

у легенях. Було з'ясовано що у 1-шу добу формування ЕАА й АУМ активність СОД у легенях зростає на 10,6 % ($p < 0,05$) щодо першої групи тварин. Пізніше, на 7-му, 14-ту і 24-ту добу розвитку ЕАА й АУМ відбуваються протилежні зміни щодо активності СОД. Вона була зниженою відповідно на 24,2 % ($p < 0,05$), 29,6 % ($p < 0,05$) і 43,6 % ($p < 0,05$), що дає підставу стверджувати про депресію АОС (див. рис. 1).

Визначення активності КТ у легенях при ЕАА й АУМ показало зростання цього ферменту на 23,5 % ($p < 0,05$) на 1-шу добу експерименту та подальше зниження на 33,7 % ($p < 0,05$), 37,6 % ($p < 0,05$) і 58,6 % ($p < 0,05$) відповідно на 7-му, 14-ту і 24-ту добу порівняно з контролем (див. рис. 1). Одержані дані свідчать спочатку (1-ша доба) про компенсаторну функцію антиоксидантного захисту, а надалі про його виснаження.

Застосування тіотриазоліну впродовж 10 днів приводило до зниження вмісту ДК на 43,6 % ($p < 0,05$) і МДА на 40,9 % ($p < 0,05$) та підвищення активності СОД на 57,8 % ($p < 0,05$) і КТ на 92,6 % ($p < 0,05$) порівняно з групою морських свинок із ЕАА й АУМ без використання цього препарату, що доводить

його коригувальну дію на зазначені показники.

Таким чином, вивчення показників ВРО й АОС у легенях самців показало підвищення вмісту ДК і МДА та зниження активності СОД і КТ, особливо на 14-ту і 24-ту добу експерименту, що дає можливість стверджувати про розвиток оксидантного стресу при ЕАА й АУМ.

Одержані результати досліджень дозволяють зробити висновки про те, що антиоксидант тіотриазолін має коригувальний вплив на рівень утворення продуктів ПОЛ (ДК і МДА) й активність АОС (КТ і СОД) за умов розвитку АА й АУМ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца. – К. : Здоровье, 1989. – С. 170–171.
2. Орехов О. О. Патоморфология легких и микроциркуляторного русла малого круга кровообращения при хроническом экспериментальном аллергическом альвеолите / О. О. Орехов, Ю. А. Кириллов // Архив патологии. – 1985. – № 10. – С. 54–61.
3. Регада М. С. Алергічні захворювання легень : монографія / М. С. Регада. – Львів, 2009. – 342 с.
4. Коробейникова Э. Н. Модификация определения продуктов ПОЛ в реакции с тиобарбитуровой кислотой / Э. Н. Коробейникова // Лаборатор-

ное дело. – 1989. – № 7. – С. 8–10.

5. Маркова О. О. Миокардиодистрофия и реактивность организма / О. О. Маркова. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1998. – С. 152.

6. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide ifilii / R. Fried // Biochemie. – 1975. – Vol. 57, N 5. – P. 657–660.

7. Holmes R. Epigenetic interconversions of the multiple forms of mouse liver catalase / R. Holms, C. Masters // FEBS Lett. – 1970. – Vol. 11, N 11. – P. 45–48.

REFERENCES

1. Gavrilov V.B., Mishkorudnaya M.I. Spectrophotometric determination of lipid hydroperoxides in plasma. *Laboratnaya diagnostika ishemicheskoi bolezni serdtsa* Kiyev. Zdorovye, 1989, p. 170-171.
2. Orekhov O.O., Kirillov Yu.A. Pathology of lung microvasculature and pulmonary circulation in chronic experimental allergic alveolitis. *Arkhiv Patologii* 1985; 10: 54-61.
3. Regeda M.S. Allergic lung disease. Monography. Lviv, 2009, p. 342.
4. Korobeinikova E.N. Modification of the definition of lipid peroxidation products in the reaction with thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo* 1989; 7: 8-10.
5. Markova O.O. Myocardiodystrophy and reactivity. *Ukrmedkniga, Ternopil*, 1998, p. 152.
6. Fried R. Enzymatik and non-enzymatic assay of superoxide ifilii. *Biochemie* 1975; 57 (5): 657-660.
7. Holmes R., Masters C. Epigenetic interconversions of the multiple forms of mouse liver catalase. *FEES Lett* 1970; 11 (11): 45-48.

Надійшла 4.12.2014

УДК 615.324:577.112.6]:616.61-005.4-08

Т. С. Щудрова, І. І. Заморський

МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ ЗАХИСНОГО ВПЛИВУ ДЕЯКИХ ОЛІГОПЕПТИДІВ ПРИ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ НИРОК

Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

УДК 615.324:577.112.6]:616.61-005.4-08

Т. С. Щудрова, И. И. Заморский

МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ЗАЩИТНОГО ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПОЧЕК

Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина

Исследовано влияние синтетических олигопептидов EDL и AED, синтезированных в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии (Российская Федерация) на основе изучения пептидного состава ткани почек, на течение ишемически-реперфузионной острой почечной недостаточности. Установлено, что олигопептиды проявляют защитное действие по отношению



к нефроцитам, характеризується удешевленням показателів функціонального стану нирок крыс, угнетенням процесів свободнорадикального окислення на фоні активізації антирадикальної захисти, а також підтриманням енергетичного обеспечення кліток. При цьому більше ефекти́вним по степені впливу на все изученные показателі було введення трипептида EDL.

Ключевые слова: олигопептиды, ишемия-реперфузия, нефропротекция.

UDC 615.324:577.112.6]:616.61-005.4-08

T. S. Shchudrova, I. I. Zamorskiy

MECHANISMS OF THE REALIZATION OF PROTECTIVE INFLUENCE OF SOME OLIGOPEPTIDES IN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF KIDNEYS

The Bucovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

The aim of research was to study the nephroprotective activity of oligopeptides AED and EDL, synthesized in the St.-Peterburg Institute of Bioregulation and Gerontology (RF) on a model of ischemia-reperfusion (I/R) kidney injury in rats.

Methods. Animals were randomly divided into 4 groups: I — sham-operated animals, II — modeling of ischemic acute kidney failure (AKF) by clamping of both kidney pedicles for 60 min and 24 h of reperfusion, animals of III and IV groups three days before operation received tripeptides EDL and AED in dose 3 mg/kg.

Results. I/R resulted in development of AKF characterized by a fall in diuresis by 48.8%, 2-fold decrease of creatinine clearance (Cl_{cr}) and severe tubular injury which confirmed by a significant proteinuria, and an increase of fractional excretion of sodium (FE_{Na}) up to 2.16%. Pretreatment with tripeptides decreased the severity of ischemic injury realized in increase of diuresis 1.9 times in case of EDL use and 1.3 times in case of AED treatment, and decrease of protein excretion by 2.4 and 1.7 times, respectively ($p < 0.01$). EDL also significantly decreased Cl_{cr} 2.4 times and FE_{Na} to 0.55%. Development of AKF was accompanied by activation of peroxidation processes in kidney tissue: MDA content increased by 47%, OMP — by 49% along with 2-fold inhibition of GPx activity and CAT activity — by 42%. Pretreatment with EDL increased GPx activity 1.6 times, CAT — 1.5 times, decreased MDA content by 1.3 times and OMP — by 1.2 times ($p < 0.01$). AED pretreatment has shown less significant effect. EDL administration caused an increase in succinate dehydrogenase activity 5.4 times, AED — 3.3 times comparing to untreated animals.

Conclusions. Pretreatment with oligopeptides decreases I/R-caused injury of nephrons, normalizing their functional state and pro-antioxidant balance in kidney tissue with more significant effect of peptide EDL.

Key words: oligopeptides, ischemia-reperfusion, nephroprotection.

Результати багатьох досліджень показують на те, що гостре ураження нирок є розповсюдженим станом, частота виникнення якого постійно зростає й асоціюється зі значним погіршенням якості життя та рівнем смертності [9]. Загальнона поширеність дорівнює у середньому 13–20 % усіх госпіталізованих хворих [6]. Найбільш часто причиною гострої ниркової недостатності (ГНН) є гостра ренальна ішемія-реперфузія, що виникає при шоці, крововтраті, серйозному ушкодженні або трансплантації нирки [10]. Ренальна ішемія призводить до ендотеліальної дисфункції, втрати мікрворсинок щіткової облямівки, дезінтеграції цитоскелета та, як наслідок, порушення функціонального стану нирок, розвитку енергодефіциту, окисного стресу і запалення, що зумовлює підвищення судинної проникності, набряк ендотеліальних клітин із порушенням кровотоку у зв'язку зі стисканням капілярів та оклюзією судин при ре-

перфузії [7; 8]. Зважаючи на розповсюдженість і відсутність ефективних методів корекції ГНН, актуальним є пошук нових препаратів, здатних впливати на основні механізми розвитку цієї патології.

Для дослідження було обрано синтезовані у Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології (Російська Федерація) на основі вивчення пептидного складу тканини нирок трипептиди AED (Ala-Glu-Asp) і EDL (Glu-Asp-Leu), які виявляють тканиноспецифічну регуляторну дію та вивчаються на предмет наявності нефропротекторної активності [5].

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведено на 28 статевозрілих нелінійних білих щурах масою 150–200 г. Тварин було розподілено на 4 групи ($n=7$): I група — контроль (псевдооперовані тварини); II група — модельна ГНН; тваринами III–IV груп протягом

трьох днів до моделювання ГНН вводили трипептиди EDL і AED дозою 3 мг/кг. Ішемію моделювали з дотриманням умов асептики під загальною анестезією (етамінал-натрій, 40 мг/кг): виконували серединну лапаротомію, виділяли кожну нирку, накладаючи на ниркову ніжку затискач із метою перетискання артерії, вени та сечоводу на 60 хв і подальшою герметизацією черевної порожнини. Після видалення затискача черевну порожнину пошарово ушивали з подальшою 24-годинною реперфузією й оцінкою функціонального стану нирок за умов індукованого діурезу [4]. Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації під ефірною анестезією з дотриманням положень «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Функціональний стан нирок щурів оцінювали за показниками діурезу, кліренсу креатиніну (Cl_{cr}),



Вплив трипептидів на функціональний стан нирок щурів за умов розвитку ішемічно-реперфузійної гострої ниркової недостатності, M±SD

| Показник | Контроль | ГНН | ГНН + EDL | ГНН + AED |
|-------------------------------|-------------|---------------|----------------|--------------|
| Діурез, мл | 4,12±0,10 | 2,11±0,14*** | 3,97±0,34### | 2,840±0,010# |
| Cl _{cr} , мкмоль/л | 49,50±5,02 | 24,48±2,29*** | 57,95±10,72### | 37,21±5,28# |
| E _{pr} , мг за 2 год | 0,023±0,010 | 0,064±0,010* | 0,027±0,010# | 0,038±0,010# |
| FE _{Na+} , % | 0,40±0,06 | 2,16±0,38*** | 0,55±0,23### | 1,17±0,23# |

Примітка. * — p<0,05, *** — p<0,001 — достовірні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими в групі контролю; # — p<0,05, ### — p<0,001 — достовірні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими в групі щурів із гострою нирковою недостатністю (статистичний критерій Манна — Уїтні).

екскреції білка (E_{pr}) та фракційної екскреції іонів натрію з сечею (FE_{Na+}) [2]. Активність процесів пероксидації оцінювали за вмістом у тканині нирок малонового діальдегіду (МДА) та окисно-модифікованих білків (ОМБ), стан антиоксидантного захисту — за активністю глутатіонпероксидази (ГП) і каталази (КАТ) [1]. Енергетичне забезпечення клітин оцінювали за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ) у тканині нирок [3]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS Statistica 17.0. Достовірність різниці між показниками оцінювали за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричного U-критерію Манна — Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу). Наявність кореляційного зв'язку встановлювали за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена. Мінімальну статистичну достовірність приймали за p<0,05.

Результати дослідження та їх обговорення

Ішемія нирок з подальшою реперфузією призвели до розвитку олігуричної стадії ГНН, що виявлялося зниженням діурезу на 48,8 % (p<0,001) на фоні зменшення показника кліренсу креатиніну вдвічі (p<0,001). Ушкодження як клубочків, так і каналців нирок призвели до вираженої протеїнурії: екскреція білка збільшилась у 2,8 рази (p<0,05). На значне ушкодження епітелію каналців показало зростання показника фракційної екскреції натрію до 2,16 %, що у 5,4 рази (p<0,001) перевищило показник групи контролю (табл. 1). Триденне введення пептидів привело до зменшення вираженості ішемічного ушкодження, що виявлялось у достовірному зростанні діурезу в 1,9 рази при введенні EDL (p<0,001) та у 1,3 рази — при введенні AED (p<0,05), а також зменшенні екскреції білка порівняно з групою нелікованих тварин під впливом EDL у 2,4 рази (p<0,05), AED —

у 1,7 рази (p<0,05). Застосування пептиду AED призвело до зростання кліренсу креатиніну в 1,5 рази (p<0,05) та зменшення фракційної екскреції натрію до 1,47 % (p<0,05). При введенні пептиду EDL спостерігалось достовірне збільшення показника кліренсу креатиніну у 2,4 рази (p<0,001) та зменшення фракційної екскреції натрію до 0,55 % (p<0,001), що відповідало показнику норми та вказувало на збереження реабсорбційної здатності нефронів.

Розвиток ГНН супроводжувався активацією процесів пероксидації у тканині нирок, вміст МДА збільшився у 1,5 рази (p<0,001), ОМБ — на 49 % порівняно з групою псевдооперованих тварин (p<0,001; табл. 2). При цьому встановле-

но пригнічення активності ферментів антиоксидантного захисту — ГП удвічі (p<0,001) та КАТ — на 42 % (p<0,001).

Введення трипептиду EDL призвело до зростання активності ГП у 1,6 рази, КАТ — у 1,5 рази порівняно із групою нелікованих тварин (в обох випадках p<0,001). Поряд із цим, спостерігалось зменшення вмісту МДА у 1,3 рази й ОМБ — у 1,2 рази (p<0,001), що свідчило про обмеження вираженості вільнорадикальних процесів під впливом пептиду. При застосуванні AED активність КАТ зросла у 1,4 рази (p<0,001), ГП — у 1,3 рази (p<0,05), що поєднувалось зі зменшенням вмісту як МДА, так і ОМБ у 1,2 рази (в обох випадках p<0,01). Розвиток оксидативного стресу тісно пов'язаний із розвит-

Таблиця 2

Вплив трипептидів на стан прооксидантно-антиоксидантного балансу у тканині нирок щурів за умов розвитку ішемічно-реперфузійної гострої ниркової недостатності, M±SD

| Показник | Контроль | ГНН | ГНН + EDL | ГНН + AED |
|--|-------------|---------------|---------------|--------------|
| Вміст МДА, мкмоль/г | 23,66±1,22 | 34,87±1,05*** | 26,34±0,58### | 30,11±0,82## |
| Вміст ОМБ, од. опт. густ./мл | 8,41±0,20 | 12,56±0,30*** | 10,17±0,19### | 10,86±0,27## |
| Активність ГП, нмоль/(хв·мг тканини) | 128,76±3,76 | 63,75±2,86*** | 101,1±2,91### | 86,03±9,09# |
| Активність КАТ, мкмоль Н ₂ O ₂ / (хв·мг тканини) | 6,91±0,13 | 4,85±0,31*** | 7,31±0,14### | 6,58±0,25### |

Примітка. *** — p<0,001 — достовірні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими в групі контролю; # — p<0,05, ## — p<0,01, ### — p<0,001 — достовірні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими в групі щурів із гострою нирковою недостатністю (статистичний критерій Манна — Уїтні).



ком енергодефіциту, що підтверджувалося зниженням активності СДГ у тканині нирок нелікованих тварин у 4,7 разу ($p < 0,001$). Застосування EDL призвело до зростання активності СДГ у 5,4 разу ($p < 0,001$), АЕД — у 3,3 разу ($p < 0,001$) (рис. 1).

При застосуванні трипептиду EDL встановлено наявність оберненої кореляційної залежності середньої сили між активністю СДГ і вмістом МДА ($r = -0,67$), між активністю СДГ і FE_{Na^+} ($r = -0,56$), а також між активністю ГП і вмістом МДА ($r = -0,68$). Сильна кореляційна залежність виявлена між активністю ГП та вмістом ОМБ ($r = -0,9$), між FE_{Na^+} і активністю КАТ ($r = -0,78$). Пряма кореляційна залежність встановлена між активністю СДГ і Cl_{cr} ($r = 0,56$).

Висновки

Профілактичне застосування олігопептидів зменшило ступінь ушкодження нефронів при ішемії-реперфузії нирок,

нмоль сукцинату/(мг білка · хв)

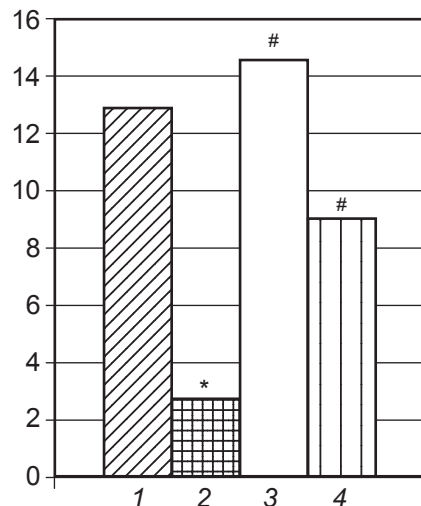


Рис. 1. Вплив трипептидів на активність СДГ у тканині нирок щурів за умов розвитку ішемічно-реперфузійної гострої ниркової недостатності: 1 — контроль; 2 — ГНН; 3 — ГНН + EDL; 4 — ГНН + АЕД; * — $p < 0,001$ — достовірні розбіжності показника порівняно з таким у групі контролю; # — $p < 0,001$ — достовірні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким у групі щурів із ГНН.

що виявлялося покращенням їх функціонального стану та енергетичного забезпечення, а також нормалізацією прооксидантно-антиоксидантного балансу. Більш ефективним за ступенем впливу на вивчені показники було введення трипептиду EDL, а встановлені кореляційні зв'язки свідчать про взаємозв'язок різних механізмів протекторного впливу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Арутюнян А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рекомендации / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина. — СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. — 53 с.
2. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. — М., 2009. — 880 с.
3. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.
4. Методи експериментального моделювання ураження нирок при фармакологічних дослідженнях: метод. рекомендації ДФЦ України / С. Ю. Штриголь, В. М. Лісовий, І. А. Зупанець [та ін.] — К., 2009. — С. 9–10.
5. 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.
6. Acute kidney injury: Prevention, detection and management of acute kidney injury up to the point of renal replacement therapy (Clinical guidelines; CG169). — London, UK: National Institute for Health and Care Excellence (NICE), 2013. — 39 p.
7. The study of the effects of posttreatment with rosmarinus officinalis aqueous extract 48 h after renal ischemia-reperfusion in rats / S. Ashtiyani, M. Zohrabi, A. Has-sanpoor [et al.] // Zahedan J. Res. Med. Sci. — 2013. — Vol. 15 (6). — P. 1–7.
8. El Sabbahy M. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair / M. El Sabbahy, V. S. Vaidya // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. — 2011. — Vol. 3 (5). — P. 606–618.
9. Muruganand R. Acute kidney injury: what's the prognosis? / R. Muruganand, J. A. Kellum // Nat. Rev. Nephrol. — 2011. — Vol. 7 (4). — P. 209–217.
10. Atorvastatin treatment attenuates renal injury in an experimental model of ischemia — reperfusion in

rats / K. Wu, L. Wenjing, J. Tian [et al.] // BMC Nephrology. — 2014. — Vol. 15. — P. 14.

REFERENCES

1. Arutiunian A.V., Dubinina Ye.Ye., Zybina N.N. *Metody otsenki svobodno-radikal'nogo okisleniia i antioksidantnoy sistemy organizma. Metodicheskiye rekomendatsii* [Methods of evaluation of free radical oxidation and antioxidant system of the organism. Methodological recommendations]. St.-Petersburg, IKF "Foliant", 2000, 53 p.
2. Kamyshnikov V.S. *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike* [Handbook of clinical biochemical investigations and laboratory diagnostics]. Moscow, 2009, 880 p.
3. *Metody biokhimicheskikh issledovaniy (lipidnyy i energeticheskiy obmen)* [Methods of the biochemical investigations (lipid and protein metabolism)]. Edited by Prokhorova M. I. Leningrad: Izdatelstvo Leningr. universiteta, 1982, 272 p.
4. Shtrygol S.Yu., Lisovyy I.A., Zupanets I.A. (eds) *Metody eksperimental'nogo modelyuvannia urazhennia nyrok pry farmakologichnykh doslidzheniyakh. Metodichni rekomendatsii DFC Ukrainy* [Methods of the experimental modeling of kidney injury for pharmacological investigations: Methodical recommendations of SPC of Ukraine]. Kyiv, 2009, p. 9–10.
5. Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Poliakova V.O. et al. Peptides regulate expression of the signal molecules in the kidney cell cultures during aging *in vitro*. *Bulleten' eksperimentalnoy biologii i meditsiny* 2014; 2(157): 227–230.
6. Acute kidney injury: Prevention, detection and management of acute kidney injury up to the point of renal replacement therapy (Clinical guidelines; CG169). London, UK: National Institute for Health and Care Excellence (NICE), 2013. 39 p.
7. Ashtiyani S., Zohrabi M., Hassanpoor A. The study of the effects of posttreatment with rosmarinus officinalis aqueous extract 48 h after renal ischemia-reperfusion in rats. *Zahedan J Res Med Sci.* 2013; 15 (6): 1–7.
8. El Sabbahy M., Vaidya V.S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011; 3 (5): 606–618.
9. Muruganand R., Kellum J.A. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol.* 2011; 7 (4): 209–217.
10. Wu K., Wenjing L., Tian J., Li H. Atorvastatin treatment attenuates renal injury in an experimental model of ischemia — reperfusion in

Надійшла 16.12.2014

