

## КОРРЕКЦИЯ РАБДОМИОЛИТИЧЕСКОГО ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПРИМЕНЕНИЕМ АДЕМЕТИОНИНА

© 2019 г. И.И. Заморский, В.М. Драчук, Т.С. Щудрова, А.М. Горошко, Т.Г. Копчук  
Буковинский государственный медицинский университет, 58002, Черновцы, Театральная пл., 2, Украина  
E-mail: igor.zamorskii@gmail.com

Поступила в редакцию 22.06.2019 г.

После доработки 22.06.2019 г.

Принята к публикации 12.07.2019 г.

На модели рабдомиолитического острого повреждения почек установлен выраженный нефропротекторный эффект адеметионина по способности устранять токсическое воздействие миоглобина, о чем свидетельствует увеличение мочевыделения, скорости клубочковой фильтрации, уменьшение ретенционной азотемии и протеинурии, наряду с нормализацией ионорегулирующей функции почек, активацией клубочково-канальцевого и канальцево-канальцевого балансов, а также улучшением энергообеспечения почек. Доказано выраженное антиоксидантное действие препарата, что реализовалось увеличением активности каталазы и глутатионпероксидазы в ткани почек с достоверным снижением активности перекисного окисления липидов и белков, а также цитопротекторная активность — по снижению активности гамма-глутамилтранспептидазы в моче экспериментальных животных.

*Ключевые слова:* рабдомиолитическое острое повреждение почек, нефропротекторная активность, адеметионин.

DOI: 10.1134/S0006302919050211

Несмотря на значительные достижения в медикаментозном лечении и внедрение современных методов почечно-заместительной терапии, смертность от острого повреждения почек (ОПП) остается высокой и составляет около 25–70% [1,2], а его частое сочетание с мультиорганной патологией и недостаточная эффективность лечения требуют расширения направлений почечной протекции с внедрением альтернативных высокоэффективных и безопасных нефропротекторов для воздействия на этиологический, патогенетический и симптоматический компоненты заболевания. В связи с этим основными требованиями, выдвигаемыми к нефропротекторам, является способность влиять на основные механизмы развития повреждения и защиты почечной ткани, наличие антиоксидантных, противовоспалительных и мембранопротекторных свойств. Одной из самых частых причин почечной формы ОПП является миоренальный синдром, вызванный массивным рабдомиолизом [3], при котором повреждение скелетных мышц приводит к лизису миоцитов, в результате чего в плазму крови выделяется их внутриклеточное содержимое, включая миоглобин, который обладает непосредственным

токсическим действием на почки, вызывая obstruction канальцев и снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) [4,5]. На долю рабдомиолитического ОПП приходится около 15% всех случаев в общей структуре ОПП, а уровень смертности при этом составляет 8% [6]. Существует множество причин возникновения рабдомиолиза — травматический рабдомиолиз (краш-синдром, судороги, чрезмерные физические нагрузки) и нетравматический рабдомиолиз вследствие действия различных токсических и физических факторов (отравление соединениями тяжелых металлов, наркотическими веществами, лекарственными средствами), ишемия мышц, инфекции и т. п. Выделяют три основных патогенетических механизма развития рабдомиолитического ОПП: почечная вазоконстрикция, ишемия и окислительный стресс [7]. Окислительный стресс возникает вследствие избытка железа, выделяемого из миоглобина, который имеет прямое повреждающее действие на почечные каналы. Сдавливание тканей также индуцирует образование свободных радикалов кислорода высокой активности, которые усиливают окислительный стресс и провоцируют перекисное окисление липидов и белков, в результате чего возникает колликативный некроз мышечных волокон с деградацией сарколеммы и гибелью клетки [8].

*Сокращения:* ОПП — острое повреждение почек, СКФ — скорость клубочковой фильтрации.

