=0,46$), активністю ГП ($r=-0,86$), ШКФ ($r=-0,56$) та концентрацією білка в сечі ($r=0,35$). Серед застосованих препаратів найбільш виразний гіполіпідемічний ефект продемонстрував симвастатин, на що вказує менший на 25 % рівень β -ЛП у плазмі крові порівняно із аторвастатином та ловастатином.

ВИСНОВОК

За умов розвитку ішемічно-реперфузивної ГНН статини (аторвастатин, ловастатин, симвастатин) виявляють нефропротекторну активність у дозі 20 мг/кг завдяки відновленню екскреторної функції нирок, нормалізації прооксидантно-антиоксидантного балансу та енергетичного обміну в нефроцитах, а серед досліджуваних препаратів симвастатин продемонстрував кращу ефективність, що можна пояснити його вищою ліпофільністю та сильнішим в умовах цього експерименту антиатерогенним ефектом.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- Геруш І. В. Стан глутатионової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастродуоденальної зони та дії настойки ехінацеї пурпурової / І. В. Геруш, І. Ф. Мецишен // Вісник проблем біохімії та медицини. – 1998. – № 7. – С. 10-15.
- Горячковский А. М. Клиническая биохимия. – Одесса: Астропринт, 1998. – 608 с.
- Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2-х т. / В. С. Камышников. – Мн: Беларусь, 2002. – Т. 1. – 495 с.
- Методи експериментального моделювання ураження нирок при фармакологічних дослідженнях: [метод. рекомен. ДФЦ України] / [С. Ю. Штриголь, В. М. Лісовий, І. А. Зупанець та ін.] – К, 2009. – С. 9-10.
- Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
- Митохондриальна регуляція продукції активних форм кисню та азота в клітках почки крысы при ішемії/реперфузії / [Е. Ю. Плотников, М. Ю. Высоких, Д. В. Цвиркун и др.] // Докл. РАН. – 2005. – Т. 400, № 5. – С. 80-83.
- Михеева А. И. К методике определения общего белка в моче на ФЭК-Н-56 / А. И. Михеева, И. А. Богодарова // Лаб. дело. – 1969. – № 7. – С. 441-442.
- Рябов С. И. Функциональная нефрология / С. И. Рябов, Ю. В. Наточин. – СПб.: Лань, 1997. – 304 с.
- Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии / Ред. В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
- Abraham P. Depletion of the cellular antioxidant system contributes to tenofovir disoproxil fumarate-induced mitochondrial damage and increased oxidative-nitrosative stress in the kidney / P. Abraham, H. Ramamoorthy, B. Isaac // J. of Biomed. Sci. – 2013. – Vol. 20. – P. 1-15.
- Ashtiyani S. C. The study of the effects of post treatment with rosmarinus officinalis aqueous extract the first 48 hours after renal ischemia/reperfusion in rats / [S. C. Ashtiyani, M. Zohrabi, A. Hassanpoor et al.] // Zahedan J. Res. Med. Sci. – 2013. – Vol. 15, № 6. – P. 1-7.
- Calbrera-Abreu J. C. γ -Glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics / J. C. Calbrera-Abreu, A. Green // Ann. Clin. Biochem. – 2002. – Vol. 39. – P. 22-25.
- Collard C. D. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury / C. D. Collard, S. Gelman // Anesthesiol. – 2001. – Vol. 94, № 6. – P. 1133-1138.
- Davington J. The antioxidant effects of statins / J. Davington, R. F. Jacob, R. P. Mason // Coron Artery Dis. – 2004. – Vol. 15, № 5. – P. 251-258.
- European convention for the protection of the vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
- Luciak M. Antioxidants in the treatment of patients with renal failure / M. Luciak // Ann. Academiae Medicae Bialostocensis. – 2004. – Vol. 49. – P. 157-161.
- Okada T. Crystal structures of gamma-glutamyltranspeptidase from Escherichia coli, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate / [T. Okada, H. Suzuki, K. Wada et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, № 17. – P. 6471-6476.
- Pella D. Pleiotropic effects of statins / D. Pella, R. Rybar, V. Mechirova // Acta Cardiol. Sin. – 2005. – Vol. 21. – P. 190-198.
- Ramsammy L. Effect of gentamicin on lipid peroxidation in rat renal cortex / [L. Ramsammy, K. Y. Ling, C. Josepovitz et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1985. – Vol. 34, № 21. – P. 3895-3900.
- Singh Amrit Pal. Animal models of acute renal failure / [Amrit Pal Singh, Arunachalam Muthuraman, Amteshwar Singh Jaggi et al.] // Pharmacol. Reports. – 2012. – № 64. – P. 31-44.
- Singh D. Antioxidants in the prevention of renal disease / D. Singh, R. Kaur, V. Chander, K. Chopra // J. Med. Food. – 2006. – Vol. 9, № 4. – P. 443-450.
- Stoll L. L. Antioxidant effects of statins / L. L. Stoll, M. L. McCormick, G. M. Denning, N. L. Weintraub // Drugs Today (Barc). – 2004. – Vol. 40, № 12. – P. 975-990.

УДК 615.272.4.015.4:616.61-008.64-005.4**В. Г. Зеленюк****СВЯЗЬ НЕФРОПРОТЕКТОРНЫХ И ПЛЕЙОТРОПНЫХ СВОЙСТВ СТАТИНОВ
ПРИ ИШЕМИЧНО-РЕПЕРФУЗИОННОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

В эксперименте на белых крысах установлены нефропротекторные свойства статинов (аторвастатина, ловастатина, симвастатина), реализовавшиеся в повышении скорости клубочковой фильтрации, восстановлении канальцевой реабсорбции и уменьшении протеинурии благодаря нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса и предупреждению повреждения мембран митохондрий клеток проксимальных канальцев.

Ключевые слова: статины; острая почечная недостаточность; ишемично-реперфузионные поражения

UDC 615.272.4.015.4:616.61-008.64-005.4**V. G. Zeleniuk****INTERCONNECTION OF RENOPROTECTIVE AND PLEIOTROPIC PROPERTIES OF STATINS UNDER
ISCHEMIA-REPERFUSION ACUTE RENAL FAILURE**

In the experiment on white rats the renoprotective properties of statins (atorvastatin, lovastatin, simvastatin) have been found, which were realized in the increase of the glomerular filtration rate, recovery of tubular reabsorption and reduction of proteinuria by normalization of prooxidant-antioxidant balance and prevention of proximal tubular cells' mitochondrial damage.

Key words: statins; acute renal failure; ischemic-reperfusion injury

Адреса для листування:
58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2.
E-mail: vzeleniuk@gmail.com.
Буковинський державний медичний університет

Надійшла до редакції 22.05.2014 р.