

## ПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ АНТИТРОМБИНОВЫХ ДНК-АПТАМЕРОВ ПРИ РАБДОМИОЛИЗЕ

© 2017 г. И.И. Заморский, В.А. Спиридонова\*

Буковинский государственный медицинский университет, 58002, Черновцы, Театральная пл., 2, Украина;

\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: zamorskii@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.16 г.

В эксперименте на белых крысах изучено влияние оригинальных антитромбиновых ДНК-аптамеров на функцию почек и выживаемость животных при рабдомиолизе, вызванном внутримышечным введением гиперосмолярного раствора глицерола. Продемонстрированы нефропротекторные эффекты ДНК-аптамеров, проявлявшиеся в снижении ретенционной гиперазотемии и протеинурии, улучшении экскреторной функции почек и общей выживаемости животных.

*Ключевые слова:* рабдомиолиз, острое повреждение почек, ДНК-аптамеры, нефропротекция.

Рабдомиолиз – быстрое разрушение скелетных мышц – является довольно частым следствием их сжатия и раздавливания при тяжелой травме, например при crush-синдроме, а также действия факторов нетравматического характера, в частности лекарств, алкоголя, миотропных ядов, микробных токсинов, чрезмерной физической нагрузки, судорог, гипертермии, тромбоза, метаболических или электролитных сдвигов, эндокринных и аутоиммунных заболеваний [1]. В результате миолиза из миоцитов выделяется миоглобин, который вызывает острое повреждение почек (ОПП) в результате перексидации макромолекул, вазоконстрикции, возникновения воспаления и апоптоза в почечной ткани, а также обструкции почечных канальцев миоглобиновыми цилиндрами и уротромбоза [2]. В организме при этом развивается синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания [1].

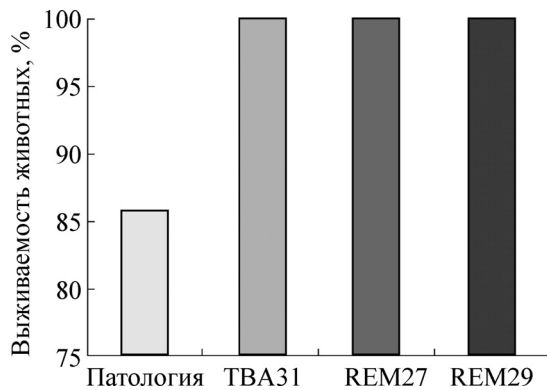
Для предупреждения и лечения ОПП используют ряд средств, направленных на процессы окислительного стресса (антиоксиданты и хелаторы ионов железа), воспаление и вазоконстрикцию (противовоспалительные средства и ингибиторы вазоконстрикторов) [2–4]. В то же время в современных рекомендациях по лечению этого опасного для жизни состояния недостаточное внимание обращается на предупреждение тромбоза как на системном уровне

(синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания), так и уротромбоза на уровне почечных канальцев, играющих важную роль в патогенезе рабдомиолиза [5]. В связи с этим наше внимание привлекли антитромбиновые ДНК-аптамеры – новый класс прямых ингибиторов тромбина, ключевого белка процесса свертывания крови.

Аптамеры – это небольшие однотяжевые молекулы ДНК/РНК, размером 30–60 нуклеотидов, обладающие высоким сродством и специфичностью к выбранной мишени, которые по специфичности и аффинности являются функциональными аналогами моноклональных антител. Однотяжевые аптамерные молекулы нуклеиновых кислот имеют высокоупорядоченную третичную структуру, которая позволяет им образовывать стабильные и специфические комплексы с различными мишенями, в частности с тромбином. Эти вещества получают с помощью методов комбинаторной химии нуклеиновых кислот SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) [6]. До настоящего времени синтезированные нами молекулы антитромбиновых ДНК-аптамеров [7] исследовались только как ингибиторы тромбина в условиях *in vitro* [8].

Целью данного исследования стало выявление влияния оригинальных антитромбиновых ДНК-аптамеров на течение экспериментального рабдомиолитического ОПП, смоделированного внутримышечным введением гиперосмолярного раствора глицерола.

Сокращение: ОПП – острое повреждение почек.



Выживаемость животных (в %) в условиях рабдомиолитического острого повреждения почек на седьмые сутки эксперимента на фоне предварительного введения антитромбиновых ДНК-аптамеров (ТВА31, REM27 и REM29,  $n = 7$ ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 59 нелинейных белых крысах-самцах массой 140–180 г, разделенных на пять групп ( $n = 7$ ): контрольную, модельной патологии и три группы животных с рабдомиолизом, которым вводили ДНК-аптамеры (ТВА31, REM27 и REM29). ДНК-аптамеры вводили внутривентриально в дозе 0,5 мг/кг ежедневно в течение трех суток до моделирования миоглобинурического ОПП. Рабдомиолиз с последующим поражением почек моделировали введением 50%-го раствора глицерола внутримышечно из расчета 10 мл на 1 кг массы [9]. Нефропротекторную эффективность препаратов оценивали через 24 ч после моделирования ОПП в условиях водной нагрузки (5% от массы тела), собирая в течение 2 ч мочу [3]. Эвтаназию части животных осуществляли декапитацией под эфирным наркозом с последующим забором крови и почек. Общую выживаемость животных регистрировали на седьмые сутки. Функциональное состояние почек оценивали по показателям диуреза, клиренса креатинина, скорости клубочковой фильтрации, реабсорбции воды в канальцах, экскреции белка, титрованных кислот и ионов аммония с мочой [3,4]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0. Характер распределения показателей определяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Оценка различий между выборками проводили с использованием параметрического  $t$ -критерия Стьюдента (при нормальном распределении переменных) и непараметрического  $U$ -критерия Манна–Уитни (в случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением). Статистическую оценку

наличия эффекта выживаемости животных проводили с использованием углового преобразования Фишера. Критическим уровнем значимости было принято значение  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным (см. таблицу) у животных группы модельной патологии к концу первых суток эксперимента наблюдали признаки олигоурической стадии рабдомиолитического ОПП: диурез уменьшался на 38,4%, скорость клубочковой фильтрации – в 4,4 раза, протеинурия и ретенционная гиперазотемия регистрировались на уровне, превышающем показатели контроля в 5,4 раза и почти в 3 раза соответственно. При этом массивная протеинурия имела преимущественно канальцевое происхождение, поскольку стандартизованная по показателям клубочкового фильтрата экскреция белка увеличивалась в 12 раз, а общая экскреция белка – в 3 раза. О поражении почек свидетельствовало также достоверное снижение способности к реабсорбции воды в канальцах (на 1,3%). При этом уровень летальности животных на седьмые сутки развития рабдомиолиза составлял 14,3% (рисунок).

Введение антитромбиновых ДНК-аптамеров замедлило темпы прогрессирования рабдомиолитического ОПП и способствовало восстановлению функционирования почек. Так, у крыс, леченных ДНК-аптамером REM27, диурез повышался на 12,4% относительно группы патологии (таблица). Скорость клубочковой фильтрации увеличивалась под влиянием ДНК-аптамеров REM27 и REM29 соответственно на 41 и 64%. При этом REM29 восстанавливал скорость клубочковой фильтрации на 17% ( $p \leq 0,05$ ) лучше по сравнению с аптамером REM27, а также уменьшал выраженность задержки креатинина в организме, повышал клиренс последнего и достоверно увеличивал реабсорбцию воды в канальцах на 0,65%. Протеинурия уменьшалась в среднем на 69% без значительной разницы между аптамерами. При этом REM27 также достоверно влиял на кислотно-регулирующую функцию почек, увеличивая экскрецию с мочой как титрованных кислот, так и ионов аммония. Все использованные антитромбиновые ДНК-аптамеры способствовали повышению общей выживаемости животных на седьмые сутки после моделирования рабдомиолиза до уровня 100% (рисунок).

Таким образом, антитромбиновые ДНК-аптамеры в условиях экспериментального рабдомиолиза оказывают протекторные эффекты, вероятно, за счет предупреждения развития син-

Показатели функционального состояния почек крыс при рабдомиолитическом остром повреждении почек на фоне введения ДНК-аптамеров REM27 и REM29 ( $n = 7, M \pm m$ )

Показатель	Контроль	ОПП	ОПП + REM27	ОПП + REM29
Диурез, мл	4,34 ± 0,20	2,67 ± 0,44**	3,80 ± 0,39#	3,05 ± 0,35
Концентрация креатинина в плазме, мкмоль/л	71,74 ± 8,05	214,29 ± 11,05**	164,96 ± 6,75#	142,54 ± 10,05##
Клиренс креатинина, мкл/мин	64,19 ± 12,40	14,65 ± 1,80**	20,65 ± 1,90#	24,08 ± 1,37##
Скорость клубочковой фильтрации, мкл/мин	534,9 ± 103,3	122,1 ± 15,0**	172,1 ± 15,8#	200,7 ± 11,4##
Реабсорбция воды, %	99,11 ± 0,10	97,83 ± 0,26**	97,80 ± 0,09	98,47 ± 0,18#
Содержание белка в моче, г/л	0,032 ± 0,009	0,173 ± 0,038**	0,059 ± 0,008##	0,048 ± 0,007##
Экскреция белка, мг/2 ч	0,137 ± 0,040	0,415 ± 0,071**	0,213 ± 0,018##	0,135 ± 0,011##
Стандартизированная экскреция белка, мг/100 мкл клубочкового фильтрата	0,030 ± 0,011	0,360 ± 0,080**	0,130 ± 0,019##	0,067 ± 0,004##
Экскреция титрованных кислот, мкМ/2 ч	13,21 ± 2,22	17,83 ± 2,27	30,70 ± 6,84#	19,73 ± 1,65
Экскреция ионов аммония, мкМ/2 ч	72,27 ± 5,85	74,66 ± 5,74	114,96 ± 4,55##	78,88 ± 8,66

Примечания. \* –  $p \leq 0,05$  по сравнению с данными контроля; \*\* –  $p \leq 0,01$  по сравнению с данными контроля; # –  $p \leq 0,05$  по сравнению с данными при ОПП без введения аптамеров; ## –  $p \leq 0,01$  по сравнению с данными при ОПП без введения аптамеров.

дрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания и уротромбоза в канальцах нефрона.

### ВЫВОДЫ

Протекторные свойства антитромбиновых ДНК-аптамеров при остром повреждении почек, вызванном рабдомиолизом, проявляются в снижении протеинурии и ретенционной гиперазотемии, а также повышении скорости клубочковой фильтрации, диуреза и реабсорбции воды в канальцах нефрона. Аптамер REM29 проявлял более выраженное нефропротекторное действие по сравнению с аптамером REM27 благодаря лучшей нормализации экскреции в почках. В то же время REM27 оказывал заметное влияние на кислотно-регулирующую составляющую функции почек.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. A. Torres, J. A. Helmstetter, A. M. Kaye, et al., *Ochsner J.* **15**, 58 (2015).
2. N. Panizo, A. Rubio-Navarro, J. M. Amaro-Villalobos, et al., *Kidney Blood Press. Res.* **40**, 520 (2015).
3. I. I. Zamorskii and T. S. Shchudrova, *Biophysics* **59**, 834 (2014).
4. I. I. Zamorskii and V. G. Zeleniuk, *Biophysics* **59**, 837 (2014).
5. X. Bosch, E. Poch, and J. M. Grau, *N. Engl. J. Med.* **361**, 62 (2009).
6. V. A. Spiridonova, *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry* **4**, 138 (2010).
7. V. A. Spiridonova, K. V. Barinova, K. A. Glinkina, et al., *FEBS Lett.* **589**, 2043 (2015).
8. A. Mazurov, E. Titaeva, S. Khaspekova, et al., *Biol. Med.* **150**, 422 (2011).
9. A. P. Singh, A. Muthuraman, A. S. Jaggi, et al., *Pharmacol. Reports* **64**, 31 (2012).

## **Protective Effects of Antithrombin DNA Aptamers in a Case of Rhabdomyolysis**

**I.I. Zamorskii\* and V.A. Spiridonova\*\***

*\*Bukovinian State Medical University, Teatralnaya pl. 2, Chernivtsi, 58002 Ukraine*

*\*\*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

While performing experiments on white rats we studied the effect of the original antithrombin DNA aptamers on renal function and survival of animals with rhabdomyolysis caused by intramuscular injection of hyperosmolar glycerol solution. It was demonstrated that the nephroprotective effects of DNA aptamers were through reduction in retention hyperazotemia and proteinuria, improvement in renal excretory function and overall survival of animals.

*Key words: rhabdomyolysis, acute kidney injury, DNA aptamers, nephroprotection*