Поскольку основой патогенеза почечной патологии является развитие оксидативного стресса, который характеризуется прооксидантно-антиоксидантным дисбалансом, для исследования был выбран адеметионин – активный серосодержащий метаболит метионина, природный антиоксидант, содержащийся во всех тканях организма [9–11]. Как лекарственное средство он относится к группе гепатопротекторов, однако благодаря плейотропным эффектам обладает мембранопротекторным, цитопротекторным, антиоксидантным, противовоспалительным, анальгезирующим, антидепрессантным и нейропротекторным свойствами [12–16].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 120–180 г, которые находились в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Животные были разделены на три группы по семь особей в каждой: первая группа – контрольная, вторая – животные с рабдомиолитическим ОПП, третья – животные, которым вводили адеметионин при ОПП. Рабдомиолитическое повреждение почек воспроизводили путем введения крысам внутримышечно 50%-го раствора глицерола в дозе 8 мл/кг [17]. Адеметионин («Гептрал», Abbott S.p.A., Италия) вводили в дозе 20 мг/кг внутривенно через 40 мин после моделирования ОПП и продолжали вводить ежедневно в течение 6 суток [18]. Забор материала осуществляли на седьмые сутки эксперимента в условиях водной нагрузки [17].

Протекторное действие препарата оценивали по показателям функционального состояния почек, активности липидной и белковой пероксидации и ферментов антиоксидантной защиты. В корковом веществе почек и в эритроцитах определяли содержание малонового диальдегида по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, а содержание продуктов окислительной модификации белков определяли в ткани почек по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием гидразонов, имеющих характерный спектр поглощения. Состояние антиоксидантной защиты оценивали по активности в ткани почек каталазы и глутатионпероксидазы. Активность каталазы определяли по реакции с молибдатом аммония, глутатионпероксидазы – по количеству восстановленного глутатиона, который определяли спектрофотометрически. Активность гамма-глутамилтранспептидазы в моче и сукцинатдегидрогеназы в ткани почек определяли с помощью тест-наборов реактивов (ЗАО «Реагент», Украина). Функциональное состояние почек оценивали по показателям диуреза, креатинина в плазме

крови, экскреции белка с мочой, реабсорбции и экскреции ионов натрия [17,19,20].

Морфологическую верификацию изменений в почках проводили с использованием гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, и компьютерной морфометрии объектов (микроскоп Люмам-Р8, объектив 10×, окуляр 10×) в среде компьютерной программы «Видео-Тест-Размер 5.0» (ООО «Видеотест», Россия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы SPSS Statistics 17.0. Оценку 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). Критический уровень значимости был принят за  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате эксперимента на седьмые сутки развития рабдомиолитической формы ОПП определяли признаки повреждения почечной ткани, что проявлялось снижением диуреза на 33,4%, СКФ – в два раза по сравнению с животными интактной группы (табл. 1). Несмотря на тенденцию к восстановлению экскреторной функции почек, сохранялась гиперазотемия (уровень креатинина в плазме крови превышал показатель контроля в 1,7 раза) и выраженная протеинурия (концентрация белка в моче выросла в три раза). Курсовое семисуточное введение адеметионина способствовало улучшению функционального состояния почек, что подтверждалось возрастанием диуреза до уровня контроля и увеличением СКФ в 1,6 раза. Креатининемия у леченных животных снижалась до показателей нормы – в 1,4 раза. При этом отмечалось значительное (в 2,8 раза) уменьшение концентрации белка в моче.

Кроме того, адеметионин способствовал нормализации канальцевой функции, увеличивая показатель абсолютной реабсорбции ионов натрия в 1,6 раза с соответствующим уменьшением показателя фракционной экскреции ионов натрия в 2,9 раза, что свидетельствует о снижении тубулярного повреждения и восстановлении реабсорбционной способности эпителиоцитов канальцев.

