

© А.В.Смирнов, А.Г.Кучер, В.А.Добронравов, О.Н.Береснева, М.М.Парастаева, В.Г.Сиповский, М.И.Зарайский, Г.Т.Иванова, Е.Б.Сиповская, И.Г.Каюков, 2012
УДК 616.61-002.7:616.617-007.272-08:635.655]-092.4

*А.В. Смирнов^{1,2}, А.Г. Кучер^{1,2}, В.А. Добронравов^{1,2}, О.Н. Береснева¹,
М.М. Парастаева¹, В.Г. Сиповский¹, М.И. Зарайский³, Г.Т. Иванова⁴,
Е.Б. Сиповская¹, И.Г. Каюков^{1,5}*

ДИЕТАРНЫЙ СОЕВЫЙ ПРОТЕИН ЗАМЕДЛЯЕТ РАЗВИТИЕ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ПОЧЕЧНОГО ФИБРОЗА У КРЫС С ОДНОСТОРОННЕЙ ОБСТРУКЦИЕЙ МОЧЕТОЧНИКА: ВВЕДЕНИЕ В НУТРИТИВНУЮ ЭПИГЕНОМИКУ

*A.V. Smirnov, A.G. Kucher, V.A. Dobronravov, O.N. Beresneva,
M.M. Parastaeva, V.G. Sipovskiy, M.I. Zاراiskyi, G.T. Ivanova,
E.B. Spovskaya, I.G. Kayukov*

DIETARY SOYA PROTEIN SLOWS DOWN INTERSTITIAL RENAL FIBROSIS DEVELOPMENT IN RATS WITH UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION: INTRODUCTION TO NUTRITIONAL EPIGENOMICS

¹Научно-исследовательский институт нефрологии, ² кафедра пропедевтики внутренних болезней, ³кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, ⁴лаборатория экспериментальной и клинической кардиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, ⁵кафедра нефрологии и диализа Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Проанализировать влияние рациона с высоким содержанием соевого белка на уровни экспрессии трансформирующего фактора роста (TGF-β1), нуклеарного фактора транскрипции (NFκB) и выраженность морфологических признаков фиброза и воспаления в почечной ткани крыс с односторонней обструкцией мочеточника (ОМ). **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Односторонняя перевязка мочеточника левой почки выполнена у 6 крыс линии Wistar, находящихся на стандартной диете (20% животного белка; контрольная группа) и 7 животных (опытная группа), которые сразу после наложения лигатуры на мочеточник переводились на рацион, включающий 50% соевого протеина (соевый изолят SUPRO 760, Solae Europe S.A., Швейцария). Срок наблюдения после ОМ составил 14 сут. У экспериментальных животных контролировалась величина среднего артериального давления (АД), было проведено светооптическое морфологическое исследование и определялись уровни экспрессии NFκB и TGFβ-1 в почечной ткани. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Не выявлено существенного изменения величины среднего АД у крыс через 2 нед. после операции по сравнению с дооперационным уровнем как в опытной, так и контрольной группе. Относительный уровень экспрессии нуклеарного фактора транскрипции NFκB в левых почках (с обструкцией мочеточника) в контрольной группе в 1,5 раза превышал таковой в контралатеральных органах. У крыс из опытной группы не наблюдалось существенных различий в уровнях относительной экспрессии NFκB в правой (здоровой) и левой (экспериментальной) почках. Иммуногистохимическая активность TGF-β1 в почках с перевязанным мочеточником отчетливо возрастала в обеих группах, но у крыс, находящихся на соевом рационе, она была достоверно ниже. Также в обеих группах в почках с перевязанным мочеточником обнаруживались явные морфологические признаки тубулоинтерстициального воспаления и фиброза. Однако распространенность этих изменений у крыс, получающих соевую диету, была существенно меньше. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты проведенной работы показали, что: (1) назначение рациона с 50% содержанием соевого белка существенно уменьшает выраженность воспалительно-фибротических изменений в интерстиции почек крыс после унилатеральной обструкции мочеточника; (2) снижение тяжести тубулоинтерстициальных повреждений в данной модели ассоциируется с уменьшением экспрессии TGFβ-1 и NFκB; (3) обсуждаются механизмы прямого влияния соевого белка на экспрессию генов TGFβ-1 и NFκB в почечной паренхиме.

Ключевые слова: почки, односторонняя обструкция мочеточника, тубулоинтерстициальный фиброз, трансформирующий фактор роста TGFβ-1, нуклеарный фактор транскрипции NFκB, соевый протеин.

