

Протективное влияние комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета, и инфликсимаба на эпителий канальцев нефрона при ишемически-реперфузионном повреждении почек

А.С. Нетребенко¹, В.В. Гуреев¹✉, М.В. Покровский¹, В.И. Якушев¹,
Е.Г. Сапрыкина¹, М.А. Затолокина^{2,3}

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

² Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

³ Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

Аннотация. Введение. В связи с тяжелым клиническим течением и высокой социально-экономической значимостью острого повреждения почек на повестке ученого сообщества всего мира остро стоит вопрос о методах диагностики и лечения данной патологии. Одним из наиболее специфичных биомаркеров острого повреждения почек является KIM-1. KIM-1 представляет собой апикальный трансмембранный белок проксимального отдела почечных канальцев. Повышенные уровни KIM-1 при моделировании ишемически-реперфузионной травмы почек коррелируют с воспалением и фиброзом в гистологических исследованиях. Целью данной работы явилось исследование протективных эффектов комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), и инфликсимаба на эпителий канальцев нефрона при ишемически-реперфузионном повреждении почек. **Материалы и методы.** Эксперимент проводился на 80 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 г. Животным вводили пептид, имитирующий альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), и инфликсимаб. Под наркозом выполнялось наложение атравматичных сосудистых зажимов на левую почечную ножку на 40 мин, нефрэктомия справа. В течение 12 ч после реперфузии производился сбор образцов мочи для лабораторных исследований. **Результаты.** По результатам эксперимента установлено, что использование комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), и инфликсимаба более эффективно защищало эпителий канальцев нефрона от повреждений при ишемически-реперфузионной травме почек, чем введение пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета, или инфликсимаба в монорежиме. **Выводы.** Результаты проведенного исследования наглядно обосновывают перспективность совместного применения пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), и инфликсимаба с целью протекции эпителия канальцев нефрона от ишемически-реперфузионного повреждения.

Ключевые слова: pHBSP, инфликсимаб, ишемически-реперфузионное повреждение почек, KIM-1

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

Protective effect of a combination of the peptide mimicking the spatial structure of the B erythropoietin chain and infliximab on the epithelium of the nephron tubules in renal ischemia-reperfusion injury

A.S. Ntrebenko¹, V.V. Gureev¹✉, M.V. Pokrovskiy¹, V.I. Yakushev¹, E.G. Saprykina¹, M.A. Zatolokina^{2,3}

¹ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

² Kursk State Medical University, Kursk, Russia

³ I.S. Turgenev Orel State University, Orel, Russia

Abstract. Purpose: Due to the severe clinical course and the high socio-economic significance of acute kidney injury, the issue of methods for diagnosing and treating this pathology is on the agenda of the scientific community around the world. One of the most specific biomarkers of acute kidney injury is KIM-1. KIM-1 is an apical transmembrane protein of the proximal renal tubule. Elevated levels of KIM-1 in a model of ischemia-reperfusion injury of the kidneys correlate with inflammation and fibrosis in histological studies. The aim of this work was to study the protective effects of a combination of a peptide mimicking the α -helix B of erythropoietin (pHBSP) and infliximab on the epithelium of nephron tubules in ischemia-reperfusion injury of the kidneys. **Methods:** The experiment was conducted on 80 white laboratory male Wistar rats weighing 280–320 g. Animals were injected with a peptide mimicking the α -helix B of erythropoietin (pHBSP) and infliximab. Under anesthesia, atraumatic vascular clamps were applied to the left renal pedicle for 40 minutes, nephrectomy on the right. Within 12 hours after reperfusion, urine samples were collected for laboratory studies. **Results:** According to the results of the experiment, it was found that the use of a combination

of a peptide mimicking the α -helix B of erythropoietin (pHBSP) and infliximab more effectively protected the epithelium of the nephron tubules from damage during ischemia-reperfusion injury of the kidneys than the administration of a peptide mimicking the α -helix B of erythropoietin or infliximab in mono mode. **Conclusion:** The results of the study clearly substantiate the prospects for the combined use of a peptide mimicking the α -helix B of erythropoietin (pHBSP) and infliximab to protect the nephron tubule epithelium from ischemia-reperfusion injury.

Keywords: pHBSP, infliximab, renal ischemia-reperfusion injury, KIM-1

В связи с тяжелым клиническим течением и высокой социально-экономической значимостью острого повреждения почек (ОПП) на повестке ученого сообщества всего мира остро стоит вопрос о методах диагностики и лечения данной патологии. Одним из наиболее специфичных биомаркеров острого повреждения почек является KIM-1. KIM-1 представляет собой апикальный трансмембранный белок проксимального отдела почечных канальцев. Повышенные уровни KIM-1 при моделировании ишемически-реперфузионной травмы почек коррелируют с воспалением и фиброзом в гистологических исследованиях [1].

При ишемическом/токсическом повреждении почки внеклеточный домен KIM-1 отделяется от мембраны под действием матриксной металлопротеиназы (ММП), что приводит к значительному повышению уровня KIM-1 в моче [2]. Так, у пациентов с ОПП концентрация KIM-1 в моче может превышать норму в 50 и более раз [3]. KIM-1 подавляет секрецию цитокинов клетками проксимальных канальцев, модулирует трансляционные изменения посредством пути ядерного фактора kappa-light-chain-enhancer активированных бета-клеток (NF- κ B) [4]. Экспериментально доказано, что нарастающая экспрессия гена KIM-1 отражает продолжающееся повреждение различных тубулоинтерстициальных сегментов нефрона и коркового вещества почек [5]. По этим причинам авторы начали рассматривать KIM-1 как биомаркер, способный выявлять раннее ОПП и даже играть возможную прогностическую роль [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Диагностика протективных эффектов комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), и инфликсимаба на эпителий канальцев нефрона с помощью определения биомаркера KIM-1 в моче при ишемически-реперфузионном повреждении почек.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на базе Центра доклинических и клинических исследований ФГАОУ ВО НИУ БелГУ. Этические нормы обращения с лабораторными животными соответствовали Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22Sep2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

Эксперимент проводился на 80 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 г. Животные были разделены на 8 групп, по 10 особей в каждой:

1. Ложнооперированные животные.
2. Ишемия/реперфузия (I/R (контроль)).
3. Ишемия-реперфузия + рекомбинантный эритропоэтин 50 МЕ/кг внутривнутрибрюшинно за 30 мин до моделирования ишемии.
4. Ишемия/реперфузия + пептид, имитирующий альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), 5 мкг/кг внутривнутрибрюшинно за 30 мин до моделирования ишемии.
5. Ишемия/реперфузия + пептид, имитирующий альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), 25 мкг/кг внутривнутрибрюшинно за 30 мин до моделирования ишемии.
6. Ишемия/реперфузия + Инфликсимаб [Remicade®, MSD Ireland (Brinney)] 2 мг/кг внутривнутрибрюшинно за 1 ч до моделирования ишемии.
7. Ишемия/реперфузия + Инфликсимаб [Remicade®, MSD Ireland (Brinney)] 10 мг/кг внутривнутрибрюшинно за 1 ч до моделирования ишемии.
8. Ишемия/реперфузия + пептид, имитирующий альфа-спираль эритропоэтина бета (pHBSP), 25 мкг/кг внутривнутрибрюшинно за 30 мин до моделирования ишемии + Инфликсимаб [Remicade®, MSD Ireland (Brinney)] 10 мг/кг внутривнутрибрюшинно за 1 ч до моделирования ишемии.

Под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг внутривнутрибрюшинно) после предварительной обработки передней брюшной стенки выполнялась срединная лапаротомия. Петли кишечника мобилизовывались, вскрывалось забрюшинное пространство, производилось выделение почки с элементами почечной ножки. Выполнялось наложение атравматичных сосудистых зажимов на левую почечную ножку на 40 мин с последующей реперфузией. Эффективность наступления ишемии оценивалась по изменению цвета почки. Нефрэктомия справа [7]. Далее в брюшную полость вводили 4–5 мл теплого 0,9%-го раствора натрия хлорида, затем рану послойно ушивали.

В послеоперационном периоде животные находились в специальных метаболических клетках для сбора мочи в течение 12 часов с обеспечением свободного доступа к воде.

После окончания сбора образцы мочи предварительно центрифугировали при 1 500 об./мин в течение 15 мин и хранили при температуре -70°C до момента исследования. Определение концентрации KIM-1 в моче производили с помощью набора для ИФА Rat KIM-1 ELISA Kit (Elabscience Biotechnology Inc., США) с использованием автоматического прибора Watcher Bio-RAD PW40 и иммуноферментного анализатора Microplate reader Bio-RAD 680 (Bio-RAD Laboratories Inc., США).

Статистическую обработку проводили с использованием программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека *normtest*), оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене (библиотека *lawstat*). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела – Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве *post-hoc* анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна – Уитни, соответственно, с поправкой Бенджамини – Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе уровня КИМ-1 в моче ложнооперированных животных зарегистрирован результат ($0,35 \pm 0,03$) нг/мл, что сопоставимо с данным, опубликованными в международной и отечественной литературе [8]. При моделировании ишемически-реперфузионной травмы почки спустя 12 ч реперфузии показатель КИМ-1 в моче животных данной группы составил ($12,5 \pm 0,8$) нг/мл, что достоверно свидетельствует о выраженных патологических изменениях в эпителии проксимальных отделов трубочек нефрона.

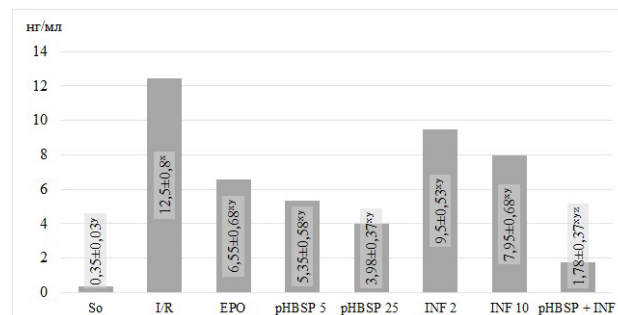
Введение рекомбинантного человеческого эритропоэтина оказывало достоверный нефропротективный эффект, что подтверждается снижением уровня КИМ-1 мочи до ($6,55 \pm 0,68$) нг/мл, что, однако, более чем в 18 раз превосходит данный показатель у ложнооперированных животных.

Значительное дозозависимое ренопротективное действие отмечено на фоне профилактики ишемически-реперфузионных повреждений пептидом, имитирующим альфа-спираль эритропоэтина бета (рНВСП, АРА290) в дозе 5 и 25 мкг/кг: показатель уровня КИМ-1 в группе животных рНВСП 25 мкг/кг был в 1,6 раза ниже, чем в группе животных, получавших рекомбинантный эритропоэтин.

На фоне применения инфликсимаба в обеих дозировках отмечено достоверное, но менее выраженное снижение показателя повреждения апикальной мембраны проксимального тубулярного эпителия: уровень КИМ-1 в группах животных, получавших инфликсимаб в дозировке 2 и 10 мг/кг, составил соответственно ($9,5 \pm 0,53$) и ($7,95 \pm 0,68$) нг/мл.

Наиболее выраженный протективный эффект на эпителий проксимальных канальцев нефрона отмечен при профилактическом введении комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета,

и инфликсимаба: показатель КИМ-1 в моче у данной группы животных был наиболее приближен к уровню КИМ-1 в моче ложнооперированных животных, в 7 раз ниже, чем в группе ишемии-реперфузии, и более чем в 2 раза ниже, чем данный показатель при применении рНВСП в дозе 25 мкг/кг или инфликсимаба в дозе 10 мг/кг в монорежиме (рис.).



^x $p < 0,05$ в сравнении с группой ложнооперированных животных;

^y $p < 0,05$ в сравнении с группой ишемии-реперфузии; ;

^z $p < 0,05$ в сравнении группы комбинированной терапии рНВСП + Инфликсимаб с группой монотерапии рНВСП (25 мкг/кг) и с группой монотерапии Инфликсимаб (10 мг/кг)

Рис. Уровень КИМ-1 в моче исследуемых групп животных через 12 часов реперфузии

Белок КИМ-1 обладает свойствами идеального маркера почечного повреждения: его концентрация в моче минимальна при нормальной работе почек и резко повышается при повреждении апикальной мембраны проксимального тубулярного эпителия, персистируя до полного восстановления функции канальцев. Благодаря этим качествам в данной работе использовали диагностику уровня КИМ-1 мочи в качестве оценки степени тяжести развития острого повреждения почек в эксперименте, а также изменения его уровня в зависимости от введения исследуемых препаратов, что может показать степень их нефропротективной активности на ранних, доклинических этапах (спустя 12 ч реперфузии), и косвенно охарактеризовать прогноз исхода моделируемого ОПН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги проведенного эксперимента подтверждают наличие ренопротективных эффектов от применения пептида, имитирующего имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета, и инфликсимаба с целью снижения декструктивных процессов в эпителии канальцев нефрона при моделировании ишемически-реперфузионной травмы почек, что подтверждается снижением уровня КИМ-1 в моче исследуемых животных в сравнении с группой моделирования патологии. Наиболее выраженное защитное действие продемонстрировало применение комбинации изучаемых веществ: на фоне сочетанного введения пептида, имитирующего имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета, и инфликсимаба показатель КИМ-1

составил $(1,78 \pm 0,37)$ нг/мл, что достоверно ниже, чем при профилактике ишемически-реперфузионной травмы пептидом, имитирующим имитирующего альфа-спираль эритропоэтина бета, или инфликсимабом при их селективном использовании. Данный результат подтверждает значительное протективное действие данной комбинации на эпителий канальцев нефрона, что способствует снижению биохимических маркеров нарушения функции почек и восстановлению фракционной экскреции натрия.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Ornellas F.M., Ornellas D.S., Martini S.V. et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy accelerates renal ischemia-reperfusion injury recovery by modulating inflammatory, antioxidant and apoptotic related molecules. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41(5):1736–1752. doi: 10.1159/000471866.
2. Tsuji S., Sugiura M., Tsutsumi S., Yamada H. Sex differences in the excretion levels of traditional and novel urinary biomarkers of nephrotoxicity in rats. *The Journal of toxicological sciences*. 2017;42(5):615–627. doi: 10.2131/jts.42.615.

3. Vaidya V.S., Ozer J.S., Dieterle F. et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nature Publishing Company*. 2010;28(5):478–485. doi: 10.1038/nbt.1623.
4. Brooks C.R., Bonventre J.V. KIM-1/TIM-1 in proximal tubular cell immune response. *Oncotarget*. 2015;29(6(42)):44059–44060.
5. Schulz C.A., Engström G., Nilsson J. et al. Plasma kidney injury molecule-1 (p-KIM-1) levels and deterioration of kidney function over 16 years. *Nephrology, dialysis, transplantation*. 2020;35(2):265–273. doi: 10.1093/ndt/gfy382.
6. Tsigou E., Psallida V., Demponeras C. et al. Role of new biomarkers: functional and structural damage. *Critical care research and practice* 2013;2013:361078. doi: 10.1155/2013/361078.
7. Netrebenko A.S., Gureev V.V., Pokrovskii M.V. et al. Assessment of the Nephroprotective Properties of the Erythropoietin Mimetic Peptide and Infliximab in Kidney Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Archives of Razi Institute*. 2021; 76(4):995–1004.
8. Han W.K., Bailly V., Abichandani R. et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney international*. 2002;62(1):237–244.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Александр Сергеевич Нетребенко – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; AlexNetrebenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2212-0508>

Владимир Владимирович Гуреев – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт фармакологии живых систем, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; produmen@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1433-1225>.

Михаил Владимирович Покровский – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель, Научно-исследовательский институт фармакологии живых систем, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; mpokrovsky@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2761-6249>

Владимир Иванович Якушев – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; vladiyakush@yandex.ru

Елена Геннадьевна Сапрыкина – ординатор кафедры госпитальной хирургии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; Lena.saprykina5555@yandex.ru

Мария Алексеевна Затолокина – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

Статья поступила в редакцию 29.03.2023; одобрена после рецензирования 02.06.2023; принята к публикации 16.06.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Alexander S. Netrebenko – Postgraduate Student of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; AlexNetrebenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2212-0508>

Vladimir V. Gureev – Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher, Research Institute of Pharmacology of Living Systems, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; produmen@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1433-1225>

Mikhail V. Pokrovsky – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Head, Research Institute of Pharmacology of Living Systems, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; mpokrovsky@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2761-6249>

Vladimir I. Yakushev – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; vladiyakush@yandex.ru

Elena G. Saprykina – Resident of the Department of Hospital Surgery, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; Lena.saprykina5555@yandex.ru

Maria A. Zatolokina – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

The article was submitted 29.03.2023; approved after reviewing 02.06.2023; accepted for publication 16.06.2023.