О глубоком нарушении взаимосвязей между различными отделами нефрона в группе леченых животных свидетельствует снижение показателей как проксимального (в 2,1 раза), так и дистального (в 1,6 раза) транспорта ионов натрия. Это сопровождалось ослаблением канальцево-канальцевого баланса и подтверждено прямой корреляцией между показателями (табл. 2). Корриги-

**Таблица 1.** Показатели функционального состояния почек крыс при рабдомиолитическом остром повреждении почек и применении адеметионина

Показатель	Интактный контроль	ОПП	ОПП + адеметионин, 20 мг/кг
Диурез, мл/2 ч · 100 г	4.76 ± 0.15	3.17 ± 0.19 <sup>##</sup>	4.67 ± 0.11 <sup>**</sup>
Концентрация креатинина в плазме крови, мкмоль/л	59.51 ± 2.62	101.14 ± 1.31 <sup>##</sup>	70.97 ± 1.72 <sup>**</sup>
Скорость клубочковой фильтрации, мкл/100 г	604.76 ± 38.24	306.6 ± 25.29 <sup>##</sup>	497.9 ± 25.97 <sup>**</sup>
Концентрация белка в моче, г/л	0.011 ± 0.001	0.033 ± 0.002 <sup>##</sup>	0.012 ± 0.001 <sup>**</sup>
Реабсорбция ионов натрия, мкмоль/мин	87.03 ± 5.33	42.82 ± 3.43 <sup>##</sup>	69.48 ± 4.44 <sup>**</sup>
Фракционная экскреция ионов натрия, %	0.28 ± 0.02	1.05 ± 0.07 <sup>##</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>**</sup>
Проксимальный транспорт ионов натрия, ммоль/2 ч	11.85 ± 0.76	5.73 ± 0.49 <sup>##</sup>	9.36 ± 0.62 <sup>**</sup>
Дистальный транспорт ионов натрия, ммоль/2 ч	682.14 ± 21.24	438.91 ± 24.43 <sup>##</sup>	646.70 ± 24.97 <sup>**</sup>

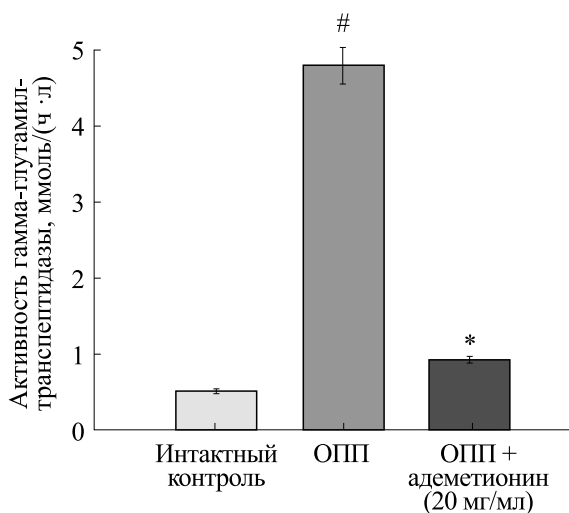
Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm m$  ( $n = 7$ ); <sup>##</sup> – статистически значимые различия с данными группы интактного контроля ( $p < 0.01$ ), <sup>\*\*</sup> – с данными группы рабдомиолитического ОПП ( $p < 0.01$ ).

**Таблица 2.** Влияние адеметионина на состояние клубочково-канальцевого и канальцево-канальцевого баланса при рабдомиолитическом остром повреждении почек

Группа животных	СКФ ↔ T <sub>p</sub> Na <sup>+</sup>	СКФ ↔ T <sub>d</sub> Na <sup>+</sup>	T <sub>p</sub> Na <sup>+</sup> ↔ T <sub>d</sub> Na <sup>+</sup>
Интактный контроль	$r = 0.100; p < 0.01$	$r = 0.964; p < 0.01$	$r = -0.893, p < 0.05$
ОПП	$r = 0.964; p < 0.01$	$r = 0.575; p > 0.05$	$r = 0.643, p > 0.05$
ОПП + Адеметионин	$r = 0.964; p < 0.01$	$r = 0.929; p < 0.01$	$r = -0.875, p < 0.05$

Примечание. T<sub>p</sub>Na<sup>+</sup> – проксимальный транспорт ионов натрия, T<sub>d</sub>Na<sup>+</sup> – дистальный транспорт ионов натрия,  $r$  – коэффициент корреляции Спирмена.

рующее воздействие адеметионина способствовало восстановлению клубочково-канальцевого и активации канальцево-канальцевого балансов,



**Рис. 1.** Активность гамма-глутамилтранспептидазы в моче крыс с рабдомиолитическим ОПП при введении адеметионина, ммоль/(ч · л). # – Статистически значимые различия с данными группы интактного контроля ( $p < 0,01$ ), \* – статистически значимые различия с данными группы острого повреждения почек ( $p < 0,01$ ).

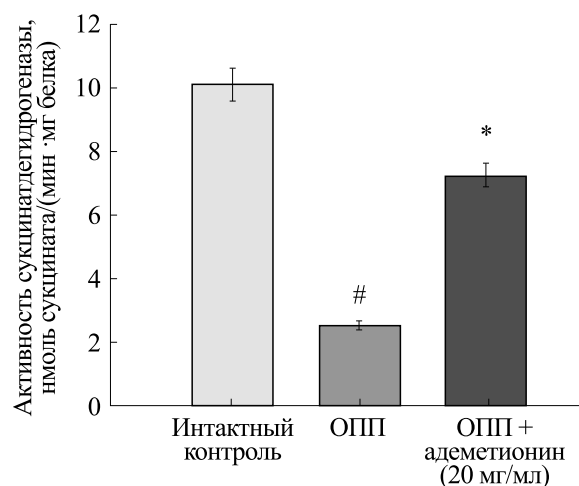
подтвержденное корреляцией между СКФ и проксимальной и дистальной реабсорбцией, а также между проксимальным и дистальным транспортом ионов натрия, которые увеличивались в 1,6 и 1,5 раза соответственно.

Достоверное снижение активности гамма-глутамилтранспептидазы – маркера повреждения и некроза эпителиоцитов – в 5,2 раза по сравнению с нелечеными животными, свидетельствует о цитопротекторной активности адеметионина (рис. 1). Развитие рабдомиолитического ОПП также характеризовалось снижением активности сукцинатдегидрогеназы в ткани почек в 4,1 раза по сравнению с контрольной группой, что указывает на нарушение аэробного метаболизма и подтверждает развитие почечной ишемии со снижением продукции АТФ в клетках почечных канальцев и нарушением энергетического обмена (рис. 2). Применение адеметионина обусловило увеличение активности сукцинатдегидрогеназы в 2,9 раза по сравнению с группой ОПП. Учитывая полученные данные, можно утверждать, что применение препарата способствует компенсаторной активации аэробного гликолиза и снижает степень угнетения окислительных процессов в цикле Кребса в условиях развития рабдомиолитического ОПП, что приводит к активации энергосинтезирующей функции нефроцитов.

У крыс группы патологии сохранялась высокая интенсивность процессов пероксидного окисления наряду с истощением системы антиоксидантной защиты: содержание малонового диальдегида и окислительно-модифицированных белков в ткани почек достоверно превышало показатели контроля на 23,6% и 46,1% соответственно (табл. 3). Курсовое применение адеметионина содействовало угнетению окислительных процессов (содержание малонового диальдегида уменьшалось на 19,3%, а содержание окислительно-модифицированных белков – на 31,7%), а также активацией системы антиоксидантной защиты, что реализовалось увеличением активности глутатионпероксидазы на 58,8% и восстановлением активности каталазы до уровня контроля.

На седьмые сутки развития рабдомиолитического ОПП сохранялись существенные изменения гистоструктуры почек (рис. 3). В части клубочков выявлено расширение просвета Боумена. В извитых канальцах коры почек  $93,0 \pm 1,0\%$  эпителиоцитов имели признаки зернистой и гидрорической дистрофии, а  $5 \pm 0,5\%$  эпителиоцитов находились в состоянии коагуляционного некроза, с уплотнением цитоплазмы и кариопикнозом. В выводных трубчатках мозгового вещества  $71,2 \pm 1,2\%$  эпителиоцитов были поражены гидрорической дистрофией, что является обратимым процессом. Выявлена закупорка миоглобиновыми цилиндрами  $28,5 \pm 0,7\%$  просветов канальцев коры и  $61,3 \pm 1,1\%$  выводных трубочек мозгового вещества.

На фоне коррекции рабдомиолитического ОПП адеметионином морфологическая картина почек значительно улучшилась (рис. 4). Миоглобиновые цилиндры практически не встречались в просветах канальцев коры, в собирательных трубочках мозгового вещества обнаружены единичные цилиндры.  $43,1 \pm 0,6\%$  эпителиоцитов ка-



**Рис. 2.** Активность сукцинатдегидрогеназы в ткани почек крыс с рабдомиолитическим ОПП при введении адеметионина, нмоль сукцината/(мин·мг белка). # – Статистически значимые различия с данными группы интактного контроля ( $p < 0,01$ ), \* – статистически значимые различия с данными группы рабдомиолитического ОПП ( $p < 0,01$ ).

нальцев коркового вещества имели признаки гидрорической дистрофии, у 1,5% клеток обнаружены некробиотические изменения. Дегенеративный процесс в виде зернистой дистрофии был распространен только у  $32,3 \pm 0,3\%$  клеток выводных трубочек мозгового вещества, что свидетельствует о корригирующем действии препарата.

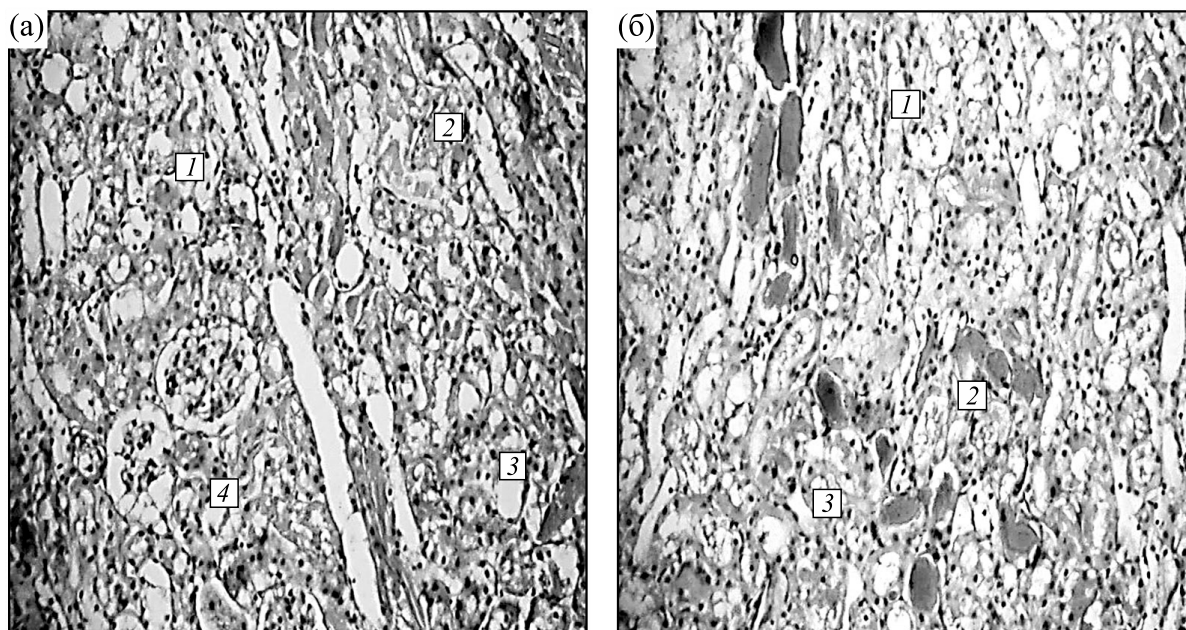
## ВЫВОДЫ

Адеметионин в условиях рабдомиолитического ОПП проявляет нефропротекторные свойства, повышая СКФ и диурез, а также снижая проявления гиперазотемии, протеинурии, восстанавли-

**Таблица 3.** Влияние адеметионина на прооксидантно-антиоксидантный баланс в ткани почек при рабдомиолитическом ОПП у крыс

Показатель	Малоновый диальдегид, мкмоль/г	Окислительно-модифицированные белки, ед./г	Каталаза, мкмоль/(мин · мг)	Глутатионпероксидаза, нмоль/(мин · мг)
Интактный контроль	$55.05 \pm 1.23$	$14.96 \pm 0.38$	$6.22 \pm 0.27$	$293.46 \pm 11.57$
ОПП	$68.02 \pm 2.57^{##}$	$21.86 \pm 0.37^{##}$	$5.59 \pm 0.28^{\#}$	$192.89 \pm 5.09^{##}$
ОПП + адеметионин, 20 мг/кг	$54.87 \pm 1.37^{**}$	$14.93 \pm 0.34^{**}$	$6.40 \pm 0.14^*$	$306.29 \pm 9.28^{**}$

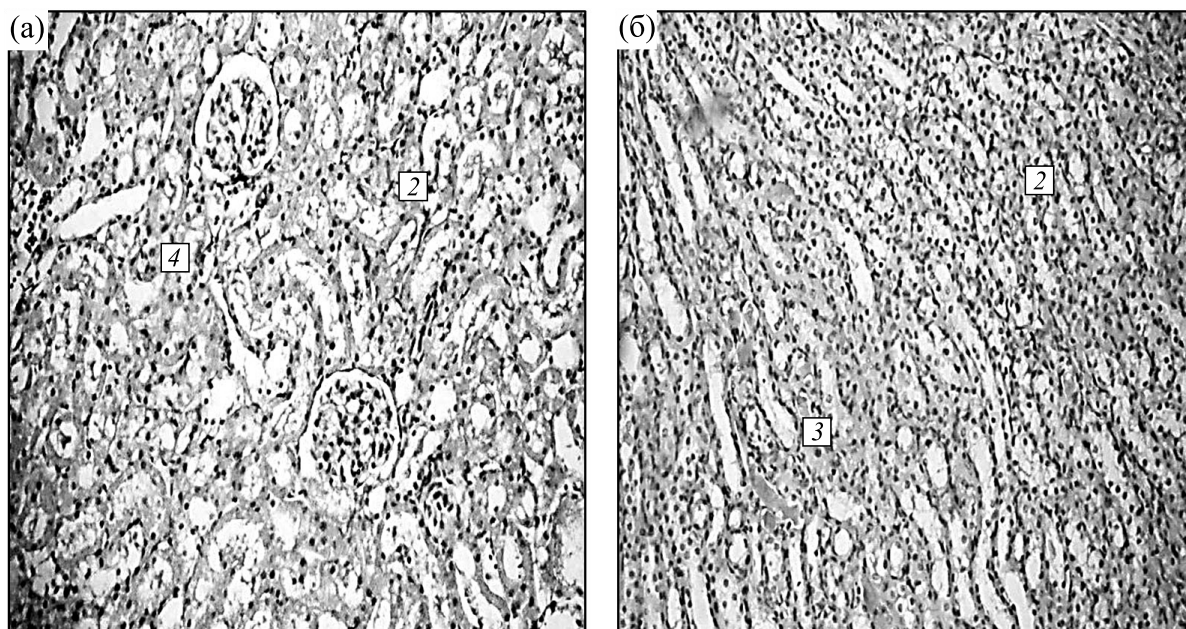
Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm t$  ( $n = 7$ ); достоверные различия с данными группы: интактного контроля –  $^{\#}$  ( $p < 0.05$ ),  $^{##}$  ( $p < 0.01$ ), модельной патологии –  $^*$  ( $p < 0.05$ ),  $^{**}$  ( $p < 0.01$ ).



**Рис. 3.** Микроснимки препаратов почки: (а) – корковое вещество, (б) – мозговое вещество крысы с рабдомиолитическим острым повреждением почек, седьмые сутки. Некроз эпителиоцитов (1), зернистая и гидропическая дистрофия эпителиоцитов (2), миоглобиновые цилиндры (3), расширение просвета Боумена (4). Окрашивание гематоксилином и эозином.

вая реабсорбционную способность нефронов и нормализуя прооксидантно-антиоксидантный баланс. Полученные результаты исследований являются экспериментальным обоснованием це-

лесообразности дальнейшего изучения адеметионина как безопасного и эффективного лекарственного средства для профилактики и коррекции патологии почек.



**Рис. 4.** Микроснимки препаратов почки: (а) – корковое вещество, (б) – мозговое вещество крысы с рабдомиолитическим острым повреждением почек при применении адеметионина, седьмые сутки. Дистрофия эпителиоцитов (2), миоглобиновые цилиндры (3), расширение просвета Боумена (4). Окрашивание гематоксилином и эозином.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводили в соответствии с положениями Директивы Европейского союза 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях [21].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Koza, J. Inj. Violence Res. **8** (1), 58 (2016).
2. В. Добронравов и А. В. Смирнов, Почка **2** (16), 63 (2016).
3. K. Makris and L. Spanou, Clin. Biochem. **37** (2), 85 (2016).
4. P. Esposito, L. Estienne, N. Serpieri, et al., Am. J. Kidney Dis. **71** (6), 12 (2018).
5. R. Galeiras, M. Mourelo, S. Pértega, et al., Indian J. Crit. Care. Med. **20** (9), 504 (2016).
6. S. Mas-Font, J. Ros-Martinez, C. Pérez-Calvo, et al., Med. Intensiva **41** (2), 116 (2017).
7. X. Bosch, E. Poch, J. M. Grau, N. Engl. J. Med. **361** (1), 62 (2009).
8. J. M. Dennis and P. K. Witting, Nutrients **9** (7), 718 (2017).
9. R. A. Cavallaro, A. Fuso, M. d'Erme, et al., Int. J. Clin. Nutr. Diet. **2** (1), 109 (2016). DOI: 10.15344/2456-8171/2016/109
10. Q. M. Anstee and C. P. Day, J. Hepatol. **57** (5), 1097 (2012).
11. S. A. Lozano-Sepulveda, E. Bautista-Osorio, J. A. Merino-Mascorro, et al., World J. Gastroenterol. **22** (14), 3746 (2016).
12. A. L. King, S. K. Mantena, K. K. Andringa, et al., Redox Biol. **9**, 188 (2016).
13. T. Guo, L. Chang, Y. Xiao, et al., PLoS One **10** (3), e0122124 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0122124
14. B. Vincenzi, A. Russo, and A. Terenzio, Crit. Rev. Oncol. Hematol. **130**, 70 (2018). DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.06.019
15. A. Antoniv, N. Antofiychuk, T. Danylyshina, et al., Georgian Med. News **273**, 31 (2017).
16. A. Sharma, P. Gerbarg, T. Bottiglieri, et al., J. Clin. Psychiatry **78** (6), 656 (2017).
17. I. I. Zamorskii, V. M. Drachuk, and O. M. Goroshko, Biophysics **61** (6), 1036 (2016).
18. R. Carrasco, M. Pérez-Mateo, A. Gutiérrez, et al., Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. **22** (10), 737 (2000).
19. В. С. Камышников, *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике* (МЕДпресс, М., 2009).
20. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина и Н. Н. Зыбина, *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма* (Фолиант, СПб., 2000).
21. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, Official Journal of the European Union L276 (53), 332010 (2010).

**Amelioration of Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury by Ademetionine**

**I.I. Zamorskii, V.M. Drachuk, T.S. Shchudrova, O.M. Goroshko, and T.G. Kopchuk**

*Bukovinian State Medical University, Teatral'naya pl. 2, Chernivtsi, 58002 Ukraine*

Using the model of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury the results of our study demonstrate a significant nephroprotective effect of ademetionine that target the harmful effect of myoglobin as manifested by a rise in the urine output and glomerular filtration rate, reduction in retention azotemia and proteinuria, along with normalization of the ion-regulating kidney function, realized by the activation of the glomerular-tubular and tubular-tubular balance, as well as an adequate energy supply to the kidneys. A significant antioxidant effect of ademetionine has been confirmed with evidence that catalase and glutathione peroxidase activities were increased in kidney tissue with a significant decrease in lipid peroxidation and protein degradation and its cytoprotective efficacy was proven due to a decrease in gamma glutamyl transpeptidase activity in the urine of experimental animals.

*Keywords: rhabdomyolysis-induced acute kidney injury, nephroprotective activity, ademetionine*