

Т. С. Щудрова, І. І. Заморський

## Порівняльна оцінка нефропротекторної активності органоспецифічних пептидів при гентаміциновій нефропатії в щурів

*Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці*

**Ключові слова:** нефропротекція, пептиди, гентаміцинова нефропатія

Аміноглікозиди є потужними бактерицидними антибіотиками, що широко використовуються для лікування інфекцій, викликаних грамнегативними мікроорганізмами [1, 2]. Можливість розвитку нефро- та ототоксичності є серйозним обмеженням до використання аміноглікозидів у клінічній практиці, що часто вимагає припинення їхнього застосування, адже в 30 % пацієнтів при використанні протягом 7 днів і більше з'являються ознаки ураження [3]. Центральною ланкою механізму формування гентаміцинової нефротоксичності є тубулярний ефект, зумовлений частковою його реабсорбцією в проксимальних каналцях з наступною дестабілізацією мембран лізосом та ендоплазматичного ретикулуму, що призводить до вивільнення протеаз та пригнічення синтезу білка. «Цитозольний» гентаміцин прямо та опосередковано атакує мітохондрії, пригнічує клітинне дихання та продукцію АТФ, провокує розвиток оксидативного стресу, що призводить до активації апоптозу [2, 4]. Гістологічно токсичність гентаміцину асоціюється з індукцією тубулярного некрозу, епітеліального набряку проксимальних каналців, клітинної десквамації, гломерулярного застою, периваскулярного набряку та запалення [5].

З огляду на прогресуючий розвиток резистентності до значної кількості антибіотиків інших класів, аміноглікозиди залишаються актуальними препаратами, тому стратегія зменшення їхньої токсичності є обґрунтованим напрямом досліджень.

Органоспецифічні олігопептиди розроблені в Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології (РФ) на основі вивчення амінокислотного складу поліпептидних фракцій різних органів. Для дослідження було обрано трипептиди нирок AED та EDL, а також тетрапептид епіфіза AEDG. Згідно із результатами останніх досліджень, ниркові пептиди стимулюють ріст органотипових культур клітин нирок тварин, регулюють експресію маркерів клітинного оновлення та апоптозу, мають регуляторні властивості та тканинспецифічну дію [6, 7]. Системні ефекти органоспецифічних пептидів включають покращання енергетичного забезпечення тканин, модуляцію антиоксидантного захисту та імунологічного стану організму [8].

*Мета дослідження* – вивчення та порівняння нефропротекторних ефектів обраних пептидів за умов розвитку гентаміцинової нефропатії в щурів.

**Матеріали та методи.** Досліди проведено на 35 статевозрілих нелінійних білих щурах масою 150–200 г, які знаходилися в умовах віварію з підтриманням постійної температури та вологості, вільним доступом до води та їжі. Тварин було розподілено на 5 груп (n = 7): I група – інтактний контроль, II група – гентаміцинова нефропатія, яку відтворювали внутрішньом'язовим введенням щурам 4 % розчину гентаміцину сульфату (АТ «Галичфарм») у дозі 80 мг/кг один раз на одну добу протягом шести днів [9]. Тваринам III–V груп через 40 хв після кожної ін'єкції гентаміцину внутрішньоочеревинно вводили пептид EDL (3 мкг/кг), пептид AED (3 мкг/кг) та пептид AEDG (7 мкг/кг) відповідно. Функціональний стан нирок щурів оцінювали на 7 добу за умов водного наван-

таження (ентеральне введення питної води в об'ємі 5 % від маси тіла) за показниками швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), екскреції білка, іонів натрію та калію з сечею [9]. Евтаназію тварин виконували під тіопенталовим наркозом (80 мг/кг). Усі дослідження здійснено відповідно до Директиви Європейського союзу про захист тварин, що використовуються в наукових цілях (2010 р.). Стан пероксидації ліпідів у нирках оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА) та окисно-модифікованих білків (ОМБ), системи антиоксидантного захисту – за активністю каталази (КАТ) та глутатіонпероксидази (ГП) [10]. Для морфологічної оцінки гістологічних зрізів зразки забарвлювали гематоксином і еозином. При мікроскопії використовували такі параметри об'єктива та окуляра – Об. 10х, Ок. 10х. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS Statistica 17.0. Характер розподілу визначали за допомогою критерію Колмогорова-Смирнова. Достовірність різниці між показниками оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу). Критичний рівень значення був прийнятий за  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Застосування гентаміцину протягом 6 днів

