

© О.Н.Береснева, М.М.Парастаева, Г.Т.Иванова, В.Г.Сиповский, М.И.Зарайский, А.В.Карунная, А.Г.Кучер, И.Г.Каюков, 2015
УДК 616.61-002.2-04-08

*О.Н. Береснева¹, М.М. Парастаева¹, Г.Т. Иванова², В.Г. Сиповский¹,
М.И. Зарайский³, А.В. Карунная⁴, А.Г. Кучер⁴, И.Г. Каюков^{1,5}*

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ТУБУЛОИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ФИБРОЗА У КРЫС

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

*O.N Beresneva¹, M.M. Parastaeva¹, G.T. Ivanova², V.G. Sipovsky¹,
M.I. Zaraisky³, A.V. Karunnaya⁴, A.G. Kucher⁴, I.G. Kayukov^{1,5}*

METFORMIN EFFECT ON THE TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS DEVELOPMENT IN RATS

¹Research institute of nephrology Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, ²Laboratory of clinical and experimental cardiology Institute of Physiology I.P.PAVLOV, ³Department of clinical laboratory diagnostics with the course of molecular medicine, ⁴Department of propedeutics of internal diseases, ⁵Department of nephrology and dialysis Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Russia

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – изучение влияния метформина на формирование тубулоинтерстициального фиброза и экспрессии микроРНК-21 в моче на модели односторонней обструкции мочеточника (ООМ) у крыс. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для создания модели тубулоинтерстициального фиброза на фоне ООМ были использованы самцы крыс линии Wistar массой тела 230–250 г. В первой группе (контроль; n=5) крысы получали стандартный рацион, животные второй группы (n=5) сразу после выполнения оперативного вмешательства получали стандартную диету и метформин в дозе 10 мг/сут. Срок наблюдения в обеих группах составил 14 сут после моделирования ООМ. За сутки до окончания эксперимента у крыс, находящихся в метаболической камере, в течение 24 ч собирали мочу для последующего определения экспрессии микроРНК 21. После выведения животного из эксперимента производили забор пробы мочи из лоханки почки с ООМ для определения экспрессии микроРНК-21, а также образцов почечной ткани для последующих гистологических исследований. Выраженность морфологических изменений оценивали с помощью количественной морфометрии с определением относительного объема тубулоинтерстиция (ООТин) и относительного объема тубулярного эпителия (ООТэ). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** В контрольной группе экспериментальная ООМ приводила к закономерному, статистически значимому росту ООТин по сравнению с контралатеральной почкой. Аналогичные данные были получены в группе животных, получавших метформин. Метформин не оказывал существенного влияния на выраженность ООТин ни в контралатеральных (интактных) почках, ни в почках с ООМ. ООМ у животных с назначением метформина приводила к значимому уменьшению величины ООТэ. Не было существенных различий в уровнях ООТэ в интактных почках или почках с ООМ у животных, получавших и не получавших метформин. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты проведенной работы не подтвердили нефропротективный эффект метформина на модели формирования тубулоинтерстициального фиброза вследствие ООМ у крыс. Однако для окончательного решения данного вопроса необходимы дополнительные клинические и экспериментальные исследования.

Ключевые слова: метформин, тубулоинтерстициальный фиброз, односторонняя обструкция мочеточника, микроРНК-21.

ABSTRACT

THE AIM - to study the effect of metformin on the tubulointerstitial fibrosis development and microRNA 21 expression in urine on the model of unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats. **MATERIAL AND METHODS.** Male Wistar rats weighing 230-250 g were used for modeling tubulointerstitial fibrosis following UUO. The first group (control; n = 5) rats received a standard diet, the animals of the second group (n = 5) immediately after surgery received standard diet and metformin 10 mg per day. Both groups of rats were observed for 14 days after the UUO modeling. One day before the experiment termination, in rats which were placed in a metabolic chamber urine was collected during 24 hours for subsequent microRNA 21 expression determination. After removal the animal from the experiment received samples of urine from the renal pelvis of the kidney with UUO to determine microRNA 21 expression, as well as samples of kidney tissue for subsequent histological examination. Severity of morphological changes were evaluated by quantitative morphometry to determine the relative volume of tubulointerstitium (RVTin) and relative volume of the tubular epithelium (RVTе). **RESULTS.** In the control group, the experimental UUO led to a logical, a statistically

