

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В УСЛОВИЯХ РАБДОМИОЛИЗ-ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

© 2019 г. И.И. Заморский, Т.Н. Унгурян, С.П. Мельничук

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 08.07.2019 г.

Рабдомиолиз – угрожающий жизни синдром, возникающий вследствие повреждения скелетных мышц и приводящий в 10–40% всех случаев к острому ренальному тубулярному некрозу и острому повреждению почек из-за воздействия миоглобина, вышедшего из разрушенных миоцитов. Активные формы кислорода и окислительный стресс являются ведущими факторами при остром повреждении почек. Одним из главных антиоксидантов в плазме крови является церулоплазмин, обладающий множеством физиологических функций. В проведенных экспериментах на нелинейных белых половозрелых крысах изучено влияние церулоплазмина на функциональное состояние почек и прооксидантно-антиоксидантный баланс в почках и крови животных в условиях экспериментального рабдомиолиза. Установлено, что церулоплазмин в профилактическом режиме введения оказывает ренопротекторное действие, улучшая функциональное состояние почек, уменьшая интенсивность перекисного окисления липидов и белков и увеличивая активность глутатионпероксидазы в ткани почек и крови, а также уровень церулоплазмина и молекул с SH-группами в плазме крови.

*Ключевые слова:* рабдомиолиз, острое повреждение почек, церулоплазмин.

DOI: 10.1134/S000630291905022X

Острое повреждение почек (ОПП) развивается в 10–40% всех случаев рабдомиолиза [1,2]. Рабдомиолиз – это угрожающий жизни синдром, возникающий при повреждении скелетных мышц и приводящий к острому ренальному тубулярному некрозу из-за воздействия миоглобина, вышедшего из разрушенных миоцитов [3,4]. Неадекватность оценки состояния пациентов с риском ОПП приводит к тому, что около 60% случаев его развития после госпитализации можно было бы предсказать, а 21% – избежать [5]. Окислительный стресс и активные формы кислорода, как полагают, являются движущими факторами при ОПП и хронических заболеваниях, таких как сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет, которые предрасполагают к ОПП [6,7].

Система естественной защиты в условиях окислительного стресса состоит из неферментативных антиоксидантов, таких как восстановленный глутатион, витамины Е и С, ферритин, трансферрин, церулоплазмин и альбумин, а также антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионперокси-

даза и др. [8,9]. Все эти антиоксиданты тесно взаимодействуют на разных этапах различных патологических процессов. В плазме крови одним из главных антиоксидантов является церулоплазмин, обладающий множеством физиологических функций [10,11]. Церулоплазмин – полифункциональный белок, участвующий в транспорте меди, обмене железа, в рецепторных взаимодействиях с клетками различных тканей, во взаимодействиях с иммунокомпетентными клетками, в окислении биогенных аминов, выполняет антиоксидантную и ферроксидазную функции, регулирует перекисное окисление липидов [12,13]. Кроме того, церулоплазмин имеет несколько других каталитических активностей. Как сообщалось ранее [11,12], церулоплазмин обладает как NO-оксидазной, так и глутатионпероксидазной активностью, участвует в окислении липопротеинов низкой плотности, способен окислять обширную группу органических субстратов, включая ксенобиотики. Процессы, в которых участвует этот антиоксидант, имеют как ферментативное, так и неферментативное происхождение [11,12].

*Сокращение:* ОПП – острое повреждение почек.