привело до порушення морфофункціонального стану нирок з розвитком токсичної нефропатії, яка проявлялася зниженням ШКФ на 73,3 % та розвитком вираженої протеїнурії, що перевищувала контрольні значення на 88,2 % (табл. 1). Застосування трипептиду EDL привело до зростання ШКФ на 65 %, тетрапептиду AEDG – 70 % ( $p < 0,01$ ), у той час як використання трипептиду AED не викликало достовірного збільшення показника. Усі пептиди достовірно знижували екскрецію білка з сечею: пептиди EDL та AEDG – на 83 % ( $p < 0,01$ ), AED – на 43 % ( $p < 0,05$ ). Токсичне ураження проксимальних канальців нирок привело до порушення реабсорбційної функції, що зумовило значну втрату іонів із сечею: екскреція натрію зросла на 67,6 %, калію – на 78,8 %. Застосування пептидів достатньою мірою компенсувало дані порушення, що проявлялося в зменшенні екскреції іонів натрію на 82 % (EDL), 58,5 % (AED) та 85,4 % (AEDG), у калійзберігаючій дії – зменшенні екскреції іона на 56,4 % та 48,2 % при застосуванні EDL та AEDG відповідно порівняно з групою нелікованих тварин з нефропатією.

Як відомо, токсичне ураження нирок супроводжується розвитком локального оксидативного стресу, що є важливою патогенетичною ланкою розвитку та прогресування патології. Тому для

Таблиця 1

**Функціональний стан нирок щурів при застосуванні олігопептидів на тлі розвитку гентаміцинової нефропатії,  $M \pm SD$**

Показник	Контроль	Гентаміцинова нефропатія	Гентаміцин + EDL	Гентаміцин + AED	Гентаміцин + AEDG
Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв	470,8 ± 52,9	125,6 ± 29,7 $p_1 \leq 0,01$	358,6 ± 63,5 $p_2 \leq 0,01$	218,5 ± 52,9	411,8 ± 42,3 $p_2 \leq 0,01$
Екскреція білка, мг/100 мкл	0,022 ± 0,010	0,186 ± 0,020 $p_1 \leq 0,01$	0,032 ± 0,003 $p_2 \leq 0,01$	0,106 ± 0,020 $p_2 \leq 0,05$	0,032 ± 0,110 $p_2 \leq 0,01$
Екскреція Na <sup>+</sup> , мкмоль/100 мкл	0,80 ± 0,14	6,02 ± 0,48 $p_1 \leq 0,01$	1,08 ± 0,25 $p_2 \leq 0,01$	2,50 ± 0,65 $p_2 \leq 0,01$	0,88 ± 0,13 $p_2 \leq 0,01$
Екскреція K <sup>+</sup> , мкмоль/100 мкл	6,89 ± 0,66	32,47 ± 8,49 $p_1 \leq 0,01$	14,16 ± 1,75 $p_2 \leq 0,01$	25,43 ± 4,01	16,82 ± 2,61 $p_2 \leq 0,01$

Примітка. Тут і в табл. 2:  $p_1$  – показник достовірності різниці з групою контролю;  $p_2$  – показник достовірності різниці з групою гентаміцинової нефропатії.

оцінки захисної дії препаратів необхідно встановити характер їхнього впливу на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в ураженому органі. Курсове введення гентаміцину призвело до посилення процесів пероксидації, про що свідчить майже дворазове зростання вмісту МДА та ОМБ у тканині нирок, що поряд із пригніченням активності ГП у 2,8 разу та КАТ у 2,2 разу вказує на порушення цієї рівноваги (табл. 2). Виражене пригнічення вільнорадикального окиснення спостерігалось як при застосуванні пептиду EDL, який зменшував уміст МДА у 1,7 разу, ОМБ у 1,6 разу порівняно із групою патології, так і при застосуванні AEDG, який зменшував дані показники в 1,3 та 1,6 разу відповідно. Трипептид AED зменшував уміст МДА у 1,2 разу, ОМБ у 1,3 разу. У всіх групах лікованих тварин спостерігали зростання активності ГП у 1,7, 1,3 та 1,5 разу відповідно в III–V групах. Подібну тенденцію спостерігали за впливу олігопептидів на активність КАТ, яка зростала в 1,7 разу в III та V групах тварин, та в 1,5 разу в IV групі.

Для верифікації наявності нефропротекторної активності олігопептидів було проведено морфологічне дослідження з вивчення змін гістоструктури нирок.