significant increase in RVTin compared with the contralateral kidney. Similar data were obtained by the group of animals treated with metformin. Metformin had no significant effect on the severity of RVTin neither contralateral (intact) kidney, nor kidney with UO. UO in animals treated with metformin resulted in a significant decrease in the value RVTe. There were no significant differences in the levels of RVTe in the intact kidneys or kidney with OOM in animals receiving and not receiving metformin. **CONCLUSION.** The obtained results have not confirmed nephroprotective effect of metformin on the tubulointerstitial fibrosis development in rats with UO. However for the final resolve of this problem requires additional clinical and experimental studies.

Key words: metformin, tubulointerstitial fibrosis, unilateral ureteral obstruction, miRNA-21.

ВВЕДЕНИЕ

Метформин – препарат из группы бигуанидов, широко применяемый для контроля гликемии у пациентов с сахарным диабетом типа 2 (СД 2). СД2 неизбежно ведет к развитию ряда осложнений. Одним из наиболее тяжелых из них является диабетическая нефропатия (ДН). Нефрологическое сообщество относится с большой настороженностью к использованию метформина у пациентов с ДН из-за его способности вызывать лактат-ацидоз и, возможно, акцелерировать прогрессирование дисфункции почек [1]. Однако в последнее время появились результаты клинических и экспериментальных наблюдений, свидетельствующих о том, что метформин, помимо его антигликемического эффекта, может оказывать и определенное нефропротективное действие. При этом, метформин препятствует повреждению тубулярных клеток и подоцитов, снижает уровень альбуминурии у пациентов с СД2 и уменьшает выраженность тубулоинтерстициального фиброза у мышей с односторонней обструкцией мочеточника (ООМ) [2–4]. Тубулоинтерстициальный фиброз – неотъемлемый атрибут практически всех нефропатий. Его формирование определяется сложнейшим комплексом разных механизмов, но одну из важнейших ролей играет гиперэкспрессия трансформирующего фактора роста β . В активации последнего участвуют многие сигнальные пути, в том числе, вовлекающие некодирующие РНК, в частности, малую интерферирующую РНК-21 (миРНК-21) [5, 6]. Так или иначе данные о влиянии метформина на состояние почек остаются противоречивыми, а механизмы взаимодействия препарата с почечной тканью – неясными. В связи с этим мы попытались оценить эффект данного бигуанида на развитие тубулоинтерстициальных повреждений и экспрессию миРНК 21 в моче на экспериментальной модели ООМ у крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для создания модели тубулоинтерстициального фиброза на фоне ООМ были использованы самцы крыс линии Wistar с массой тела 230–250 г

(питомник Колтуши РАН). Были сформированы две группы экспериментальных животных. В первой группе (контроль; n=5) крысы получали стандартный рацион (20% животного белка), животные второй группы (n=5) сразу после выполнения оперативного вмешательства получали стандартную диету и метформин в дозе 10 мг/сут. Срок наблюдения в обеих группах составил 14 сут после моделирования ООМ.

Методика выполнения оперативного вмешательства. Под общей анестезией, ксилазин (0,05 мл) в сочетании с тилетамин/золазепам (0,3 мл), внутрибрюшинно выполняли перевязку левого мочеточника. На мочеточник накладывали 2 лигатуры (использовали шелк 2/0 Silkam). Участок мочеточника между лигатурами перерезали. Во избежание побочного эффекта на развитие фиброза антибиотика в постоперационном периоде не применяли. Правую почку (с неповрежденным мочеточником) использовали в качестве контроля.