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

Показатели	Контроль	ОПП	ОПП + церулоплазмин
Диурез, мл/2 ч	4,07 ± 0,11	1,54 ± 0,07 $p_1 < 0,01$	2,98 ± 0,24 $p_2 < 0,01$
Концентрация креатинина в плазме крови, мкмоль/л	71,14 ± 1,83	239,37 ± 19,10 $p_1 < 0,01$	109,91 ± 11,94 $p_2 < 0,01$
Экскреция креатинина, мкмоль/л	3,99 ± 0,40	2,92 ± 0,19 $p_1 < 0,01$	5,09 ± 0,14 $p_2 < 0,01$
Концентрация белка в моче, г/л	0,022 ± 0,003	0,196 ± 0,003 $p_1 < 0,01$	0,076 ± 0,015 $p_2 < 0,01$
Экскреция белка с мочой, мг/2 ч	0,091 ± 0,009	0,302 ± 0,017 $p_1 < 0,01$	0,207 ± 0,027 $p_2 < 0,01$

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm m$  ( $n = 10$ );  $p_1$  — показатель достоверности по сравнению с данными контроля,  $p_2$  — показатель достоверности по сравнению с данными при ОПП.

Целью нашей работы стало изучение влияния церулоплазмينا на интенсивность липидной перекисидации и активность антиоксидантной системы в ткани почек и крови крыс в условиях острого повреждения почек, вызванного рабдомиолизом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на белых нелинейных половозрелых крысах массой 160–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на три группы по десять особей в каждой: первая группа — контроль, который составляли интактные животные; вторая группа — животные с экспериментальным ОПП, которое моделировали однократным введением 50%-го водного раствора глицерола в мышцы задних лапок из расчета 8 мл/кг массы тела [2,3]; животным третьей группы применяли церулоплазмин в дозе 7 мг/кг в сутки на протяжении трех суток до моделирования ОПП. С целью взятия материала для исследований осуществляли эвтаназию животных путем декапитации под легким эфирным наркозом через 24 ч развития ОПП.

Влияние церулоплазмينا на течение ОПП оценивали по показателям функционального состояния почек, интенсивности липидной и белковой перекисидации и активности ферментов антиоксидантной защиты. Функциональное состояние почек оценивали по уровню диуреза, креатинина в плазме крови, экскреции белка с мочой. Концентрацию креатинина в плазме крови определяли по методу Поппера в модификации Мерзона, содержание белка в моче — по реакции с сульфосалициловой кислотой [14].

Содержание малонового диальдегида определяли в эритроцитах и корковом веществе почек

по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой. Содержание продуктов окислительной модификации белков определяли по реакции с динитрофенилгидразином с образованием гидразонов, имеющих характерный спектр поглощения [15]. Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности в плазме крови и ткани почек глутатионпероксидазы, а также по содержанию церулоплазмينا и соединений с SH-группами в плазме крови. Активность глутатионпероксидазы оценивали по количеству восстановленного глутатиона, который определяли спектрофотометрически [15]. Содержание соединений с SH-группами оценивали по реакции с реактивом Элмана, а для определения церулоплазмينا использовали реакцию окисления фенилендиамина с участием церулоплазмينا и дальнейшее определение величины оптической плотности [14,15].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0. Оценку различий между выборками проводили с использованием параметрического  $t$ -критерия Стьюдента (при нормальном распределении переменных) и непараметрического  $U$ -критерия Манна–Уитни (в случае несоответствия данных нормальному распределению). Критический уровень значимости был принят за  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внутримышечное введение глицерола привело к нарушению функции почек и развитию ОПП (табл. 1). При исследовании экскреторной функции почек обнаружено, что у животных диурез уменьшился в 2,6 раза, экскреция креатинина — в 1,4 раза в сравнении с интактным контролем. В плазме крови наблюдалась значительная азотемия, уровень креатинина повысился в 3,6 раза. О

**Таблица 2.** Показатели прооксидантно-антиоксидантного равновесия в ткани почек и крови крыс при остром повреждении почек на фоне введения церулоплазмина

Показатели	Контроль	ОПП	ОПП + церулоплазмин
Содержание малонового диальдегида в эритроцитах крови, мкмоль/л	12,57 ± 0,98	23,14 ± 1,23 $p_1 < 0,01$	14,19 ± 0,93 $p_2 < 0,01$
Содержание малонового диальдегида в ткани почек, мкмоль/мг белка	36,37 ± 4,69	56,08 ± 2,80 $p_1 < 0,01$	40,99 ± 1,04 $p_2 < 0,01$
Содержание продуктов окислительной модификации белков в плазме крови, ммоль/мл	0,89 ± 0,04	1,39 ± 0,02 $p_1 < 0,01$	0,92 ± 0,04 $p_2 < 0,01$
Содержание продуктов окислительной модификации белков в ткани почек, ммоль/г	11,27 ± 0,41	18,57 ± 0,80 $p_1 < 0,01$	12,71 ± 0,98 $p_2 < 0,01$
Активность глутатионпероксидазы в плазме крови, мкмоль/(мин · л)	143,85 ± 5,6	104,81 ± 5,08 $p_1 < 0,01$	136,22 ± 8,08 $p_2 < 0,01$
Активность глутатионпероксидазы в ткани почек, мкмоль/(мин · мг белка)	226,03 ± 25,08	173,97 ± 36,19 $p_1 < 0,01$	234,92 ± 39,66 $p_2 < 0,01$
Содержание SH-групп в плазме крови, мкМ/мл	4,40 ± 0,14	3,03 ± 0,45 $p_1 < 0,01$	3,93 ± 0,11 $p_2 < 0,01$
Содержание церулоплазмина в плазме крови, мг/л	145,19 ± 5,77	101,19 ± 1,97 $p_1 < 0,01$	142,81 ± 3,90 $p_2 < 0,01$

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm m$  ( $n = 10$ );  $p_1$  – показатель достоверности по сравнению с данными контроля,  $p_2$  – показатель достоверности по сравнению с данными при ОПП.

повреждении почек также свидетельствовала выраженная протеинурия, наблюдалось увеличение экскреции белка с мочой в 3,3 раза. Применение церулоплазмина с профилактической целью в течение трех суток оказало позитивное влияние на функциональное состояние почек в условиях развития рабдомиолитической ОПП. Согласно полученным данным, диурез животных, которые получали препарат, был выше в 1,9 раза в сравнении с группой патологии, а уровень креатинина в плазме крови был ниже в 2,2 раза. При этом экскреция белка с мочой была меньше в 1,5 раза, что свидетельствует о нефропротекторных эффектах церулоплазмина в условиях рабдомиолиз-индуцированного острого повреждения почек.

Ключевую роль в патогенезе ОПП играет развитие оксидативного стресса, что проявляется активацией процессов перекисного окисления липидов и белков и угнетением активности антиоксидантной защиты [7,9]. Развитие ОПП у животных в условиях эксперимента привело к активации свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствовали показатели содержания малонового диальдегида, который увеличился в 1,8 раза в плазме крови и в 1,5 раза в ткани почек, а также повышение содержания продуктов окислительной модификации белков в 1,6 раза в крови и в 1,5 раза в ткани почек в сравнении с интактными животными. В то же время развитие ОПП сопровождалось угнетением антиоксидантной системы: активность глутатионпероксидазы в плазме крови половозрелых крыс уменьшилась

в 1,4 раза, в ткани почек – в 1,3 раза. Кроме того, содержание церулоплазмина в плазме крови снизилось в 1,4 раза, уровень SH-групп – в 1,5 раза по сравнению с данными контроля (табл. 2). Такая динамика основных показателей антиоксидантной системы свидетельствует о снижении механизмов защиты и неспособность клеток противодействовать процессам перекисаации.

Введение церулоплазмина способствовало предотвращению развития выраженного нарушения функции почек животных, что опосредовано способностью влиять на важные патогенетические механизмы развития острого повреждения почек – развитие оксидативного стресса [10,12]. Установлено, что в условиях рабдомиолиза под влиянием церулоплазмина содержание малонового диальдегида в крови ниже в 1,6 раза, а в ткани почек – в 1,4 раза, содержание продуктов окислительной модификации белков в 1,5 раза ниже в сравнении с группой патологии. При этом активность антиоксидантной системы увеличилась, в частности, активность глутатионпероксидазы была выше в 1,3 раза в крови и в 1,4 раза – в ткани почек. Под действием препарата также увеличивался уровень церулоплазмина в 1,4 раза и SH-групп в 1,3 раза в плазме крови по сравнению с модельной патологией. Таким образом, церулоплазмин в профилактическом режиме введения уменьшает прооксидантные процессы в условиях рабдомиолиза.

## ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований показывают, что церулоплазмин в профилактическом режиме введения уменьшает прооксидантные процессы и повышает активность антиоксидантной системы при моделировании рабдомиолиз-индуцированного острого повреждения почек, что способствует уменьшению проявлений нарушения функций почек и указывает на нефропротекторные эффекты действия церулоплазмина.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с Директивой Европейского союза 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Stahl, E. Rastelli, and B. Schoser, *J. Neurol.* (2019). DOI: 10.1007/s00415-019-09185-4.
2. И. И. Заморский, В. М. Драчук и А. М. Горошко, *Биофизика* **61** (5), 1022 (2016).
3. И. И. Заморский и Т. С. Щудрова, *Биофизика* **59** (5), 1023 (2014).
4. S. Wangko, *J. Biomedik.* **5** (3), 157 (2013).
5. J. Harty, *Ulster. Med. J.* **83** (3), 149 (2014).
6. B. B. Ratliff, W. Abdulmahdi, R. Pawar, and M. S. Wolin, *Antioxid. Redox Signal.* **25** (3), 119 (2016). DOI: 10.1089/ars.2016.6665
7. J. M. Dennis and P. K. Witting, *Nutrients* **9** (7), 718 (2017). DOI: 10.3390/nu9070718.
8. F. Tamay-Cach, J. C. Quintana-Perez, J. G. Trujillo-Ferrara, et al., *Ren. Fail.* **38** (2), 171 (2016). DOI: 10.3109/0886022X.2015.1120097.
9. Е. А. Чанчаева, Р. И. Айзман и А. Д. Герасев, *Экология человека* **7**, 50 (2013).
10. Я. А. Домбровский и М. Д. Иванова, *Почки* **1** (7), 71 (2014).
11. A. V. Sokolov, E. T. Zakharova, V. A. Kostevich, et al., *Biometals* **27** (5), 829 (2014).
12. G. Vashchenko and R. T. A. MacGillivray, *Nutrients* **5** (7), 2289 (2013). DOI: 10.3390/nu5072289
13. D. Wierzbicka and G. Gromadzka, *Postepy Hig. Med. Dosw.* (online), **68**, 912 (2014).
14. В. С. Камышников, *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике* (МЕДпресс, М., 2009).
15. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина и Н. Н. Зыбина, *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма* (Фолиант, СПб., 2000).

## Antioxidant Activity of Ceruloplasmin in Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury

I.I. Zamorskii, T.M. Unguryan, and S.P. Melnichuk

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

Rhabdomyolysis is a life-threatening syndrome that may occur after skeletal muscle injury and leads in 10 to 40% of all cases to acute renal tubular necrosis and acute kidney injury due to the impact of myoglobin that is released from damaged myocytes. Reactive oxygen species and oxidative stress are the major determinants of acute kidney injury. One of the main antioxidants in blood plasma is ceruloplasmin, which has many physiological functions. In the experiments carried out on non-linear white mature rats, we studied the impacts of ceruloplasmin on the functions of the kidneys and the prooxidant-antioxidant balance in the kidneys and blood of animals under experimental rhabdomyolysis. It has been established that prophylactic administration of ceruloplasmin has a renoprotective effect, improving the functions of the kidneys, reducing the intensity of lipid and protein peroxidation and increasing the activity of glutathione peroxidase in kidney tissue and blood, and the level of ceruloplasmin and molecules with SH-groups in blood plasma.

*Keywords: rhabdomyolysis, acute kidney injury, ceruloplasmin*