

# Експериментальна фізіологія та біохімія

УДК 616.61-036.12-053.3/8-092

Є.А. БУРЛАКА

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ  
Karolinska Institutet, Стокгольм

## Захисні ефекти ендogenousного стероїдного гормону оубаїн у щурів з пасивним нефритом Хейманна

Хронічне захворювання нирок (ХЗН) є кінцевим результатом прогресування більшості їхніх патологій. Однак, незважаючи на широкий спектр патофізіологічних процесів, які спричинюють пошкодження нирок, основними чинниками втрати при цьому є системна артеріальна гіпертензія, протеїнурія, що зумовлюють інтерстиціальний фіброз, втрату перитубулярних капілярів, тубулярну атрофію [8].

Компенсаторні реакції нефрону при цьому виявляються гіперфільтрацією, що посилює травму клубочків. Загальним виходом прогресування ХЗН є гломерулосклероз, тубуло-інтерстиційний фіброз, як результат проліферації клубочкових клітин, інфільтрації макрофагами, накопичення позаклітинного матриксу [13]. Клінічно погіршення функції нирок безпосередньо корелює зі ступенем тубуло-інтерстиційних пошкоджень та фіброзу [8,9].

Протенурія є основним та незалежним індуктором перелічених пошкоджень нирок. Білки ультрафільтрату засвоюють проксимально тубулярні клітини шляхом ендоцитозу, що є стимулом аномальної продукції цитокінів, які виділяються в інтерстиції, і призводить до міграції макрофагів, проліферації фібробластів, фіброзу, канальцевої атрофії. Кінцевим результатом прогресування більшості патологій нирок, що супроводжуються протеїнурією, є формування атубулярних клубочків [4, 6]. Експериментально доведено, що при дослідженні вкладу тубуло-інтерстиційних порушень при хронічному захворюванні нирок, з використанням моделі пошкодження нирок, — нефректомії, через 25 тижнів після операції, прогресивне ураження нирок було зумовлене порушенням нормального сполучення між клубочками та проксимальними канальцями. Тоді було припущено, що причиною клубочково-канальцевого роз'єднання є надмірна фільтрація білків плазми [4, 6, 7].

У зв'язку з можливою токсичністю білків, що реабсорбуються, є дані, які свідчать про ефективність блокування ангіотензинперетворювального ферменту (АПФ), при одночасному зниженні протеїнурії, що забезпечує захист від формування атубулярних клубочків. Ренопротекція при цьому забезпечується, в першу чергу, здатністю інгібіторів АПФ знижувати системний артеріальний тиск і поліпшувати розмір-селективні функції клубочкової мембрани за рахунок зниження розмірів фільтраційних пор [5]. Терапевтичні підходи щодо захисту нирок при хронічних захворюваннях, які асоціюються з протеїнурією, та спрямовані на захист тубулярного сегмента нефрону, є недостатньо розроблені.

Ми провели дослідження впливу ендогенного стероїдного гормону оуабаїн на пошкодження нирок при пасивному нефриті Хейманна (ПНХ).

Мета дослідження — визначити характер пошкодження нирок на експериментальній моделі їхнього хронічного захворювання, що асоціюється з протеїнурією (пасивний нефрит Хейманна), дослідити ефекти ендогенного стероїдного гормону оуабаїн за даних умов.

**Матеріали та методи досліджень.** У дослідженні були використані щури-самці лінії *Sprague-Dawley* віком 40 днів з початковою масою тіла 250...300 г. Усіх тварин тримали в кімнаті з постійним температурним режимом, 12-годинним циклом день-ніч, вільним доступом до стандартної дієти та води. Індукція пасивного нефриту Хейманна (ПНХ) була проведена шляхом внутрішньовенного введення специфічних *Anti-Fx-1A* антитіл дозою 66 мг/кг маси тіла. Усі тварини ( $n = 24$ ) були поділені на три групи. Першу становили тварини групи контролю ( $n = 8$ ). До II групи увійшли тварини з ПНХ ( $n = 8$ ). До III групи — щури з ПНХ, яким було забезпечено введення оуабаїну ( $n = 8$ ). Для введення оуабаїну всім щурам провели імплантацію підшкірних помп, що забезпечували його перманентне введення дозою 15 мкг/кг маси тіла/добу. Тривалість дослідження становила 4 місяці.

Рівень креатиніну плазми крові визначали спектрофотометрично після закінчення дослідження з використанням стандартного діагностичного набору (DICT-500 — *QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit, BioAssay Systems*) на спектрофотометрі *Wallac Victor<sup>3</sup>™ 1420 Multitable Counter*. Кров відбирали шляхом серцевої пункції після евтаназії тварин.

Вилучені нирки були зафіксовані протягом 6 год у фіксаторі *Dubosq-Brazil*, зневоднені в спирті й залиті парафіном. Накопичення колагену в нирках визначали шляхом фарбування тканини нирок *Sirius Red*. Для цього зрізи нирок товщиною 3 мкм інкубували в розчині *Sirius Red (Sigma-Aldrich)* в 500 мл насиченого водного розчину пікринової кислоти протягом 1 год з подальшим промиванням у розчині оцтової кислоти (5 мл оцтової кислоти в 1 л води). Після цього зрізи були зневоднені трикратно 100%-м етанолом, очищені в ксилолі й залиті в ксиленвмісному середовищі. Для аналізу використано 20–25 випадково вибраних ділянок кожного зрізу при збільшенні  $\times 200$ . Аналіз зображень проводили з використанням програмного забезпечення *ImageJ*. Дані представлені у вигляді показника площі тканини нирки, яку займає *Sirius Red*-позитивна тканина. Гломерулярні пошкодження були оцінені імуногістохімічно з використанням зафарбовування тканин нирок за методом *Silver Jones's*, що є специфічним для визначення стану гломерулярної базальної мембрани.

Матеріал опрацьовано з використанням методів варіаційної статистики (*STATISTICA 6.0*) — непараметричних статистичних підходів (*Mann-Whitney test*) та *two-way ANOVA (Fisher LCD post-hoc test)*. Результати представлено як *Mean*  $\pm$  *SEM*, статистично достовірним вважали рівень  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Усі тварини в експериментальних групах залишались живими протягом дослідження. Фізичний розвиток експериментальних тварин було оцінено шляхом вимірювання маси тіла під час дослідження. Щури з ПНХ мали статистично достовірно нижчу масу тіла порівняно з групою контролю (рис. 1). Тварини з нефритом Хейманна, яких лікували оуабаїном, мали тенденцію до нормальної маси тіла протягом всієї тривалості дослідження.

У всіх щурів з ПНХ розвинулась помірна ниркова недостатність на 4-й місяць експерименту. Функція нирок була оцінена за рівнем креатиніну плазми крові. У всіх щурів з ПНХ рівень креатиніну плазми крові був значно вищим порівняно з групою контролю ( $p < 0,01$ ). У

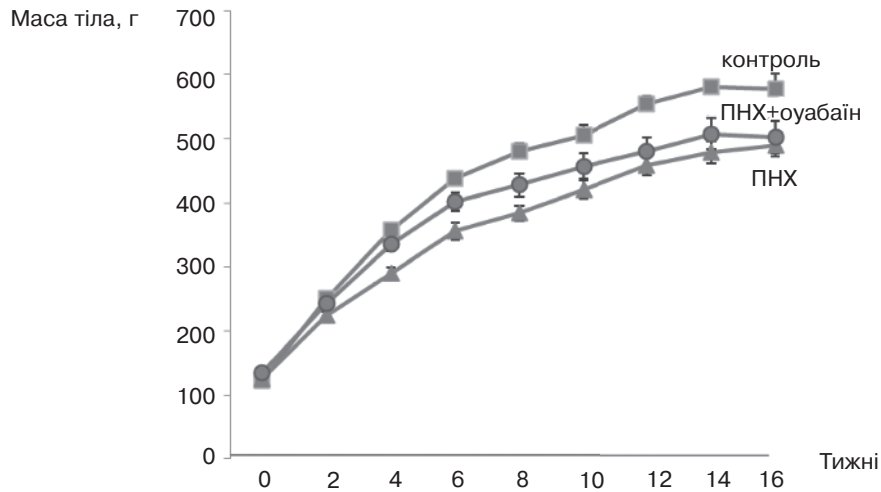


Рис. 1. Динаміка зміни маси тіла у щурів з пасивним нефритом Хейманна та під впливом оубаїну

тварин з ПНХ, які отримували оубаїн, рівень креатиніну сироватки був нижчим, ніж у тварин, яких не лікували, і вищим порівняно з контрольними тваринами ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

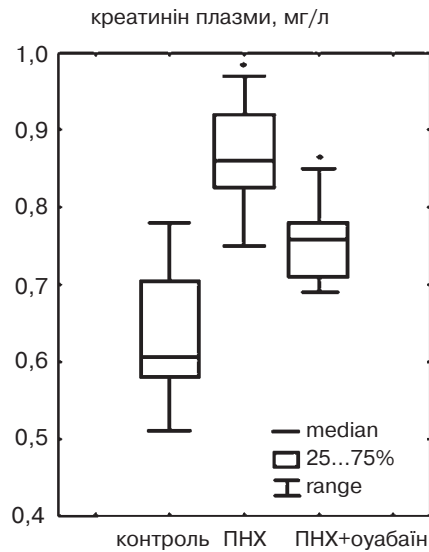


Рис. 2. Показники стану функції нирок експериментальних тварин

Відомо, що при хронічних захворюваннях нирок, які асоціюються з протеїнурією, важливу роль відіграють тубуло-інтерстиційні пошкодження. Запалення, що виникає в результаті персистентного впливу альбуміну, зумовлює втрату функції нирок [7, 8, 15]. Сукупний вплив інтерстиційного запалення та підвищеного тону системи ангіотензину II спричинюють розвиток вторинних пошкоджень, зокрема апоптозу [9–11]. Внаслідок вищеперелічених процесів відбувається пошкодження тубулярного сегмента нефрону, активація міофібробластів, фіброз, порушення захисної ауторегуляції клубочкового кровотоку, що призводить до гломерулосклерозу [11]. Епітеліальні клітини проксимальних каналців клітин, які зазнали впливу високих концентрацій білка, починають виділення прозапальних і профібротичних факторів [10].

Було досліджено рівень тубуло-інтерстиційного фіброзу з використанням методу імуногістохімічного зафарбовування колагену тканини нирки маркером *Sirius red*. Виявлено, що тканини нирок щурів з ПНХ мають високий рівень фіброзу, порівняно з групою контролю ( $3,73 \pm 0,2\%$  та  $1,9 \pm 0,07\%$  відповідно). Введення оуабайну забезпечило достовірне зниження цього показника до  $2,44 \pm 0,2\%$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

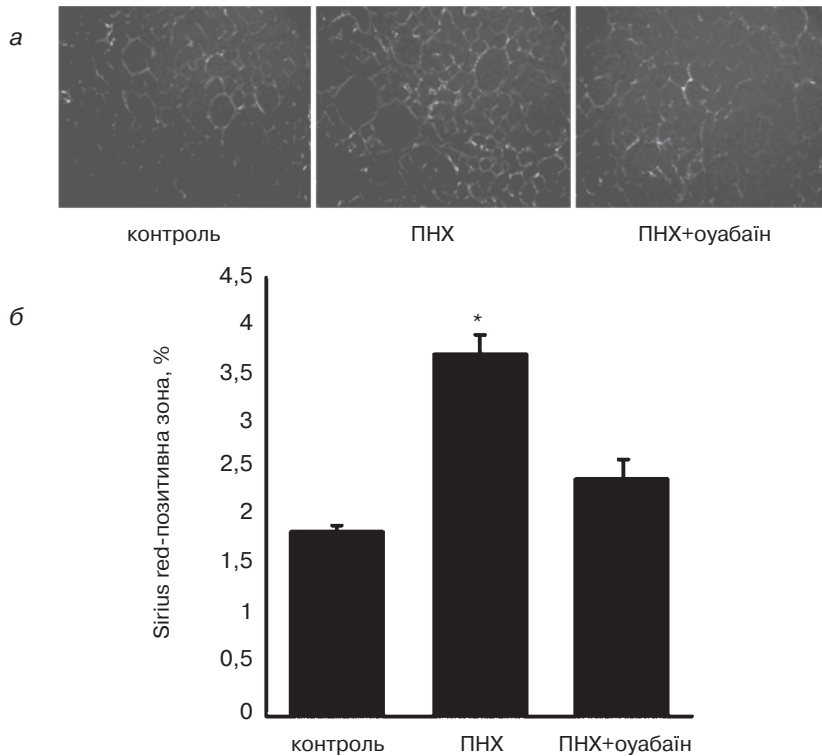


Рис. 3. Рівні тубуло-інтерстиційних пошкоджень у тварин з ПНХ та під впливом оуабайну: *a* — імуногістохімічна візуалізація колагену інтерстиція; *б* — рівні тубуло-інтерстиційних пошкоджень в експериментальних групах; \* $p < 0,05$

Гломерулярні пошкодження були оцінені імуногістохімічно з використанням зафарбовування тканин нирок за методом *Silver Jones's*, що специфічно для визначення стану гломерулярної базальної мембрани. Результати аналізу, зображені на рис. 4, свідчать про інтактність базальної мембрани у тварин групи контролю. Інтактна базальна мембрана мала вигляд чітко вираженої лінії. На противагу цьому, у тварин з ПНХ базальна мембрана характеризувалась наявністю спайок, що є ознаками її безпосереднього пошкодження. В структурі спайок ідентифікуються точки — сайти локалізації антитіл, компонентів комплексу. При порівнянні стану гломерулярної базальної мембрани щурів з ПНХ та тварин з ПНХ, яких лікували оуабайном, виявлено, що вплив оуабайну знижує вираженість пошкоджень базальної мембрани. Позитивний вплив оуабайну проявлявся зниженням інтенсивного вираження спайок та точок.

Ендогенні кардіотонічні стероїди відомі також як дигіталісподібні фактори, які відіграють важливу роль у регуляції низки фізіологічних функцій. Зокрема, вони беруть участь у регуляції артеріального тиску, процесів росту та диференціації клітин, апоптозу, фіброзу, контролю та модулювання імунної відповіді, метаболізму вуглеводів [12].

Мішенню ендогенних стероїдних гормонів, зокрема оуабайну, є  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза — активна транспортна система іонів натрію та калію, наявна в мембранах усіх еукаріотичних клітин [12, 14]. Активація  $\text{Na}^+$ /

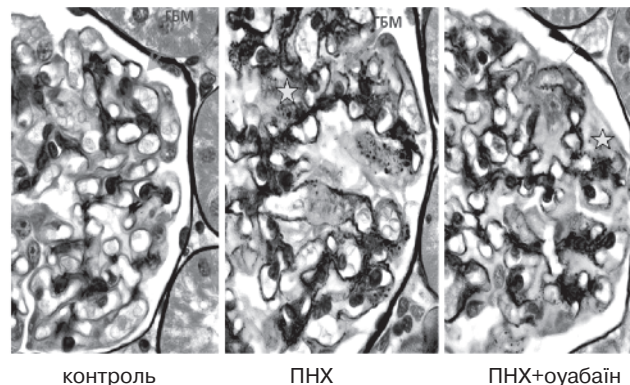


Рис. 4. Пошкодження гломерулярної базальної мембрани щурів з пасивним нефритом Хейманна та вплив оуабаїну на стан пошкоджень

$K^+$ -АТФази відбувається у відповідь на зміни концентрацій іонів натрію та калію, здійснюючи при цьому активне транспортування іонів крізь плазматичну мембрану, використовуючи енергію гідролізу АТФ.  $Na^+/K^+$ -АТФаза контролює численні клітинні функції — підтримку електричного потенціалу мембрани, що необхідний для нервової трансмісії, скорочення м'язів, регуляції апоптозу, розмноження та диференціювання клітин [3, 14, 16]. Відомо 4 ізоформи  $Na^+/K^+$ -АТФази, які відрізняються розташуванням в різних типах тканин і чутливістю до ендогенних стероїдних гормонів. Перша ізоформа ферменту є убіквітарною, а найбільша скупченість її виявлена в клітинах нирок [12].

Раніше ми проілюстрували на моделі гострого пошкодження нирок *in vitro*, що ендогенний стероїдний гормон оуабаїн має позитивний захисний вплив внаслідок активації антиапоптозного сигнального шляху. Останній реалізується за рахунок активації сигнальної функції  $Na, K$ -АТФази у первинній культурі проксимально-тубулярних клітин [1].

Сигнальна функція  $Na^+/K^+$ -АТФази індукується під впливом оуабаїну через L-тип вольтажозалежних  $Ca^{2+}$  каналів і каналів, що відіграють роль резервуарів іонів кальцію. При цьому відбувається активація 1,4,5-трифосфатних рецепторів (*IP3R*), внаслідок чого рееструються повільні осциляції кальцію та як наслідок — переміщення фактора *NF-κB* в ядро. За таким механізмом відбувається регуляція життєвого циклу клітини — запобігання апоптозу та стимуляція розмноження, зокрема проксимально тубулярних клітин [2].

У нашому дослідженні протективні ефекти оуабаїну стосуються його впливу на проксимальний сегмент нефрону за умов хронічного пошкоджувального впливу альбумінурії. За рахунок активації антиапоптозного сигнального шляху проксимально-тубулярних клітин оуабаїн забезпечує нефропротективні ефекти, що реалізуються на рівні проксимального сегмента нефрону. Врешті відновлення номельного функціонування проксимального каналця забезпечує поліпшення структурно-функціонального стану нефрону загалом за рахунок відновлення локальної гемодинаміки, гломерулярно-тубулярного сполучення, запобігання формуванню атубулярних клубочків. Захисні властивості оуабаїну мають прояви на показники фізичного розвитку експериментальних тварин і показники функції нирок.

**Висновки.** Прогресування ПНХ характеризується вираженою недостатністю функції нирок, про що свідчить високий рівень креатинінемії, виражені гломерулярні (пошкодження гломерулярної базальної мембрани) та тубуло-інтерстиційні пошкодження (фіброз). Виявлено позитивний вплив оуабаїну на фізичний розвиток експериментальних тварин, показники функції нирок, рівні патоморфологічних порушень.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Майданник В.Г., Бурлака Є.А., Аперія А. та ін. Гемолітико-уремічний синдром і механізми ренопротективної функції ендогенних стероїдних гормонів // Здоров'я України. — 2011. — Т. 2, № 17. — С. 10–11.
2. Aizman O., Uhlen P., Lal M. et al. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2001. — Vol. 98. — P. 13420–13424.
3. Cheng X., Fisone G., Aizman O. et al. PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na(+)-K(+)-ATPase in response to beta-adrenergic hormone // Am. J. Physiol. — 1997. — Vol. 273. — P. 893–901.
4. Hemmelgarn B., Manns B., Lloyd A. et al. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes // The Journal of the American Medical Association. — 2010. — Vol. 303. — P. 423–429.
5. Lutz J., Risch B., Liu S. et al. Angiotensin type 1 and type 2 receptor blockade in chronic allograft nephropathy // Kidney Int. — 2006. — Vol. 70(6). — P. 1080–1088.
6. Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure // Intern Med. — 2004. — Vol. 43. — P. 9–17.
7. Nakhoul N., Batuman V. Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease // Contrib Nephrol. — 2011. — Vol. 169. — P. 37–50.
8. Perico N., Codreanu I., Schieppati A., Remuzzi G. Pathophysiology of disease progression in proteinuric nephropathies. Kidney Int 2005;67:S79–S82.
9. Perticone F., Maio R., Tripepi G. et al. Microalbuminuria, endothelial dysfunction and inflammation in primary hypertension // J. Nephrol. — 2007. — Vol. 20, Suppl 12. — P. 56–62.
10. Rodriguez-Iturbe B., Johnson R., Herrera-Acosta J. Tubulointerstitial damage and progression of renal failure // J. Kidney Int. — 2005. — Vol. 68. — P. 82–86.
11. Satirapoj B., Nast C., Adler S. Novel insights into the relationship between glomerular pathology and progressive kidney disease // Adv. Chronic. Kidney Dis. — 2012. — Vol. 19(2). — P. 93–100.
12. Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones // Eur. J. Biochem. — 2002. — Vol. 269. — P. 2440–2448.
13. Staples A., Smith J., Gipson D. et al. Risk factors associated with progression of pediatric chronic kidney disease // E-PAS. — 2007. — Vol. 61. — P. 7919–7925.
14. Vagin O., Dada L., Tokhtaeva E. et al. The Na-K-ATPase  $\alpha_1\beta_1$  heterodimer as a cell adhesion molecule in epithelia / O. Vagin, L. Dada, E. Tokhtaeva, G. Sachs // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2012. — Vol. 302(9). — P. 1271–1281.
15. Van Timmeren M., Bakker S., Vaidya V. et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. — 2006. — Vol. 291. — P. 456–464.
16. Xie Z., Cai T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function // Mol. Interv. — 2003. — Vol. 3. — P. 157–168.

Стаття надійшла до редколегії 17.10.12

### **ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭНДОГЕННОГО СТЕРОИДНОГО ГОРМОНА ОУАБАИН У КРЫС С ПАССИВНЫМ НЕФРИТОМ ХЕЙМАННА**

**Е.А. БУРЛАКА**

Исследованы патоморфологические процессы, которые приводят к нарушению функции почек при пассивном нефрите Хейманна у крыс. Выявлено, что прогрессирование нефрита Хейманна происходит как за счет гломерулярных (повреждение гломерулярной базальной мембраны), так и тубуло-интерстициальных (тубуло-интерстициальный фиброз) повреждений. Выявлены защитные эффекты эндогенного стероидного гормона оуабаин при пассивном нефрите Хейманна, влияющие на показатели физического развития экспериментальных животных, функции почек, патоморфологические субстраты заболевания.

**Ключевые слова:** хроническое заболевание почек, пассивный нефрит Хейманна, оуабаин.

### **PROTECTIVE EFFECTS OF AN ENDOGENOUS STEROID HORMONE OUABAIN IN RATS WITH PASSIVE HEYMANN NEPHRITIS**

**E. BURLAKA**

Pathomorphological disorders that lead to renal failure in the passive Heymann nephritis in rats were studied. It has been found that progression of Passive Heymann Nephritis occurs due to glomerular (damage to glomerular basement membrane) and tubulo-interstitial (tubulo-interstitial fibrosis) damage. Protective effects of endogenous steroid ouabain in the Passive Heymann Nephritis, manifested on the physical parameters of the experimental animals, renal function, pathological substrates of the disease were evaluated.

**Key words:** chronic kidney disease, Passive Heymann Nephritis, ouabain.