За сутки до окончания эксперимента у крыс, находящихся в метаболической камере, в течение 24 ч собирали мочу для последующего определения экспрессии миРНК-21. После выведения животного из эксперимента у каждой крысы производили забор пробы мочи из лоханки левой почки для определения экспрессии миРНК-21, а также образцов почечной ткани для последующих гистологических исследований.

Эксперименты проводили в соответствии с международными стандартами по работе с лабораторными животными с разрешения Этического комитета Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Экспрессию миРНК 21 в моче определяли при помощи реакции амплификации (RealTimePCR-протокол). Расчет проводился по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Изучение патоморфологических изменений в почках проводили светооптически на микроскопе «Carl Zeiss Imager Z 2» (Германия). Препараты окрашивали гематоксилином–эозином. Выраженность изменений оценивали с помощью количественной морфометрии в программе Video Test 5.2 с определением относительного объема тубу-

лоинтерстиция (ООТин) и относительного объема тубулярного эпителия (ООТэ).

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета прикладных статистических программ «Statistica v6.0 StatSoft Inc» (США). Результаты исследования представлены как медиана [нижний – верхний квартиль]. Для выявления различий использовали тест Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольной группе экспериментальная ООМ приводила к закономерному, статистически значимому росту ООТин по сравнению с контралатеральной почкой (табл. 1). Аналогичная ситуация зарегистрирована и в группе животных, получавших метформин (см. табл. 1).

Таблица 1

Относительный объем тубулоинтерстиция, %

Экспериментальные группы	Интактная почка, (n=5)	Почка с ООМ (n=5)	p
Контроль	8,0 [6,0–8,0]	12,0 [11,6–16,0]	0,009
Метформин	5,0 [4,0–9,0]	12,5 [11,3–19,5]	0,028
p	NS	NS	–

Примечание. Здесь и в табл. 2: NS – различия статистически незначимы.

При этом метформин не оказывал существенного влияния на выраженность ООТин ни в контралатеральных (интактных) почках, ни в почках с ООМ (см. табл. 1).

Таблица 2

Относительный объем тубулярного эпителия, %

Экспериментальные группы	Интактная почка, (n=5)	Почка с ООМ (n=5)	p
Контроль	20,0 [17,0–23,0]	15,6 [15,4–16,3]	NS
Метформин	23,0 [19,0–25,0]	14,9 [13,5–17,0]	0,028
p	=NS	=NS	–

В контрольной группе прослеживалось снижение ООТэ в почке с ООМ по сравнению с контралатеральной. Однако этот тренд был далек от заданного уровня статистической значимости (табл. 2). В то же время, обструкция мочеточника у животных с назначением метформина приводила к значимому уменьшению величины ООТэ (см. табл. 2). Как и в случае ООТин, не было существенных различий в уровнях ООТэ в интактных почках или почках с ООМ у животных, получавших и не получавших метформин (см. табл. 2).

Уровень экспрессии миРНК 21 значимо не различался во всех изученных образцах мочи (рисунок).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования не дали доказательств нефропротективного эффекта метформина на модели ООМ. Более того, снижение ООТэ в почке с обструкцией в группе крыс, получавших метформин, скорее может указывать, пусть и довольно косвенно, на повреждающее действие данного бигуанида в отношении почечной ткани (см. табл. 1 и 2). Причины несоответствия полученных данных результатам некоторых других работ [4] могут определяться различиями в видах экспериментальных животных, сроках исследования после ООМ и дозах метформина. Поэтому вопрос о возможном нефропротективном действии препарата нуждается в дальнейшем изучении.