ABSTRACT

AIM OF RESEARCH. To analyze effect of high soya protein diet on expression levels of transforming growth factor (TGF β -1), nuclear transcription factor (NF κ B) and intensity of morphological characteristics of fibrosis and inflammation in renal tissue of rats with unilateral ureteral obstruction (UUO). **MATERIALS AND METHODS.** Unilateral left kidney ureter ligation was performed in 6 Wistar rats keeping standard diet (20% of animal protein; control group) and 7 animals (experiment group) after ureter ligation were put on diet with 50% soya protein (soybean isolates SUPRO 760, Solae Europe S.A., Switzerland). Follow-up period after UUO was 14 days. In experimental animals checked mean arterial pressure (AP) value, was performed light-optic morphologic research and estimated expression levels of NF κ B and TGF β -1 in renal tissue. **RESULTS.** In both, experimental and control groups no significant changes of average AP value in rats in 2 weeks after operation in comparison with presurgical level was revealed. Relative expression level of nuclear transcription factor NF κ B in left kidneys (with ureteral obstruction) in control group was 1,5 times higher than in contralateral organs. In rats from experimental group no significant differences in relative expression levels of NF κ B observed in both, right (healthy) and left (experimental) kidneys. Immunohistochemical activity of TGF β 1 in kidneys with ligatured ureter distinctly increased in both groups, but in rats on soya diet it was lower. Also in both groups in kidneys with ligatured ureters revealed distinct morphological characteristics of tubulointerstitial inflammation and fibrosis. However popularity of these alterations in rats receiving soya diet was significantly lower. **CONCLUSION.** Results of the research testified that: (1) prescription of diet with 50% soya protein significantly reduces intensity of inflammatory-fibrotic alterations in renal interstitium of rats after unilateral ureteral obstruction; (2) decrease of tubulointerstitial damage severity in this model is associated with decrease of expression of TGF β -1 and NF κ B; (3) mechanisms of soya protein direct effect on expression of genes TGF β -1 and NF κ B in renal parenchyma are being discussed.

Key words: kidneys, unilateral ureteral obstruction, tubulointerstitial fibrosis, transformation growth factor TGF β -1, nuclear transcription factor NF κ B, soya protein.

ВВЕДЕНИЕ

Клиницисты-нефрологи и клинические морфологи давно заметили, что тубулоинтерстициальный фиброз имеет ведущее значение в прогрессировании хронических нефропатий, даже если они формально являются «первично-гломерулярными» заболеваниями, например гломерулонефритами. Среди отечественных специалистов, пожалуй, наиболее последовательным апологетом такой точки зрения была М.Я. Ратнер («тубуло-интерстициальный компонент») [1]. Из зарубежных специалистов следовало бы упомянуть многих, но, по нашему мнению, наибольшее впечатление произвели работы группы немецких морфологов под руководством А. Bohle [2–5].

При большинстве почечных заболеваний развитие фиброза определяется комплексом механизмов (иммуновоспалительных, метаболических, гемодинамических), точную грань между ролью которых провести невозможно [7]. Однако на конечном этапе формирования фиброза основную роль играет экспрессия провоспалительных и профибротических цитокинов, которые, зачастую, начинают действовать вне зависимости от причин, вызвавших их активацию. При этом важное значение имеет повышение активности TGF- β /Smad и NF κ B сигнальных путей, стимулирующих развитие фибротических и воспалительных изменений соответственно [7–9].

Самостоятельное значение фиброза, в том числе тубулоинтерстициального, в дальнейшем прогрессировании нефропатий побуждает естественное желание к поиску воздействий, способных, если не предотвратить, то уменьшить или замедлить его развитие [9]. Решение этой задачи на клиниче-

ском уровне представляется крайне сложным, поэтому внимание исследователей в настоящее время сосредоточилось на экспериментальных моделях. Одной из самых подходящих из них, по мнению многих, является односторонняя обструкция мочеточника (ООМ) у животных, обычно у мышей или крыс [10, 11]. Существенно, что в этой модели формирование воспалительных и фибротических изменений в интерстиции почек начинается уже через несколько дней (или даже часов), а явными такие проявления становятся к 14-м суткам после наложения лигатуры на мочеточник. Также важно, что они сопровождаются отчетливым усилением экспрессии TGF- β и NF κ B [10]. Данная модель может служить удобным объектом для изучения воздействий, направленных на замедление формирования фиброза. Например, именно при экспериментальной ООМ было установлено антифибротическое действие статинов [12] или амитриптилина [13].

Результаты ряда исследований, в том числе выполненных с нашим участием, показали, что включение очищенного соевого белка в малобелковые диеты у пациентов с гломерулонефритами может отчетливо замедлить у них прогрессирование почечной дисфункции [14]. Однако возникает вопрос, связан ли такой эффект только с уменьшением гемодинамической нагрузки на нефроны, присущей всем растительным белкам [15], или он вызывается непосредственным вмешательством соевого протеина в развитие воспалительных и фибротических изменений в почечной ткани. Ряд имеющихся к настоящему времени сведений, в частности, суммированных в одном из наших обзоров, не ис-

ключают и такой возможности [16]. Особый интерес представляет обсуждение механизмов прямого влияния соевого протеина на формирование почечного тубулоинтерстициального фиброза с позиций нутритивной эпигеномики, в частности, роли экзогенных микроРНК [17, 18].

В связи с этим целью настоящей работы было проанализировать влияние рациона с высоким содержанием соевого белка на уровни экспрессии трансформирующего фактора роста (TGF β -1), нуклеарного фактора транскрипции NF κ B и выраженность морфологических признаков фиброза и воспаления в почечной ткани крыс с ООМ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для создания модели ООМ были использованы самцы крыс Wistar массой тела 230–250 г (питомник «Колтуши» РАН). Были сформированы две группы экспериментальных животных. В первой (n=6) крысы получали стандартный рацион (20% животного белка), животные из второй (n=7) сразу после выполнения оперативного вмешательства переводились на диету с высоким содержанием (50%) соевого протеина (соевый изолят SUPRO 760, Solae Europe S.A., Швейцария). Срок наблюдения в обеих группах составил 14 сут после моделирования ООМ.

Методика выполнения оперативного вмешательства. Под общей анестезией, «Рометар» (0,05 мл) в сочетании с «Золетил» (0,3 мл, внутривенно) выполняли перевязку левого мочеточника. На мочеточник накладывали 2 лигатуры (использовали нерассасывающийся шелк 2/0 «Silkam»). Участок мочеточника между лигатурами перерезали. Во избежание побочного эффекта на развитие фиброза антибиотик в постоперационный период не применяли. Правую почку (с неповрежденным мочеточником) использовали в качестве контроля.

В ходе эксперимента животных содержали на стандартном лабораторном пищевом рационе и свободном доступе к воде. Срок после ООМ составлял 14 сут.

За сутки до проведения операции, а также накануне забоя у ненаркотизированных крыс измеряли среднее системное артериальное давление (АД) манжеточным методом. Во время забоя у крыс регистрировали массу левой и правой почки, производили забор почечной ткани для последующих молекулярно-диагностических, гистологических и иммуногистохимических исследований.

Эксперименты проводили в соответствии с международными стандартами по работе с лабораторными животными с разрешения Этического коми-

тета Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Гистологические и иммуногистохимические исследования. Для патогистологического и иммуноморфологического исследований фрагменты почечной паренхимы каждого животного фиксировались незамедлительно после получения образцов ткани в 4% ПФА, забуференном на фосфатном буфере, pH 7,4, в течение 24 ч при комнатной температуре. После стандартной обработки тканевых фрагментов (обезживание и пропитка) из парафиновых блоков были приготовлены 4–5 мкм серийные срезы.

Препараты окрашивались реактивом Шиффа (PAS), трихромальной окраской (Masson), по Вейгерту (Veigert). Изучение патоморфологических изменений проводилось в светооптическом микроскопе Carl Zeiss Imager Z 2 (Германия). Иммуногистохимическое исследование осуществлялось на полученных парафиновых срезах. После стандартной депарафинизации и обезживания выполнялась блокировка эндогенной пероксидазы раствором 3% H₂O₂ и ферментативная демаскация антигенов протеиназой К (Diagnostic Biosystems, США, кат. K030). Постановка иммуногистохимической реакции осуществлялась с использованием первичных поликлональных кроличьих антител к TGF β -1(V) – (Santa-Cruz, США, кат. sc-146) и полимерной системой визуализации EnVision – (ДАКО, Дания, кат. K4010). В качестве визуализирующей хромогенной метки использовалась диаминобензидиновая реакция (ДАКО, Дания кат. К 3468). Контроль реакции осуществлялся постановкой отрицательного контроля.

Оценка патогистологических изменений, в частности, воспалительно-склеротического процесса (ВСП) и иммуногистохимической реакции, проводилась количественно при помощи 100-точечной сетки. Подсчет процента стромы, включая ВСП и эпителиальных клеток с и без продукта реакции, производился в коре почечной паренхимы каждого микропрепарата, с исключением из счета клубочков и артерий, в 20 не перекрещивающихся полях зрения при увеличении 40. Определялись среднее значение (X) и ошибка средней (m) в каждой группе исследуемых животных.

Исследование экспрессии NF κ B. Получение материала и его характеристика. В качестве основного материала для исследования использовался участок почечной ткани крысы. Забор материала производился в стерильных условиях в пластиковые автоклавированные микропробирки «Эппендорф», емкостью 1,5 мл с добавлением 0,2 мл 0,1 М раствора EDTA. Далее материал гомогенизировался с помощью одноразовых лезвий до каши-

цеобразного состояния. Полученный материал отмывался в TE и PBS буферах и использовался для выделения тотальной РНК.

Выделение тотальной РНК. Тотальная РНК выделялась фенол-хлороформным методом, с помощью набора «Рибо-золь-А» (Амплисенс, Москва), согласно прилагаемой инструкции.

Приготовление кДНК. Приготовление кДНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции (набор «Реверта-Л-100», Амплисенс, Россия) в модификации для рандомизированных олигопраймеров, с использованием обратной транскриптазы М-MLV. Использование данного протокола позволило использовать полученную кДНК как единую мишень для последующих амплификаций.

Приготовление кДНК. Приготовление кДНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции (набор «Реверта-Л-100», Амплисенс, Россия) в модификации для рандомизированных олигопраймеров, с использованием обратной транскриптазы М-MLV. Использование данного протокола позволило использовать полученную кДНК как единую мишень для последующих амплификаций [19].

Проведение реакции амплификации (RealTime PCR-протокол). Реакция амплификации и детекция результатов проводилась с использованием прибора ДТ-96 (ДНК-Технология, Москва). Для каждой пробы ставились по две отдельные реакции для гена NFκBp65 и гена GAPDH соответственно. Для проведения ПЦР-анализа использовалась реакционная смесь фирмы «Синтол» (Москва) с интеркалирующим красителем SYBRGREEN. Состав реакционной смеси в конечном объеме 25 мкл был следующий: 2,5 мкл 10× реакционного буфера, 2,5 мкл MgCl₂ (25 мМ), 2,5 мкл смеси нуклеотидов трифосфатов (2,5 мМ), пара праймеров по 10 пмоль/мкл каждого, 0,2 мкл раствора Taq-полимеразы 5 Ед/мкл и 4 мкл кДНК. Праймеры были синтезированы в НПФ «ЛИТЕХ» (Москва). Последовательности используемых праймеров были следующие: NFκBp65F: 5-GTTCACAGACCTGGCATCC-3; NFκBp65R: 5-TGTCACCTAGGCGAGTTATAGC-3; GAPDH-F: 5-TGGAATCCCATCACCATCT-3; GAPDH-R: 5-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3.

Контроль контаминации реактивов проводился при помощи обязательной постановки отрицательного контроля (H₂O вместо кДНК). Типовая программа амплификации состояла из начальной денатурации – 95 °С – 300 с и 35 циклов (95 °С – 15 с, 61 °С – 40 с). Учет результатов проводился прибором автоматически в режиме «качественный логарифмический обсчет». Вычисление относительного уровня экспрессии гена NFκB проводилось по

полуколичественному протоколу с учетом расчетного номера цикла (Ct), при котором сигнал в лунке переходил на экспоненциальный участок кривой накопления свечения от интеркалирующего красителя SYBRGREEN. Расчет проводился по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где $\Delta\Delta Ct = (Ct_{NF\kappa B} \text{ исследуемой пробы} - Ct_{GAPDH} \text{ исследуемой пробы}) - (Ct_{NF\kappa B} \text{ пробы сравнения} - Ct_{GAPDH} \text{ пробы сравнения})$ [20]. Получаемая величина указывала, во сколько раз экспрессия в исследуемой пробе превышает таковую в пробе сравнения (Fold Change) [21].

Результаты гистологических, иммуногистохимических и молекулярных исследований в каждой группе сопоставлялись в почке с перевязкой мочеточника и контралатеральной.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ни в первой, ни во второй группах не было выявлено существенного изменения величины среднего АД у крыс через 2 нед после операции по сравнению с исходным дооперационным уровнем (рис. 1).

Исходными данными для вычисления уровня относительной экспрессии гена NFκBp65 служили расчетные номера циклов амплификации, соответствующие логарифмической фазе накопления ПЦР-продукта в пробах – Ct (threshold cycle – рис. 2).

Далее полученные результаты нормализовались по уровню экспрессии референц-гена GAPDH, а затем подвергались сравнению между опытной и контрольной группами с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Относительный уровень экспрессии NFκB (Ct NFκB-33,6; Ct GAPDH-28,3) в почке с перевязкой мочеточника у крыс из первой группы в 1,5 раза превышал таковой в контралатеральном органе. У крыс из второй группы не наблюдалось существенных различий в уровнях относительной экспрессии NFκB в правой (контрольной) и левой (экспериментальной) почках (Ct NFκB-24,5;

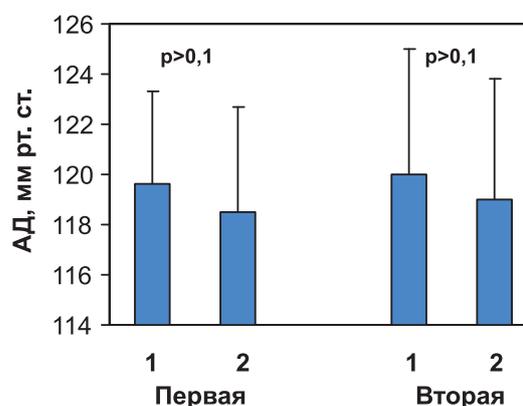


Рис. 1. Уровни АД в первой и второй группах крыс. 1 – до ООМ, 2 – 14 суток после ООМ.

Ct GAPDH–21,2; Ct NFκB–25,7; Ct GAPDH–22,4, соответственно).

Светооптически контралатеральные почки без обструкции мочеточника имели практически интактную гистеоархитектонику с четким делением паренхимы на корковый, мозговой слои и чашечно-лоханочную систему (рис. 3, а).

После 2 нед унилатеральной обструкции отмечалось истончение коркового и значительное истончение медуллярного слоев. Микроскопически патогистологические изменения в группах отличались между собой степенью выраженности и распространенности патологических процессов, в частности ВСП. Так, в паренхиме почек с ООМ выявлялись распространенные очаговые разрастания волокон соединительной ткани с отеком межтубулярной стромы, расширением капиллярной сети и лейкоцитарными инфильтратами. Инфильтрация состояла преимущественно из клеток лимфоцитарно-макрофагального ряда. В клетках тубулярного эпителия выявлялась существенная дилатация просветов дистальных и частично проксимальных канальцев. В самом эпителии наблюдались дистрофические изменения в виде гиалиново-капельной и вакуолярной дистрофии, что сочеталось с уплощением и потерей щеточной каемки клеток. Очагово выявлялись некробиотические изменения единичных клеток эпителия (рис. 3, б,в). В клубочках наблюдалось фокальное увеличение размеров и расширение просвета капсулы Боумена. Расширение мезангиального матрикса было сегментарным, незначительным и не сопровождалось гиперклеточностью. Капиллярные петли были несколько поджаты и сморщены. Значимых изменений со стороны клеток капсулы, эндотелия и базальной мембран капилляров клубочков не определялось (см. рис. 3, б, в).

При количественной оценке изменений в исследованных группах более выраженные воспалительно-склеротические изменения наблюдались в группе животных, получавших стандартную диету, и соответственно менее выраженные в группе, находившейся на специальной диете (табл. 1).

Иммуногистохимический продукт реакции на

Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, F am	Ct, Hex	Результат
H6	WAT_NKFB	29,9		+
H7	WAT_GAPDH	28,0		+

* Ручной (пороговый) метод анализа (B, F) Threshold_FAM = 42,2 Threshold_HEX = 0,0

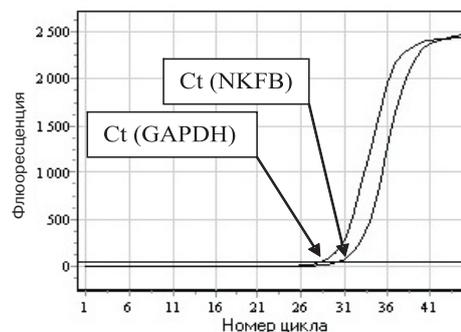


Рис. 2. Протокол автоматического определения Ct на приборе ДТ-96.

TGFβ1 в контралатеральных почках локализовался, преимущественно, в цитоплазме эпителия некоторых дистальных канальцев (рис. 3, г).

В паренхиме почек с ООМ продукт реакции выявлялся не только в дистальных, но и в цитоплазме клеток эпителия проксимальных канальцев, а также в единичных случаях в подоцитах клубочков (рис. 3, д, е). Интенсивность и распространенность продукта реакции наиболее выраженной была в группе животных со стандартной диетой по сравнению с другой группой животных, получавших рацион с высоким содержанием соевого протеина, что подтверждалось также и при количественном морфометрическом исследовании (см. табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно имеющимся данным, ООМ может считаться одной из очень удачных моделей формирования интерстициального почечного фиброза, поскольку в ней он развивается по тем же молекулярным механизмам, что и почечный фиброз при других повреждениях почек [10], в том числе при ХБП [22]. Прогрессирование почечного фиброза опосре-

Таблица 1

Количественная оценка иммуногистохимической активности TGFβ-1 в эпителии канальцев и воспалительно-склеротических изменений паренхимы почек у экспериментальных крыс с ООМ

Изученные признаки	Первая группа	Вторая группа	p
Иммуногистохимическая активность TGFβ-1 в эпителии канальцев (%) (X±m)	76,60±4,09	65,32 ± 2,22	<0,05*
Соотношение интерстиция, в том числе ВСП/тубулярного эпителия (%) (X±m)	34,67±3,56	28,35±2,05	<0,05*

Примечание. *t критерий Стьюдента для независимых выборок.

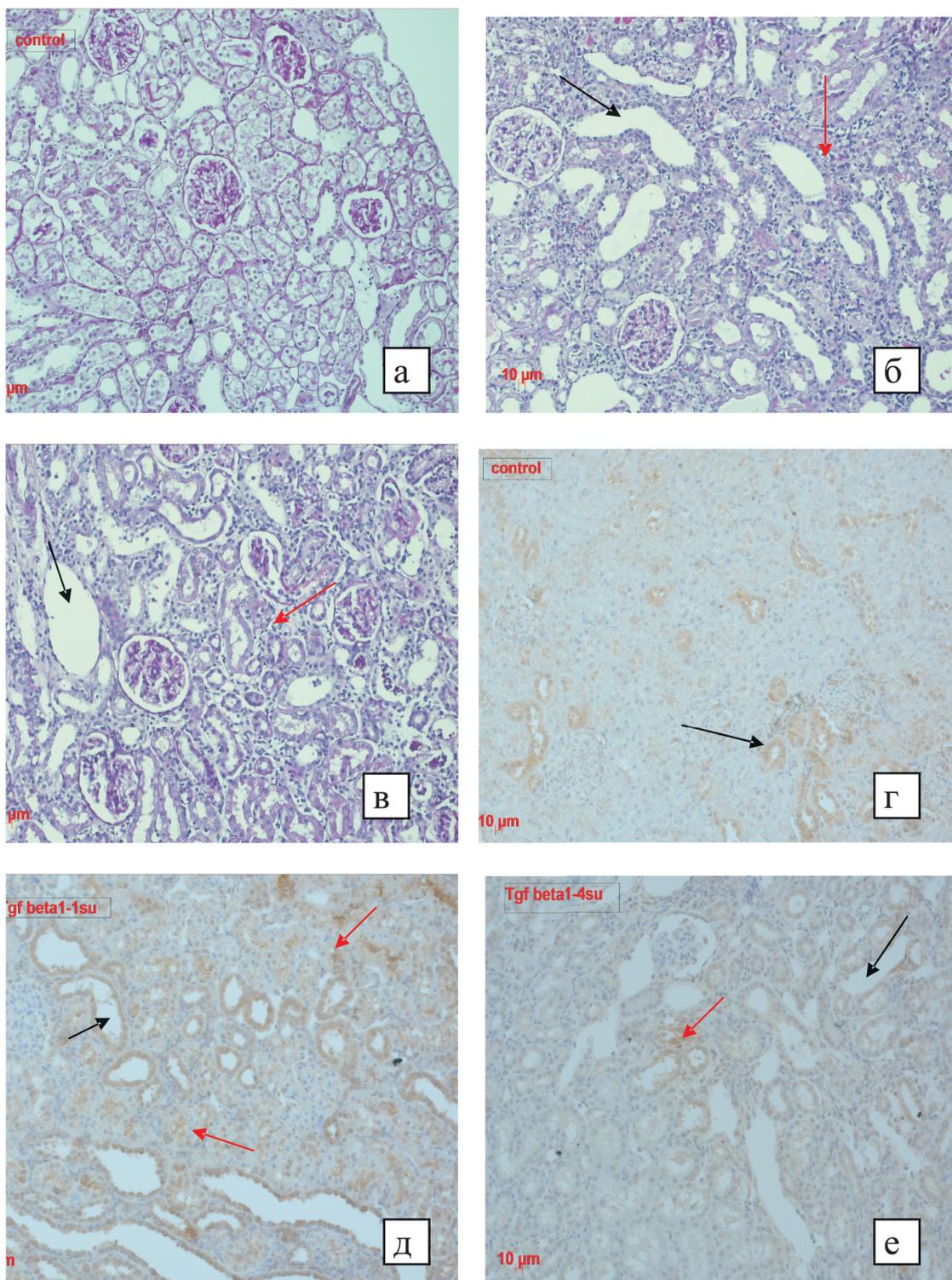


Рис. 3. Репрезентативные микрофотограммы светооптического исследования патогистологических– ШИК-PAS-реакция (а, б, в) и иммуногистохимических – TGFβ-1 (г, д, е) изменений в паренхиме почки экспериментальных животных после OOM: контралатеральная почка (а,г), OOM без диеты(б, д) и OOM с диетой (в, е).

дуется различными факторами роста, цитокинами, метаболитическими токсинами и молекулами стресса. Среди них TGFβ1 был распознан как ключевой медиатор этого процесса [23–25]. TGFβ-1 и его изоформы (TGFβ2 и TGFβ3) синтезируются многими клетками, включая все типы клеток почек, и

секретируются в виде латентных предшественников. После активации TGFβ связываются со своими рецепторами и аутокринным и паракринными путями реализуют свою биологическую и патологическую активность через Smad-зависимые и Smad-независимые механизмы [26]. Усиление экс-

прессии TGF β при развитии фиброза тесно ассоциировано с активацией NF κ B сигнального пути. Причем, первичным пусковым звеном, скорее, является TGF β /Smad-система, которая и стимулирует нуклеарный фактор транскрипции NF κ B, который, в свою очередь, опосредует выработку провоспалительных цитокинов, прежде всего, фактора некроза опухолей α (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1 β). Последние, в свою очередь, по механизму положительной обратной связи могут вновь активировать NF κ B. Следует, правда, иметь в виду, что NF κ B может активироваться и многими другими механизмами [23–26].

Среди разных способов, потенциально способных замедлить развитие фиброза, серьезное внимание привлекают белки из соевых бобов [16]. Как уже отмечалось выше, в наших предыдущих исследованиях было показано, что включение очищенного соевого белка в малобелковые диеты у пациентов с гломерулонефритами может отчетливо замедлить у них прогрессирование почечной дисфункции [14].

Долгое время позитивный эффект сои на течение хронических нефропатий связывали с гемодинамическими факторами, меньшим нарастанием почечного кровотока и скорости клубочковой фильтрации (СКФ) в ответ на потребление растительного белка по сравнению с животным. Мы также наблюдали почти полное отсутствие роста СКФ при нагрузке соевым протеином у здоровых людей, тогда как эквивалентная доза белков «красного мяса» приводила к значительному повышению величины этого параметра [15].

Однако имеются исследования, заставляющие сомневаться, что позитивное действие соевых протеинов на прогрессирование нефропатий однозначно связано только с их гемодинамическим эффектом. Оно может определяться их прямым воздействием на почечную паренхиму [27–30].

Результаты настоящего исследования, в котором применялись диеты не с низким, а высоким содержанием белка и в котором обнаружено отчетливое уменьшение воспалительно-фибротических изменений интерстиция, в модели ООМ могут рассматриваться как свидетельство прямого влияния соевого белка или его компонентов на почечную ткань.

Некоторые данные доказывают, что белки с молекулярной массой около 30 кДа, в принципе, могут всасываться в кишечнике в неизменном виде, затем попадать с током крови в почки, подвергаться гломерулярной ультрафильтрации и далее тубулярной реабсорбции. Например, свидетельства этого были получены в работе, выполненной под руководством академика РАН Ю.В. Наточина с нашим

участием на примере зеленого флюоресцентного белка, который флюоресцирует только в том случае, когда его молекула интактна и имеет сохранный третичную структуру [31].

Если данный механизм справедлив, то он может служить дополнительным обоснованием возможности прямого воздействия низкомолекулярной фракции соевого рациона на почечную ткань.

Дальнейшие объяснения такого эффекта можно провести с позиций нутритивной эпигеномики [32]. В настоящее время под эпигеномикой понимают наследуемые изменения в экспрессии гена и организации хроматина, не вызывающие изменений последовательности нуклеотидов ДНК [33].

Выделяют три основных феномена эпигеномики: метилирование ДНК, посттрансляционную модификацию гистона и, в последнее время, так называемую микроРНК (миРНК) [32].

Было обнаружено, что примерно 50% генома человека ДНК транскрибируется на РНК, из которой только 2% используется в процессе трансляции для синтеза белка (кодирующая, матричная РНК – мРНК). Остальные 98% являются так называемой некодирующей РНК (нкРНК) [34]. Большая часть такой РНК имеет размеры меньше, чем мРНК. Поэтому ее обычно называют малой или короткой некодирующей РНК (мнкРНК; кнРНК). Термином нкРНК обычно обозначают РНК, которая не кодирует белок, но это не исключает того, что она не переносит информацию и не обладает определенными функциями. Например, рибосомальная РНК или транспортная РНК, которые составляют значительную долю количества РНК, два вида хорошо известной мнкРНК, участвуют в экспрессии протеинов. Недавно были описаны два новых класса мнкРНК: микроРНК (миРНК) и малая вмешивающаяся РНК или короткая интерферирующая РНК (мвРНК; киРНК). Обе дают сильный регуляторный эффект на мРНК и представляют собой новый важный пласт в процессах экспрессии генов.

Хотя миРНК и мвРНК имеют сходные размеры, форму и механизм действия, их биогенез и происхождение различны [34, 35].

При этом миРНК может оказаться наиболее существенным фактором, вовлеченным в развитие и прогрессирование разных заболеваний: рака, сердечно-сосудистых, печени, иммунной системы и метаболических расстройств. Например, миРНК способствует формированию гипертрофии сердца [34].

Последние исследования показали также, что TGF β регулирует специфические миРНК, влияющие на развитие ренального фиброза при заболеваниях почек [36].

мвРНК обнаружены только у растений, одноклеточных и беспозвоночных [38]. Тогда как миРНК широко представлены у человека. В настоящее время известны более 700 человеческих миРНК, которые продуцируются более чем 1000 генов. При этом миРНК могут регулировать, по крайней мере, 30% генов генома человека [34]. мвРНК, поначалу, образуются путем транскрипции на соответствующем участке молекулы ДНК в виде длинной при-мвРНК, после чего под действием сложного каскада ферментов переходят сначала в пре-мвРНК, а в конечном итоге в одноцепочечные молекулы, которые и являются биологически активными. миРНК формируются из коротких предшественников [34, 35, 37].

Считается, что миРНК могут влиять на экспрессию соответствующего гена двумя основными путями. Первый – предполагает полную комплементарность миРНК к мРНК, что ускоряет деградацию последней. Таким путем, скорее всего, действуют миРНК, которые, как уже отмечалось выше, формируются в границах одного гена [34, 35, 37]. Второй путь связан с неполной комплементарностью регуляторных и матричных РНК. При таком механизме ингибируются процессы трансляции, и он более характерен для мвРНК. Эти РНК, как тоже уже отмечалось, могут действовать как в своем, так и других геномных локусах [34, 35, 37]. Как бы то ни было, оба этих пути подавляют активность соответствующего гена. Интересно, однако, что получены данные, указывающие на то, что в определенных ситуациях миРНК могут не угнетать, а активировать экспрессию некоторых генов [37]. Эти особенности миРНК могут иметь важные медицинские последствия. В частности, миРНК, активирующие экспрессию, часто выступают в качестве онкогенных факторов, тогда как обладающие противоположными свойствами – в роли супрессоров развития опухоли. Другой пример, миРНК miR-195 и miR-208, активаторы экспрессии соответствующих таргетных генов, способствуют развитию гипертрофии миокарда, а miR-133 и miR-1 (ингибиторы экспрессии) препятствуют ее формированию [34].

Как бы ни были интересны эти данные, с позиций темы настоящего сообщения более важным представляется другое. Было подмечено, что искусственно введенные синтетические аналоги мвРНК вызывали сильный специфический дозозависимый эффект в культурах клеток млекопитающих. Это, отчасти, связано с тем, что в сложных организмах сохранились все компоненты системы процессинга мвРНК, хотя сами такие молекулы в процессе эволюции они утратили [37].

Более того, оказалось, что некоторые миРНК, которые содержатся в растениях, могут обнаруживаться в тканях человека и других млекопитающих. Например, это касается miR-168a, присутствующей в рисе. Данная миРНК была выявлена в больших количествах в сыворотке крови китайцев [38]. Понятно, что никаким другим путем, кроме как с пищей, проникнуть в организм человека она не могла. Эта миРНК ингибирует экспрессию человеческого/мышинного адаптера рецептора протеина 1 липопротеина низкой плотности в печени и, следовательно, замедляет убыль липопротеинов низкой плотности из плазмы [38].

В сое идентифицировано 256 миРНК [39]. Логично и обоснованно предположить, что они, подобно миРНК риса, могут попадать в организм млекопитающих и проявлять свое регуляторное действие. Доказательств этому пока, правда, нет, хотя нельзя исключить того, что позитивный эффект соевого изолята SUPRO 760 в отношении развития фиброза интерстиция у крыс в модели ООМ частично связан с таким механизмом. Данная проблема, на наш взгляд, должна быть предметом дальнейших исследований.

Рассматривая замедление развития почечного интерстициального фиброза под влиянием соевого рациона, выявленного в настоящей работе, с позиций эпигеномики, нельзя не упомянуть еще несколько возможных механизмов реализации такого эффекта. Во-первых, сами миРНК могут быть субстратом для регуляции разных факторов, в том числе пищевых [17, 18]. Во-вторых, как уже отмечалось выше, важными феноменами эпигеномики, помимо миРНК, являются метилирование ДНК и модификация гистона. Последние факторы, рассматривая ренопротективное действие сои, также нельзя не принимать во внимание. Применительно к компонентам соевых бобов особого внимания заслуживает содержащийся в них изофлавоноид – генистеин, проявляющий свойства фитоэстрогена [16, 18]. В настоящее время можно считать доказанным наличие у него антиканцерогенных, антиангиогенных и, возможно, антифибротических свойств [16, 18]. При этом антиканцерогенный эффект генистеина связывают с влиянием на транскрипцию гена за счет воздействия на ацетилирование гистона и/или метилирование ДНК [18]. Не исключено, что такие механизмы, в какой-то мере, опосредуют и антифибротическое действие соевого изолята, зарегистрированное в данной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования подтвердили, что развитие интерстициального почечного фиброза, наблюдаемое на модели односторонней

обструкции мочеточника у крыс, сопровождается усилением экспрессии NFκB и TGFβ1 в почечной ткани. При этом рацион с высоким содержанием соевого протеина приводит к уменьшению воспалительно-фибротических изменений и активности TGFβ1 в тубулоинтерстициальном компартменте и экспрессии NFκB в ткани почек. Объяснить механизм такого эффекта соевого рациона можно, в том числе, с позиций нутритивной геномики.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ратнер МЯ, Серов ВВ, Томилина НА. Ренальные дисфункции (клинико-морфологическая характеристика). Медицина, М., 1977; 296
2. Bohle A, Müller GA, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Xiao JC. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int Suppl* 1996; 54: S2-S9
3. Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res* 1996; 19(3-4): 191-195
4. Bohle A, Strutz F, Müller GA. On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium. *Exp Nephrol* 1994; 2(4): 205-210
5. Bohle A, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Gise H, Mickeler E, Xiao TC, Müller C, Müller GA. Pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* 1994; [suppl 3]: 4-12
6. Каюков ИГ, Есаян АМ, Кучер АГ, Ермаков ЮА. Роль функционально-гемодинамических механизмов в прогрессировании хронического гломерулонефрита. *Нефрология* 1998; 2(1): 7-13
7. Meng XM, Huang XR, Xiao J, Chen HY, Zhong X, Chung AC, Lan HY. Diverse roles of TGF-β receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro. *J Pathol* 2012 227(2): 175-188
8. Lan HY. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 2011; 7(7): 1056-1067
9. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006; 69(2): 213-217
10. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(5): F861-875
11. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 75(11): 1145-1152
12. Vieira JM Jr, Mantovani E, Rodrigues LT, Dellê H, Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(8): 1582-1591
13. Achar E, Maciel TT, Collares CF, Teixeira VP, Schor N. Amitriptyline attenuates interstitial inflammation and ameliorates the progression of renal fibrosis. *Kidney Int* 2009; 75(6): 596-604
14. Кучер АГ. Лечебное питание у больных с хронической почечной недостаточностью. Дисс. ...д-ра мед. наук. СПб., 2000; 376
15. Кучер АГ, Каюков ИГ, Есаян АМ, Ермаков ЮА. Влияние количества и качества белка в рационе на деятельность почек. *Нефрология* 2004; 8 (2): 14-34
16. Береснева ОН, Парастаева ММ, Кучер АГ и др. Ренопротективные эффекты соевой белковой диеты. *Нефрология* 2011; 15(3): 26-34
17. Witzany G. Do we eat gene regulators? *Commun Integr Biol* 2012; 5(3): 230-232
18. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics* 2011 3(4): 503-518
19. Сабурова ИЮ, Слободнюк КЮ, Горчакова МВ и др. Исследование уровня экспрессии гена СЕВРА у пациентов с острым миелобластным лейкозом. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова* 2011; 18(3): 76-77
20. Arocho A, Chen B, Ladanyi M, Pan Q. Validation of the 2-DDCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210. *Transcripts Diagn Mol Pathol* 2006; 15 (1); 56-61
21. Newman JH, Holt TN, Hedges LK et al. High-altitude pulmonary hypertension in cattle (brisket disease): Candidate genes and gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells. *Pulm Circ* 2011; 1(4): 462-469
22. Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2964-2966
23. Bottinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol* 2007; 27: 309-320
24. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10(1): 48-56
25. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGFbeta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
26. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6: 1365-1375
27. Dobronravov V, Smirnov A, Parastaeva M et al. Influence of low- and high-soy protein diet on the progression of experimental chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 [Suppl 5]: 70
28. Williams AJ, Baker F, Walls J. Effect of varying quantity and quality of dietary protein intake in experimental renal disease in rats. *Nephron* 1987; 46(1): 83-90
29. Cahill LE, Peng CY, Bankovic-Calic N, Sankaran D, Ogborn MR, Aukema HM. Dietary soya protein during pregnancy and lactation in rats with hereditary kidney disease attenuates disease progression in offspring. *Br J Nutr* 2007; 97(1): 77-84
30. Maddox DA, Alavi FK, Silbernick EM, Zawada ET. Protective effects of a soy diet in preventing obesity-linked renal disease. *Kidney Int* 2002; 61(1): 96-104
31. Селиверстова ЕВ, Бурмакин МВ, Шахматова ЕИ и др. Акумуляция в почке экзогенного белка после его всасывания в кишечнике при развитии экспериментальной почечной недостаточности у крыс. *Нефрология* 2007; 11(1): 7-16
32. Ong TP, Pérusse L. Impact of nutritional epigenomics on disease risk and prevention: introduction. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011; 4(5): 245-247
33. Holliday R. Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1990; 65(4): 431-471
34. Zhang C. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 2008 22; 33(2): 139-147
35. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011; 278(10): 1598-1609
36. Lan HY. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 2011; 7(7): 1056-1067
37. Старокадомский П. Обо всех РНК на свете, больших и малых. 2010; <http://biomolecula.ru/content/679/>
38. Zhang L, Hou D, Chen X et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 2012; 22(1): 107-126
39. Kulcheski FR, de Oliveira LF, Molina LG et al. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics* 2011; 12: 307

Работа поддержана грантом Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Поступила в редакцию 21.09.2012 г.
Принята в печать 11.10.2012 г.