Токсична дія гентаміцину характеризується некрозом значної кількості

епітеліоцитів звивистих каналців нирок, який охоплює  $69,0 \pm 2,4$  % клітин, решта епітеліоцитів – з ознаками гідропічної вакуолізації, що відображає значний ступінь ушкодження нефронів. Просвіти каналців та збірних трубочок в основному заповнені білковими циліндрами, решта каналців та трубочок – розширені. Спостерігається нерівномірне повнокров'я та набряк клубочків (рис. 1).

На тлі застосування пептиду EDL некротичних змін клітин не виявили, спостерігали зворотне набухання епітеліоцитів проксимальних каналців нирок переважно у вигляді гідропічного набухання з поширеністю на  $80,0 \pm 1,8$  % клітин, клубочки – незмінені (рис. 2).

При застосуванні AED за умов розвитку гентаміцинової нефропатії виявлено обмеження розповсюдження некротичних процесів до  $48,0 \pm 2,1$  % епітеліоцитів каналців нирок, решта епітеліоцитів – з ознаками гідропічної вакуолізації. Просвіти каналців та збірних трубочок розширені та переважно заповнені білковими циліндрами (рис. 3).

Виражений захисний ефект також виявлено при застосуванні пептиду AEDG: за відсутності некрозу спостерігається зворотне гідропічне набухання епітеліоцитів проксимальних каналців нирок з поширеністю на  $91,0 \pm 1,3$  % клітин, набряк клубочків (рис. 4).

Таблиця 2

**Показники стану прооксидантно-антиоксидантних процесів у тканині нирок щурів при застосуванні олігопептидів за умов гентаміцинової нефропатії,  $M \pm SD$**

Показник	Контроль	Гентаміцинова нефропатія	Гентаміцин + EDL	Гентаміцин + AED	Гентаміцин + AEDG
Активність глутатіонпероксидази, нмоль/хв · мг	149,34 ± 2,40	53,59 ± 2,50 $p_1 \leq 0,01$	88,51 ± 11,80 $p_2 \leq 0,01$	68,32 ± 3,70 $p_2 \leq 0,01$	78,48 ± 8,90 $p_2 \leq 0,01$
Активність каталази, мкмоль $H_2O_2$ /хв · мг	7,85 ± 0,08	3,65 ± 0,17 $p_1 \leq 0,01$	6,34 ± 0,07 $p_2 \leq 0,01$	5,38 ± 0,14 $p_2 \leq 0,01$	6,11 ± 0,19 $p_2 \leq 0,01$
Вміст малонового діальдегіду, мкмоль/г	19,08 ± 1,69	36,85 ± 1,56 $p_1 \leq 0,01$	21,68 ± 1,93 $p_2 \leq 0,01$	30,29 ± 0,88 $p_2 \leq 0,05$	27,33 ± 1,79 $p_2 \leq 0,01$
Вміст окисно-модифікованих білків, у.о./мл	9,07 ± 0,38	17,03 ± 0,36 $p_1 \leq 0,01$	10,96 ± 0,31 $p_2 \leq 0,01$	13,33 ± 0,43 $p_2 \leq 0,05$	10,09 ± 0,34 $p_2 \leq 0,01$

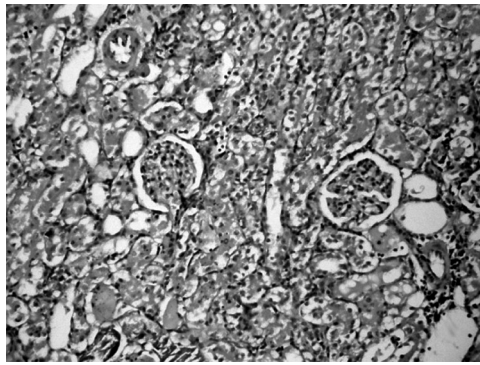


Рис. 1. Препарат нирки щура з гентаміциною нефропатією. Гематоксилін і еозин,  $\times 100$ .

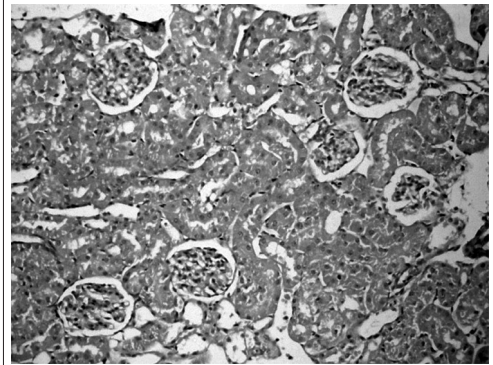


Рис. 2. Препарат нирки щура з гентаміциною нефропатією, якому вводили EDL. Гематоксилін і еозин,  $\times 100$ .

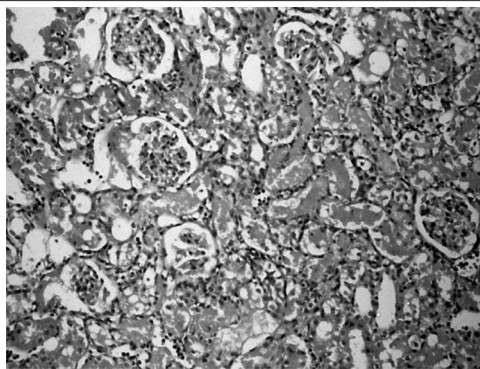


Рис. 3. Препарат нирки щура з гентаміциною нефропатією, якому вводили AED. Гематоксилін і еозин,  $\times 100$ .

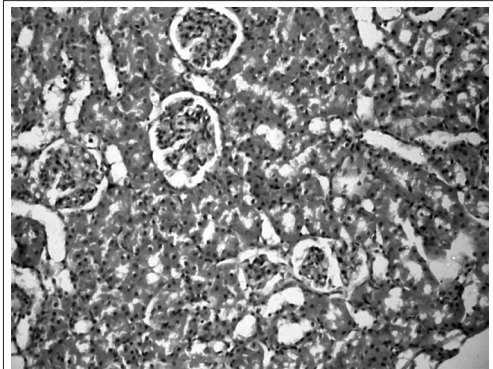


Рис. 4. Препарат нирки щура з гентаміциною нефропатією, якому вводили AEDG. Гематоксилін і еозин,  $\times 100$ .

Результати проведеного дослідження вказують на наявність нефропротекторної активності обраних пептидів, яка реалізувалася в покращанні екскреторної функції нирок за рахунок достовірного зростання ШКФ та зменшення екскреції білка, іонів натрію та калію під впливом пептидів EDL та AEDG. Корируючий вплив обох пептидів був виражений рівною мірою, на що вказує відсутність достовірних міжгрупових відмінностей за критерієм Краскела-Уолліса. Дещо слабший ефект виявлено при застосуванні пептиду AED, який достовірно зменшував тільки показники екскреції білка та іонів натрію. Найвираженіші антиоксидантні властивості встановлені в пептиду EDL, який більшою мірою, порівняно з іншими пептидами, сприяв зменшенню вмісту МДА та збереженню активності ГП у тканині нирок. За впливом на показники активності КАТ та вмісту ОМБ ефективність пептидів EDL та AEDG є рівнозначною, у

той час як пептид AED діяв менш виражено.

#### Висновок

Курсове застосування органоспецифічних пептидів сприяло захисту ниркової тканини від токсичної дії гентаміцину, що проявлялося в покращанні під їхнім впливом функціонального стану нирок, обмеженні процесів пероксидації ліпідів та підвищенні активності ферментів антиоксидантного захисту. Нефропротекторний вплив застосованих олігопептидів підтверджується даними гістологічного дослідження, які корелюють з результатами біохімічних досліджень: введення пептиду AED призвело до обмеження розповсюдженості некротичних та дистрофічних процесів, у той час як при застосуванні пептидів EDL і AEDG некрозу епітеліоцитів не виявлено, патологічні зміни клітин представлені гідропічним набуханням, поширеність якого менш виражена при застосуванні EDL.