Мы также не обнаружили заметного влияния метформина на уровень экспрессии миРНК 21 в моче (см. рисунок). Однако более неожиданным является то, что ни в группе животных, не получавших метформин, ни у крыс с назначением этого бигуанида не зарегистрировано нарастания экспрессии миРНК 21 в моче. Это кажется тем более странным, что во многих экспериментальных исследованиях как на культурах клеток почек, так и в почечной ткани, том числе, на модели ООМ, выявлялось повышение экспрессии этой РНК [5,6]. Более того, в нашей предыдущей работе у пациентов с различными нефропатиями была обнаружена более высокая мочевого экспрессия миРНК 21, чем у здоровых лиц. При этом у больных с большей выраженностью тубулярной атрофии и величина экспрессии миРНК 21 в моче также оказалась большей [7]. Возможным объяснением данных противоречий может быть то, что моча из чашечно-лоханочной системы почек с ООМ в

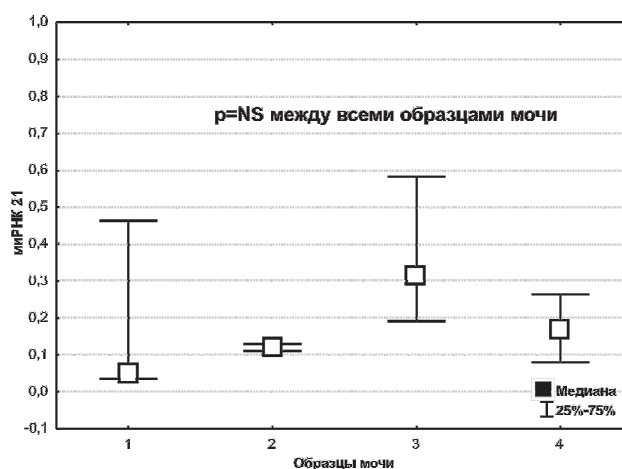


Рисунок. Экспрессия миРНК-21 в моче у крыс с ООМ. 1 – моча из почки с ООМ, 2 – моча из почки с ООМ+метформин, 3 – моча из интактной почки, моча из интактной почки+метформин. NS – различия статистически незначимы.

нашей работе исследовалась через довольно продолжительный срок после наложения лигатуры на мочеточник (2 нед). При этом хорошо известно, что вскоре после индукции обструкции мочевых путей в пораженной почке возникают серьезные функциональные сдвиги, в том числе, приводящие к существенному уменьшению мочевыделения (постренальное острое повреждение почек – преренальное острое повреждение почек) [8]. В связи с этим чашечно-лоханочная система выступает своего рода «контейнером», в котором содержится моча, поступившая туда на ранних этапах обструкции мочеточника. В такой ситуации следует ожидать, что процессы деградации миРНК 21 в застойной моче будут усиливаться, что и приведет к занижению экспрессии этой рибонуклеиновой кислоты, что мы, возможно, и наблюдали в данном исследовании. Для подтверждения последнего предположения было бы целесообразным изучение экспрессии миРНК 21 в моче на более ранних сроках после индукции обструкции мочеточника, что требует дополнительных исследований. В любом случае изучение мочевой экспрессии различных миРНК (в том числе миРНК-21) в клинике и эксперименте является перспективным направлением. Это определяется хотя бы тем, что результаты таких разработок могут послужить основой для создания простых и неинвазивных тестов для диагностики различных вариантов поражений почек, в частности острого повреждения почек [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенной работы не подтвердили нефропротективный эффект метформина на модели формирования тубулоинтерстициального фиброза вследствие односторонней обструкции мочеточника у крыс. Однако для окончательного решения

данного вопроса необходимы дополнительные клинические и экспериментальные исследования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Christiansen CF, Ehrenstein V, Heide-Jørgensen U et al. Metformin initiation and renal impairment: a cohort study in Denmark and the UK. *BMJ Open* 2015;5(9):e008531. doi: 10.1136/bmjopen-2015-008531
2. Nasri H, Baradaran A, Ardalan MR et al. Bright renoprotective properties of metformin: beyond blood glucose regulatory effects. *Iran J Kidney Dis* 2013;7(6):423-428
3. Zhai L, Gu J, Yang D et al. Metformin ameliorates podocyte damage by restoring renal tissue podocalyxin expression in type 2 diabetic rats. *J Diabetes Res* 2015; 2015: 231825. doi: 10.1155/2015/231825
4. