

"Українська медична стоматологічна академія"; +38 095 547-91-05; suhomlyn1981@mail.ru

Непорада Каріне Степанівна - д. мед. н., професор, завідувач кафедри медичної, біологічної та біоорганічної хімії ВДНЗ України "Українська медична стоматологічна академія"; +38 05322 2-57-22

Берегова Тетяна Володимирівна - д. біол. н., професор, завідувач науково-дослідною лабораторією "Фармакології і експериментальної патології"; +38 044 526-03-27

© Щудрова Т.С., Заморський І.І.

УДК: 615.3:547.964.4:616.61-008.64-008.9

Щудрова Т.С., Заморський І.І.

Буковинський державний медичний університет, кафедра фармакології (Театральна пл., 2, м. Чернівці, Україна, 58002)

## ВПЛИВ ОРГАНСПЕЦИФІЧНИХ ПЕПТИДІВ НА ПРОТЕОЛІТИЧНУ ТА ФІБРИНОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ У НИРКАХ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ РАБДОМІОЛІТИЧНОЇ ГОСТРОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

**Резюме.** Досліджено стан протеолізу та фібринолізу у тканині нирок щурів при введенні органоспецифічних пептидів за умов розвитку рабдоміолітичної гострої ниркової недостатності. Встановлено, що застосування пептидів нормалізує стан фібринолітичної та протеолітичної активності нирок щурів. Більш виражений ефект спостерігається при застосуванні ниркових пептидів, що вказує на їх тканинспецифічну дію.

**Ключові слова:** гостра ниркова недостатність, органоспецифічні пептиди, протеоліз, фібриноліз.

### Вступ

Протеоліз є особливою формою фізіологічної регуляції. Обмежений протеоліз є універсальним механізмом, відповідальним за утворення та модифікацію гормонів, ферментів, фізіологічно активних пептидів. Реакції обмеженого протеолізу лежать в основі активації згортання крові та фібринолізу, функціонування ренін-ангіотензин-альдостеронової та калікреїн-кінінової системи, імунітету, комплементу, апоптозу. Внутрішньоклітинний протеоліз - це регульований процес, необхідний для нормального клітинного гомеостазу. Підтримка цього балансу включає елімінацію ушкоджених білків, контроль регуляторних процесів та постачання амінокислот для ремоделювання клітини [Debigare, Price, 2003]. Серед неспецифічних механізмів, які лежать в основі патогенезу багатьох захворювань, є розлади узгодженості функціонування активаторів та інгібіторів протеолітичної системи. Зміщення рівноваги між деградацією та синтезом внутрішньоклітинних білків призводить до порушення стабільності клітини та функціонування білкових систем регуляції транскрипції та метаболізму. Більшість внутрішньоклітинних та деякі мембранні білки розщеплюються АТФ-залежною убіквітин-протеасомною системою (УПС) [Lecker, Mitch, 2011]. УПС видаляє білки, ушкоджені мутаціями, денатурацією чи внаслідок вільнорадикального окислення. У клітинах нирок УПС відіграє важливу роль, контролюючи вміст регуляторних білків [Rajan, Mitch, 2008], а при патологічних станах регулює кількість епітеліальних натрієвих каналів, продукцію еритропоетину. Дисрегуляція системи протеолізу при ішемічному ураженні нирок призводить до деградації специфічних білків та патологічних наслідків, а при хронічних захворюваннях нирок активує тубулоінтерстиційне запалення та фіброгенез [Lecker, Mitch, 2011].

Фібринолітична система забезпечує спонтанний асептичний лізис фібрину і запобігає внутрішньосудин-

ному тромбоутворенню. Основою тканинної фібринолітичної активності нирок є урокіназа, яка продукується юкстагломерулярним апаратом і проксимальним відділом нефрону. Внаслідок пошкодження проксимального відділу нефрону є ймовірною можливість зниження фібринолітичної активності нирок [Хоменко, 2013].

Гостре ураження нирок внаслідок рабдоміолізу займає 7 - 10% у загальній структурі гострої ниркової недостатності [Bosch et al., 2009]. До механізмів рабдоміолітичного ураження нирок відносяться ушкодження гломерулярної фільтрації внаслідок внутрішньоренальної вазоконстрикції, пряме та ішемічне пошкодження каналців, тубулярна обструкція. На рівні дистальних каналців відбувається преципітація міоглобіну та обструкція просвіту. Міоглобін проявляє пряму токсичну дію на рівні проксимальних каналців, що призводить до гострого тубулярного некрозу. Вивільнення тромбопластину зі змертвілих клітин призводить до каскаду внутрішньосудинного згортання крові та формуванню тромбів у ренальній паренхімі.

Ендогенні пептиди, присутні у цито- та нуклеоплазмі різних тканин, є продуктами обмеженого протеолізу ядерних білків у протеасомах. Ці олігопептиди здатні комплементарно зв'язуватись з певними короткими послідовностями нуклеотидів у ланцюгах ДНК, що призводить до ініціації транскрипції. Ці олігопептиди володіють широким спектром біологічної дії, впливають на процеси клітинного росту та розвитку, координують функції багатоклітинних систем [Хавинсон, Солов'єв, 2012]. Встановлено, що олігопептид епіталон стимулює експресію генів плазміногену, тканинного активатора плазміногену та урокінази, що призводить до посилення та нормалізації фібринолізу при різноманітних захворюваннях. При гіперкоагуляції епіталон посилює

експресію генів природних антикоагулянтів [Кузник, 2013; Хавинсон и др., 2011].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу органоспецифічних пептидів на протеолітичну та фібринолітичну активність тканини нирок щурів за умов розвитку рабдоміолітичної гострої ниркової недостатності (ГНН). Для дослідження було обрано пептидні препарати, розроблені у Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології РАН: поліпептидний екстракт нирок, синтезовані на його основі трипептиди Т-31 (Ala-Glu-Asp) та Т-35 (Glu-Asp-Leu), а також тетрапептид епіфізу епіталон (Ala-Glu-Asp-Gly).

### Матеріали та методи

Досліди проведено на 42 статовозрілих нелінійних білих щурах масою 180 - 220 г. Тварин було розподілено на 6 груп (n=7): I група - контрольна, II група - модельна патологія. Тварини III групи отримували пептидний екстракт нирок у дозі 300 мкг/кг, IV групи - олігопептид Т-35 у дозі 3 мкг/кг, V групи вводили олігопептид Т-31 у дозі 3 мкг/кг, VI групи - тетрапептид епіталон у дозі 7 мкг/кг. Досліджувані речовини вводили внутрішньочеревно 1 раз на добу протягом 7 днів з наступним моделюванням ГНН шляхом одноразового внутрішньом'язового введення 50% розчину гліцеролу в дозі 8 мл/кг. Евтаназію тварин здійснювали на 24 год. розвитку ГНН шляхом декапітації під ефірною анестезією у відповідності до положень "Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою" (Страсбург, 1986). Протеолітичну активність визначали за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколу. Принцип методу полягає у тому, що при інкубації білкових азосполук у присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться в тканинах, відбувається лізис низькомолекулярних білків (ЛНМБ), лізис високомолекулярних білків (ЛВМБ) та лізис колагену, інтенсивність

якого оцінюється фотоколориметрично. Фібринолітичну активність досліджували за лізисом азофібрину, при цьому визначали сумарну (СФА), неферментативну (НФА) та ферментативну фібринолітичну активність (ФФА) [Магальяс, Міхеєв, 2001]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS Statistics 17.0. Достовірність різниці між показниками оцінювали з використанням параметричного t-критерію Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричного U-критерію Манна-Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу). Критичний рівень значення був прийнятий за  $p \leq 0,05$ .

### Результати. Обговорення

Розвиток ГНН супроводжувався зниженням СФА тканини нирок за рахунок значного зниження ФФА у 4,5 рази порівняно з показниками контролю, що є провокуючим фактором розвитку уротромбозу та погіршення фільтраційної здатності нирок (табл. 1). Введення поліпептидного екстракту нирок достовірно збільшило ФФА в тканині нирок у 7,2 рази, а введення олігопептидів Т-35, Т-31 та епіталону збільшило цей показник у 6,0, 6,9 та 4,6 рази відповідно. Покращення ФФА призвело до достовірного збільшення СФА в 1,5 рази у III та VI групах щурів, в 1,7 рази - у IV та V групах дослідних тварин порівняно з групою тварин з модельною патологією. Це, можливо, пов'язано із захисним впливом пептидів на клітини проксимальних каналців та збереженням синтезу урокінази.

Введення пептидних препаратів впливало на стан протеолізу у тканині нирок. Розвиток ГНН супроводжувався пригніченням лізису колагену у 1,4 рази, що є патогенетичним фактором хронізації патологічного процесу у нирках. Також спостерігалось виражене пригнічення ЛНМБ у 1,9 рази. Застосування екстракту нирок призвело до посилення ЛНМБ та лізису колагену у 1,2 рази. Олігопептид Т-35 достовірно збільшував дані

**Таблиця 1.** Стан фібринолізу та протеолізу в тканині нирок щурів при введенні органоспецифічних пептидів за умов розвитку гліцеролової ГНН ( $\bar{x} \pm S_x$ , n=7).

Показник	Контроль	Модельна патологія (ГНН)	ГНН+екстракт нирок	ГНН+Т-35	ГНН+Т-31	ГНН+епіталон
СФА, Е440/год, х мг тк	15,60±0,96	11,96±0,06 $p_1 \leq 0,05$	17,94±1,56 $p_2 \leq 0,05$	19,90±1,46 $p_2 \leq 0,05$	20,70±1,38 $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,01$	19,00±1,41 $p_2 \leq 0,05$
НФА Е440/год, х мг тк	10,16±0,90	10,80±0,48	9,60±0,86	13,70±1,06	12,70±0,23	12,90±0,23
ФФА Е440/год, х мг тк	5,24±0,89	1,16±0,13 $p_1 \leq 0,05$	8,34±0,20 $p_2 \leq 0,01$	7,00±1,52 $p_2 \leq 0,05$	8,00±1,87 $p_2 \leq 0,01$	5,30±1,00 $p_2 \leq 0,05$
ЛНМБ, мкг азоальбуміну/ мг тканини/год	37,60±1,66	19,92±0,83 $p_1 \leq 0,01$	23,98±0,12 $p_2 \leq 0,05$	37,70±1,10 $p_2 \leq 0,05$	42,50±2,89 $p_2 \leq 0,01$	34,76±1,72 $p_2 \leq 0,05$
ЛВМБ, мкг азоказеїну/ мг тканини/год	15,17±1,39	14,00±0,68	18,17±0,95	17,33±1,78	18,50±0,75	16,33±0,63
Лізис колагену мкг азоколу/ мг тканини/год	1,63±0,11	1,19±0,06 $p_1 \leq 0,05$	1,44±0,05 $p_2 \leq 0,05$	2,25±0,16 $p_2 \leq 0,01$	2,28±0,21 $p_2 \leq 0,01$	1,51±0,07 $p_2 \leq 0,05$

**Примітки:**  $p_1$  - показник вірогідності різниці порівняно з даними контролю;  $p_2$  - показник вірогідності різниці порівняно з модельною патологією.

показники в 1,9 рази. Введення Т-31 також збільшувало ЛНМБ та колагену в 2,1 та 1,9 рази відповідно, порівняно з групою модельної патології. Епіталон посилював ЛНМБ у 1,7 рази, лізис колагену - в 1,3 рази. В усіх групах тварин, яким вводили органоспецифічні пептиди, спостерігалась тенденція до збільшення протеолітичної активності тканини нирок по відношенню до високомолекулярних білків.

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. Отримані результати свідчать про здатність органоспецифічних пептидів нормалізувати фібринолітич-

ну та протеолітичну активність в нирках при рабдоміолітичній ГНН.

2. Більш виражений ефект спостерігається при засотуванні ниркових олігопептидів, що вказує на тканиноспецифічність їх дії. Захисний вплив органоспецифічних пептидів підтверджується нашими попередніми дослідженнями, які доводять покращення функціонального стану нирок щурів, прооксидантно-антиоксидантного балансу в умовах розвитку гліцеролової моделі ГНН [Щудрова, Заморський, 2013].

У перспективі планується вивчення впливу органоспецифічних пептидів на функціональний стан нирок на різних моделях гострої ниркової недостатності.

### Список літератури

- Кузник Б. И. Эпигенетические механизмы действия дипептида Lys-Glu и тетрапептида Ala-Glu-Asp-Gly на фибринолитическую активность крови / Б. И. Кузник, В. Х. Хавинсон, С.И. Гарновская // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2013. - № 4 (56). - С. 40 - 48.
- Магальяс В. М. Сучасні методи експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / [Магальяс В. М., Міхеев А. О., Роговий Ю. Є. та ін.]. - Чернівці, 2001. - 42 с.
- Хавинсон В. Х. 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.
- Хавинсон В. Х. Эпигенетическое действие пептидов Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly на состояние системы гемостаза / В. Х. Хавинсон, Б. И. Кузник // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2013. - №3 (55). - С. 26 - 35.
- Хоменко В. Г. Хроноритмічні зміни функціональної активності нирок при патології / В. Г. Хоменко // Бук. мед. вісник. - 2013. - № 2 (66). - С. 178- 181.
- Щудрова Т. С. Влияние некоторых синтетических олигопептидов на активность свободнорадикальных процессов при острой почечной недостаточности / Т. С. Щудрова, И. И. Заморский // Акт. проб. гум. и ест. наук. - 2013. - № 12 (59). - С. 98 - 100.
- Bosch X. Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury / X. Bosch, E. Poch, J. Grau // N. Engl. J. Med. - 2009. - Vol. 361. - P. 62 - 72.
- Debigare R. Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system, and renal diseases / R. Debigare, S. Price // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. - 2003. - Vol. 285. - P. F1 - F8.
- Lecker S. Proteolysis by the Ubiquitin-Proteasome System and Kidney Disease / S. H. Lecker, W. E. Mitch // J. Am. Soc. Nephrol. - 2011. - Vol. 22. - P. 821 - 824.
- Rajan V. Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease / V. Rajan, W. E. Mitch // Biochimica et Biophysica Acta. - 2008. - Vol. 1782. - P. 795 - 799.

*Щудрова Т.С., Заморський І.І.*

### ВЛИЯНИЕ ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В ПОЧКАХ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ РАБДОМИОЛИТИЧЕСКОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

**Резюме.** Исследовано состояние протеолиза и фибринолиза в ткани почек крыс при введении органоспецифических пептидов в условиях развития рабдомиолитической острой почечной недостаточности. Установлено, что применение пептидов нормализует состояние фибринолитической и протеолитической активности почек крыс. Более выраженный эффект наблюдается при применении почечных пептидов, что указывает на их тканеспецифическое действие.

**Ключевые слова:** острая почечная недостаточность, органоспецифические пептиды, фибринолиз, протеолиз.

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

### THE INFLUENCE OF THE ORGANSPECIFIC PEPTIDES ON THE PROTEOLYTIC AND FIBRINOLYTIC ACTIVITY IN KIDNEYS UNDER THE CONDITIONS OF RHABDOMYOLYTIC ACUTE KIDNEY FAILURE

**Summary.** The state of proteolysis and fibrinolysis of the rats' kidneys under the conditions of rhabdomyolytic acute kidney failure and use of organospecific peptides was studied. It was estimated that use of peptides normalizes state of fibrinolytic and proteolytic activity of the rats' kidneys. More significant effect is observed when using kidney peptides, which indicates on their tissue specific action.

**Key words:** acute kidney failure, organospecific peptides, fibrinolysis, proteolysis.

Стаття надійшла до редакції 28.05.2014р.

Щудрова Тетяна Сергіївна - аспірант кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету; +38 050 665-24-28; tshchudrova@gmail.com  
Заморський Ігор Іванович - д. мед. н., професор, зав. кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету