

## РАБДОМИОЛИЗ-ИНДУЦИРОВАННОЕ ОСТРОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ПОЧЕК И РЕНОПРОТЕКЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ

© 2019 г. И.И. Заморский, Т.С. Шудрова, Е.А. Дудка

*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 – клинический синдром, вызываемый повреждением скелетных мышц и часто осложняющийся развитием острого повреждения почек. В экспериментах на лабораторных нелинейных белых половозрелых крысах изучен ренопротективный потенциал мелатонина (5 мг/кг) при рабдомиолиз-индуцированном остром повреждении почек. Обнаружено, что однократное введение глицерола в дозе 8 мл/кг приводит к развитию олигурической формы острой почечной недостаточности, что сопровождается снижением скорости клубочковой фильтрации, увеличением концентрации креатинина в плазме крови, гиперкалиемией, ацидурией, значительной протеинурией и нарушением реабсорбционной функции нефронов. Установлено, что применение мелатонина оказывает цитопротекторный эффект по отношению к эпителиоцитам почечных канальцев, значительно ограничивая степень повреждения, что предупреждает развитие олигурии, ретенционной азотемии, значительные потери ионов натрия, способствует уменьшению протеинурии и повышению рН мочи. Протекторный эффект обеспечивается антиоксидантной активностью мелатонина, что предупреждает индукцию окислительного стресса в почках. Полученные результаты исследований обосновывают перспективность дальнейшего изучения ренопротективного потенциала мелатонина в условиях почечной патологии различного генеза.

*Ключевые слова: рабдомиолиз, острое повреждение почек, мелатонин, ренопротекция.*

**DOI:** 10.1134/S0006302919050223

Рабдомиолиз – это нарушение целостности скелетных мышц, приводящее к попаданию содержимого мышечных клеток, включая электролиты, миоглобин, креатинкиназу, лактатдегидрогеназу и другие внутриклеточные белки в системный кровоток и внеклеточное пространство [1]. Рабдомиолиз может быть вызван различными физическими или химическими повреждениями мышечной ткани. Наиболее часто к развитию рабдомиолиза приводят прямое травматическое повреждение или компрессия мышц (краш-синдром), интенсивная физическая нагрузка или длительный постельный режим, мышечная ишемия, инфекции, электролитные и метаболические расстройства, генетические заболевания, токсины и лекарственные средства, а также температурно-индуцированные состояния, такие как злокачественный нейрорептический синдром и злокачественная гипертермия [1–3]. Клинически рабдомиолиз варьирует от бессимптомного, с повышением уровня креатинкиназы, до

угрожающего жизни состояния, связанного с острым повреждением почек (ОПП) и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови. ОПП является наиболее распространенным опасным для жизни системным осложнением рабдомиолиза, которое встречается с частотой от 10 до 55% и сопровождается неблагоприятным прогнозом, особенно при наличии полиорганной недостаточности [3–5]. Развитие ОПП обусловлено накоплением нефротоксического миоглобина в почках, а также гипоперфузией почек в результате системной гиповолемии. В настоящее время лечение рабдомиолиз-индуцированного ОПП основано на симптоматической поддерживающей и заместительной терапии (внутривенное введение жидкостей, бикарбоната, гемодиализ), при этом смертность остается высокой [4,5].

Гормон эпифиза мелатонин известен как основной регулятор биоритмов, обладающий органопротекторными свойствами в условиях различных патологий, что способствует его активному изучению с целью расширения спектра клинического применения [6]. Безусловными преимуществами мелатонина является его природное

*Сокращения:* ОПП – острое повреждение почек,  $\gamma$ -ГТП – гамма-глутамилтранспептидаза.

происхождение, доступность и относительная безопасность как лекарственного вещества, благодаря чему мелатонин является потенциальным терапевтическим средством [7,8].

Целью данного исследования было изучение эффективности применения мелатонина с целью патогенетической коррекции экспериментального рабдомиолиз-индуцированного ОПП.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах массой 150–200 г, которые находились в стандартных условиях вивария с поддержанием постоянной температуры и влажности, доступом к воде и пище (комбикорм полнорационный) *ad libitum*. Животные были рандомизированы в три группы по семь особей в каждой: группа I – контрольная, группа II – рабдомиолиз-индуцированное ОПП (однократное внутримышечное введение 50%-го раствора глицерола в дозе 8 мл/кг), группа III – двукратное введение мелатонина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 5 мг/кг через 1 ч и 24 ч после введения глицерола.

Для оценки функционального состояния почек через 48 ч после введения глицерола в условиях индуцированного водного диуреза (энтеральное введение внутрижелудочным зондом подогретой до 37°C питьевой воды в объеме 5% от массы тела) у животных в течение 2 ч собирали мочу. Эвтаназию крыс осуществляли декапитацией под барбитуровым наркозом (тиопентал натрия, 80 мг/кг), с последующим забором крови и почек для биохимического исследования.

Функцию почек оценивали по показателям диуреза, клиренса креатинина, уровня креатинина в плазме крови, экскреции белка с мочой, концентрации и экскреции ионов натрия и калия, рН мочи. Концентрацию креатинина определяли по реакции Яффе, содержание белка в моче сульфосалициловым методом, для определения концентрации ионов калия и натрия использовали метод пламенной фотометрии. Стандартизацию показателей функции почек проводили пересчетом их абсолютных величин на единицу массы тела или на 100 мкл клубочкового фильтрата. В моче определяли активность маркерного фермента повреждения почечных канальцев – гамма-глутамилтранспептидазы ( $\gamma$ -ГТП) по реакции с L- $\gamma$ -глутамил-*n*-нитроанилидом с использованием стандартного набора реактивов («Реагент», Украина). В ткани почек определяли активность ключевого фермента энергетического обмена сукцинатдегидрогеназы по интенсивности восстановления феррицианида калия, ферментов антиоксидантной защиты – каталазы по реакции с молибдатом аммония и глутатионпероксидазы

по количеству восстановленного глутатиона, содержание конечных продуктов перекисидации липидов – малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой кислотой и окислительно-модифицированных белков по количеству образованных гидразонов в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [9–11].

Статистическую обработку 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. Критическим уровнем значения был принят  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патогенетический каскад, лежащий в основе рабдомиолиза и его осложнений, обусловлен двумя основными иницирующими механизмами – снижением энергообеспечения миоцитов и образованием активных форм кислорода, приводящими к митохондриальной дисфункции и активации апоптоза с последующей гибелью клеток. Высвобождение внутриклеточного содержимого вызывает локальное повреждение капилляров, секвестрацию жидкости во внеклеточном пространстве поврежденных мышц с последующей системной гиповолемией, ишемией, метаболическим ацидозом и различными осложнениями, среди которых наиболее часто развивается ОПП [1–3].

Развитие ОПП при рабдомиолизе связано прежде всего со снижением почечного кровотока вследствие уменьшения объема циркулирующей крови и активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, что приводит к ишемическому повреждению нефронов. Важнейшим почечным токсином при рабдомиолизе выступает высвобожденный из мышечных клеток белок миоглобин, выделяющий ионы железа, которые генерируют активные формы кислорода с последующим повреждением мембран клеток канальцев. В условиях ацидификации мочи в дистальных отделах нефрона происходит образование цилиндров из миоглобина и мочевой кислоты, что приводит к канальцевой обструкции [4–5].

В нашем исследовании во II группе животных с рабдомиолиз-индуцированным ОПП наблюдалось значительное увеличение уровня  $\gamma$ -ГТП в моче, что указывает на повреждение и гибель клеток почечных канальцев. ОПП проявлялось развитием олигурии, двукратным повышением уровня креатинина и калия в плазме крови, значительной протеинурией, гипернатриурией, гиперкалиурией и критическим снижением рН мочи по сравнению с данными контроля (табл. 1).

**Таблица 1.** Показатели функционального состояния почек крыс при введении мелатонина на фоне развития рабдомиолиз-индуцированного ОПП

Показатель	Контроль	Рабдомиолиз-индуцированное ОПП	ОПП + Мелатонин (5 мг/кг)
Диурез, мл/2 ч · 100 г	4.35 ± 0.15	2.26 ± 0.15*	3.54 ± 0.09**
Креатинин плазмы, мкмоль/л	62.27 ± 2.72	139.66 ± 7.27*	96.33 ± 5.77**
Клиренс креатинина, мкл/мин	57.42 ± 8.84	20.16 ± 2.38*	28.22 ± 1.83**
Экскреция белка, мг/100мкл	0.018 ± 0.003	0.108 ± 0.013*	0.073 ± 0.008**
Фракционная экскреция натрия, %	0.85 ± 0.05	4.10 ± 0.50*	2.13 ± 0.10**
Реабсорбция ионов натрия, %	97.79 ± 0.17	93.02 ± 0.29*	95.19 ± 0.34**
Калий плазмы, ммоль/л	5.32 ± 0.30	10.16 ± 0.33*	6.07 ± 0.12**
pH мочи	7.45 ± 0.20	6.22 ± 0.10*	6.60 ± 0.15**
Активность ГГТП, ммоль/(ч · л)	0.10 ± 0.02	4.84 ± 0.58*	1.61 ± 0.22**

Примечание. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем; \*\* –  $p < 0.05$  по сравнению с показателем при рабдомиолиз-индуцированном ОПП.

Ишемическое и токсическое повреждение нефронов сопровождалось активацией процессов свободнорадикального окисления липидов и белков, что подтверждается увеличением содержания малонового диальдегида и окислительно-модифицированных белков, наряду со снижением активности антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы и каталазы в почках, и свидетельствует о развитии окислительного стресса (табл. 2). Уменьшение активности сукцинатдегидрогеназы отображает прогрессирование митохондриальной дисфункции нефронов с возникновением локального энергодефицита, усугублением окислительного стресса и индукцией апоптоза.

Широко известно, что мелатонин, благодаря своей прямой антирадикальной активности и способности потенцировать антиоксидантную систему, является важным антиоксидантом [6,12]. Результаты ряда исследований [12–15] сообщают о терапевтическом эффекте мелатонина при различных патологиях, связанных с окислительным стрессом, в том числе при повреждении почек различного генеза [16–18]. Кроме того, экспериментально подтвержден антиапоптозный, цитопротекторный, противовоспалительный и иммуностимулирующий эффекты мелатонина, что указывает на его способность влиять на основные патогенетические звенья развития острой почечной патологии [19–21].

**Таблица 2.** Показатели прооксидантно-антиоксидантного равновесия и активности СДГ в ткани почек крыс при введении мелатонина на фоне развития рабдомиолиз-индуцированного ОПП

Показатель	Контроль	Рабдомиолиз-индуцированное ОПП	ОПП + Мелатонин (5 мг/кг)
Содержание малонового диальдегида, мкмоль/г	17.06 ± 0.30	38.81 ± 1.55*	23.06 ± 1.25**
Содержание окислительно модифицированных белков, ед./г	8.24 ± 0.22	17.54 ± 0.74*	12.45 ± 0.57**
Активность глутатионпероксидазы, нмоль/(мин · мг)	150.67 ± 9.15	96.32 ± 10.14*	140.60 ± 8.55**
Активность каталазы, мкмоль/(мин · мг)	10.35 ± 0.26	4.76 ± 0.86*	8.34 ± 0.73**
Активность сукцинатдегидрогеназы, нмоль сукцината/(мин × мг белка)	12.65 ± 0.15	3.95 ± 0.40*	10.75 ± 0.10**

Примечание. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем; \*\* –  $p < 0.05$  по сравнению с показателем при рабдомиолиз-индуцированном ОПП.

В ходе проведенных исследований было установлено, что введение мелатонина значительно улучшает функцию почек у крыс с ОПП. Цитопротекторное действие мелатонина по отношению к проксимальным почечным канальцам подтверждено трехкратным снижением уровня  $\gamma$ -ГТП в моче и привело к увеличению клиренса креатинина в 1,4 раза с соответствующим снижением ретенционной азотемии, гиперкалиемии, уменьшением протеинурии в полтора раза, двукратным снижением фракционной экскреции натрия и повышением рН мочи у животных III группы по сравнению с показателями во II группе.

Можно предположить, что в основе ренопротективного действия мелатонина при ОПП лежит его антиоксидантный эффект, обусловленный способностью к прямому поглощению свободных радикалов кислорода и азота в клетках путем донации свободных электронов и инактивации наиболее токсичных окислительных реактивных агентов непосредственно во время их образования [22], что эффективно защищает липиды, белки, митохондрии и ядерную ДНК от окислительного повреждения [23–25]. Более того, известно, что метаболиты мелатонина также являются мощными сквенджерами свободных радикалов, что обуславливает функционирование «антиоксидантного каскада мелатонина» [23,26].

В условиях развития экспериментального рабдомиолиз-индуцированного ОПП под действием мелатонина у животных III группы выявлено значительное снижение содержания малонового диальдегида и окислительно-модифицированных белков, увеличение активности глутатионпероксидазы и каталазы, а также сохранение активности сукцинатдегидрогеназы в ткани почек крыс III группы, которым вводили мелатонин (табл. 2). Эффективное антиоксидантное действие мелатонина связано не только с прямым антирадикальным действием, но также и со способностью стимулировать синтез и активацию антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы), улучшать митохондриальную функцию, обеспечивая сохранение клеточного энергетического баланса, противовоспалительный и антиапоптозный эффекты [24,26].

## ВЫВОДЫ

Полученные данные об эффективности мелатонина в условиях рабдомиолиз-индуцированного ОПП свидетельствуют о его ренопротективной активности, обусловленной влиянием на ключевые звенья патогенеза. Результаты исследования подтверждают перспективы дальнейшего экспериментального изучения мелатонина в условиях почечной патологии различного генеза.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с положениями Директивы Европейского союза 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях [27].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Chavez, M. Leon, S. Einav, et al., *Crit. Care* **20** (1), 135 (2016).
2. P. A. Torres, J. A. Helmstetter, A. M. Kaye, et al., *Ochsner J.* **15** (1), 58 (2015).
3. J. Williams and C. Thorpe, *Crit. Care & Pain* **14** (4), 163 (2014).
4. N. Petejova and A. Martinek, *Crit. Care* **18**, 224 (2014).
5. X. Bosch, E. Poch, and J. M. Grau, *N. Engl. J. Med.* **361**, 62 (2009).
6. E. Ahmadian, M. A. Eghbal, A. Eftekhari, et al., *J. Pharm. Reports* **1**, 1 (2016).
7. L. Andersen, I. Gögenur, J. Rosenberg, et al., *Clin. Drug Investig.* **36** (3), 169 (2015).
8. E. H. Sharman and S. C. Bondy, *Nutraceuticals* 501 (2016).
9. *Методы клинических лабораторных исследований*, под ред. В. С. Камышникова (МЕДпресс, М., 2016).
10. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина и Н. Н. Зыбина. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации* (Фолиант, СПб., 2000).
11. И. И. Заморский и Т. С. Щудрова, *Биофизика* **59** (5), 1023 (2014).
12. D. Bonnefont-Rousselot and F. Collin, *Toxicology* **278** (1), 55 (2010).
13. J. Espino, A. Rodriguez, and J. Pariente, *Curr. Med. Chem.* **25**, 1 (2018).
14. M. Esrefoglu, A. Cetin, E. Taslidere, et al., *Bratisl. Med. J.* **118** (06), 347 (2017).
15. S. Tordjman, S. Chokron, R. Delorme, et al., *Curr. Neuropharmacol.* **15** (3), 434 (2017).
16. J. Hrenak, L. Paulis, K. Repova, et al., *Curr. Pharm. Des.* **21**, 936 (2015).
17. Y. Quiroz, A. Ferrebuz, F. Romero, et al., *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **294**, F336 (2008).
18. J. P. Tsai, C. J. Lee, Y. M. Subeq, et al., *Int. J. Clin. Exp. Med.* **10** (10), 14321 (2017).
19. Y. Yang, M. Song, Y. Liu, et al., *Pharmacol. Ther.* **163**, 58 (2016).
20. M. Tavakoli, *J. Nephroarmacol.* **3** (1), 7 (2014).
21. N. Pacini and F. Borziani, *Int. J. Mol. Sci.* **17** (3), 341 (2016).
22. R. Hardeland, *Aging Dis.* **3**, 194 (2012).
23. M. Majidinia, A. Sadeghpour, S. Mehrzadi, et al., *J. Pineal. Res.* **63**, e12416 (2017).
24. R. Reiter, D. Tan, S. Rosales-Corral, et al., *Molecules* **23** (2), 509 (2018).
25. A. Galano, D. Tan, and R. Reiter, *Molecules* **23** (3), 530 (2018).
26. R. Reiter, S. Rosales-Corral, D. Tan, et al., *Cell. Mol. Life Sci.* **74** (21), 3863 (2017).

27. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, Official J. Europ. Union **276**, 33 (2010).

## **Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury and Renal Protection with Melatonin**

**I.I. Zamorskii, T.S. Shchudrova, and Ye.A. Dudka**

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

Rhabdomyolysis is a clinical syndrome caused by damage to skeletal muscle, which is often followed by acute kidney injury as a severe complication. In experiments on laboratory non-linear white mature rats, the renoprotective potential of melatonin (5 mg/kg) in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury was investigated. It was shown that a single administration of glycerol at a dose of 8 ml/kg leads to the development of the oliguric form of acute renal failure, which is accompanied by a reduction in glomerular filtration rate, an increase in plasma creatinine level, hyperkalemia, aciduria, significant proteinuria, and impaired nephron reabsorption function. It has been established that the use of melatonin has a cytoprotective effect on renal tubular epitheliocytes, significantly limiting the extent of the damage, which prevents the development of oliguria, retention azotemia, and significant loss of sodium ions, reduces proteinuria and increases urine pH. The protective effect is due to the antioxidant activity of melatonin, which prevents the induction of oxidative stress in the kidneys. The research results prove the prospects of further studies to investigate the renoprotective potential of melatonin under the conditions of renal pathology of various geneses.

*Keywords: rhabdomyolysis, acute kidney injury, melatonin, renoprotection*