1. A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the KDIGO clinical practice guidelines on acute kidney injury / D. Fliser, M. Laville [et al.] // *Nephrol Dial Transplant.* – 2012. – V. 27. – P. 4263–4272.
2. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin / Y. Quiros, L. Vicente-Vicente, A. I. Morales [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2011. – V. 119 (2). – P.245–256.
3. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research / B. H. Ali, M. Al Za'abi, G. Blunden [et al.] // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2011. – V. 109 (4). – P. 225–232.
4. Reno-protective role of flunarizine against gentamicin induced nephrotoxicity in rats / A. Muthuraman, S. Singla, A. Rana [et al.] // *Yakugaku Zasshi.* – 2011. – V. 131 (3). – P. 437–443.
5. *Balakumar P.* Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? / P. Balakumar, A. Rohilla, A. Thangathirupathi // *Pharmacol Res.* – 2010. – V. 62 (3). – P. 179–186.
6. Пептиды регулируют экспрессию сигнальных молекул в клеточных культурах почек при старении *in vitro* / В. Х. Хавинсон, Н. С. Линькова, В. О. Полякова [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2014. – № 2. – С. 227–230.
7. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции старения / В. Х. Хавинсон, А. Ю. Соловьёв, Д. В. Жилинский [и др.] // *Успехи геронтологии.* – 2012. – Т. 25, № 1. – С. 11–22.
8. *Хавинсон В. Х.* Роль пептидов в эпигенетической регуляции активности генов в онтогенезе / В. Х. Хавинсон, В. В. Малинин, Б. Ф. Ванюшин // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2011. – № 10. – С. 452–457.
9. Методи експериментального моделювання ураження нирок при фармакологічних дослідженнях / С. Ю. Штриголь, В. М. Лісовий, І. А. Зупанець [та ін.]. – К., 2009. – С. 9–10.
10. *Камышников В. С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – М., 2009. – 880 с.

**Т. С. Щудрова, І. І. Заморський**

### **Порівняльна оцінка нефропротекторної активності органоспецифічних пептидів при гентаміциновій нефропатії в щурів**

*Мета дослідження* – вивчення та порівняння нефропротекторних ефектів органоспецифічних олигопептидів при гентаміциновій нефропатії в щурів.

Комплексний нефропротекторний вплив оцінювали за показниками функціонального стану нирок, прооксидантно-антиоксидантного балансу в тканині нирок, а також на основі вивчення гістоструктури нирок тварин.

Застосування гентаміцину протягом 6 днів призвело до розвитку олігуричної форми токсичної нефропатії. При введенні EDL швидкість клубочкової фільтрації зросла на 65 %, AEDG – на 70 %. Усі пептиди достовірно знижували екскрецію білка з сечею: пептиди EDL та AEDG – на 83 %, AED – на 43 %. Ураження проксимальних канальців нирок зумовило зростання екскреції натрію та калію із сечею. Застосування пептидів компенсувало дані порушення, що проявлялося в зменшенні екскреції іонів натрію на 82 % (EDL), 58,5 % (AED) та 85,4 % (AEDG) та калійзберігаючій дії пептидів EDL та AEDG. Під впливом гентаміцину спостерігалося зростання вмісту МДА та ОМБ у тканині нирок та пригнічення активності ГП та КАТ. Пептид EDL зменшував вміст МДА у 1,7 разу, ОМБ – у 1,6 разу, AEDG зменшував дані показники в 1,3 та 1,6 разу, пептид AED – у 1,2 та 1,3 разу відповідно. У всіх групах лікованих тварин спостерігали достовірне зростання активності ГП та КАТ. Токсична дія гентаміцину призвела до некрозу  $69,0 \pm 2,4$  % епітеліоцитів канальців нирок, решта клітин – з ознаками гідропічної вакуолізації, просвіти канальців та збірних трубочок заповнені білковими циліндрами. На тлі застосування пептидів EDL та AEDG некротичних змін клітин не виявлено, гідропічне набухання охоплює  $80,0 \pm 1,8$  % та  $91,0 \pm 1,3$  % клітин відповідно. При застосуванні AED виявлено обмеження розповсюдження некротичних процесів до  $48,0 \pm 2,1$  % епітеліоцитів канальців.

Курсове застосування органоспецифічних пептидів сприяло захисту ниркової тканини від токсичної дії гентаміцину, що проявлялося в покращанні функціонального стану нирок та антиоксидантному ефекті. Нефропротекторний вплив підтверджується даними гістологічного дослідження, з більш вираженим позитивним ефектом пептидів EDL та AEDG.

*Ключові слова:* нефропротекція, пептиди, гентаміцинова нефропатія

**Т. С. Щудрова, И. И. Заморский**

### **Сравнительная оценка нефропротекторной активности органоспецифических пептидов при гентамициновой нефропатии у крыс**

*Цель исследования* – изучение и сравнение нефропротекторных эффектов органоспецифических олигопептидов при гентамициновой нефропатии у крыс.

Нефропротекторное влияние олигопептидов оценивали по комплексу показателей функционального состояния почек, прооксидантно-антиоксидантного баланса в ткани почек, а также на основе изучения гистоструктуры почек животных.

---

Применение гентамицина на протяжении 6 дней привело к развитию олигурической формы токсической нефропатии. При введении EDL скорость клубочковой фильтрации возросла на 65 %, AEDG – на 70 %. Все пептиды достоверно понижали экскрецию белка с мочой: пептиды EDL и AEDG – на 83 %, AED – на 43 %. Поражение проксимальных канальцев обусловило возрастание экскреции натрия и калия с мочой. Применение пептидов компенсировало данные нарушения, что проявлялось в снижении экскреции ионов натрия на 82 % (EDL), 58,5 % (AED) и 85,4 % (AEDG) и калийсберегающем действии пептидов EDL и AEDG. Под влиянием гентамицина наблюдали увеличение содержания МДА и ОМБ в ткани почек, а также угнетение активности ГП и КАТ. Пептид EDL снижал содержание МДА в 1,7 раза, ОМБ – у 1,6 раза, AEDG уменьшал данные показатели в 1,3 и 1,6 раза, пептид AED – в 1,2 и 1,3 раза соответственно. Токсическое действие гентамицина привело к некрозу  $69,0 \pm 2,4$  % эпителиоцитов канальцев почек, остальные клетки – с признаками гидропической вакуолизации, просветы канальцев и собирательных трубочек заполнены белковыми цилиндрами. На фоне применения пептидов EDL и AEDG некротических изменений не выявлено, гидропическое набухание охватывает  $80,0 \pm 1,8$  % и  $91,0 \pm 1,3$  % клеток соответственно. При применении AED выявлено ограничение некротических процессов до  $48,0 \pm 2,1$  % эпителиоцитов канальцев.

Курсовое применение органоспецифических пептидов способствовало защите почечной ткани от токсического действия гентамицина, что проявлялось улучшением функционального состояния почек и антиоксидантным эффектом. Нейропротекторное влияние подтверждается данными гистологического исследования, с более выраженным эффектом пептидов EDL и AEDG.

*Ключевые слова: нефропротекция, пептиды, гентамициновая нефропатия*

**T. S. Shchudrova, I. I. Zamorskii**

### **Comparative assessment of the nephroprotective activity of organospecific peptides in rats with gentamicin nephropathy**

*The aim of the study was to compare the nephroprotective effects of organospecific peptides in rats with gentamicin nephropathy.*

The nephroprotective influence was determined using the indices of the functional state of kidneys, prooxidant-antioxidant balance in kidney tissue and on the base of histological study of rats' kidneys tissues.

Gentamicin administration during 6 days resulted in the development of oligouric form of toxic nephropathy. EDL increased glomerular filtration rate by 65 %, AEDG – by 70 %. All peptides significantly decreased urinary protein excretion: EDL and AEDG – by 83 %, AED – by 43 %. Proximal tubules injury caused an increase in urine sodium and potassium excretion. Administration of peptides compensated this disturbances, manifested in decrease of sodium excretion by 82 % (EDL), 58,5 % (AED) and 85,4 % (AEDG) and potassium sparing action of peptides EDL and AEDG. An increase of MDA and OMP content in kidney tissue along with inhibition of GPx and CAT activity under the influence of gentamicin was observed. Peptide EDL decreased MDA content by 1,7 times, OMP – by 1,6 times, AEDG decreased these indices by 1,3 and 1,6 times, peptide AED – by 1,2 and 1,3 times, respectively. A significant increase of GPx and CAT activity was observed in all groups of treated animals. Toxic action of gentamicin caused the necrosis of  $69,0 \pm 2,4$  % of tubular epitheliocytes, the rest of cells were without the signs of the hydroptic vacuolization, lumens of the tubules and collecting ducts are filled with protein casts. The peptides EDL and AEDG administration did not produced necrotic lesions of cells but led to hydroptic swelling involved  $80,0 \pm 1,8$  % and  $91,0 \pm 1,3$  % of cells, respectively. In case of AED administration a restriction of necrotic processes in tubular epitheliocytes up to  $48,0 \pm 2,1$  % was identified.

In conclusion, the course of peptides treatment contributed to protection of kidney tissue from toxic action of gentamicin and manifested in amelioration of functional state of kidneys and antioxidant effect. Nephroprotective action of peptides is confirmed by histological studies with more significant effect for EDL and AEDG peptides.

*Key words: nephroprotection, peptides, gentamicin nephropathy*

*Надійшла: 17.11.2014 р.*

---

**Контактна особа:** Щудрова Тетяна Сергіївна, аспірант, кафедра фармакології, Буковинський державний медичний університет, буд. 57/52, вул. Героїв Майдану, м. Чернівці, 58029.  
Тел.: + 38 0 50 665 24 28. Електронна пошта: tshchudrova@gmail.com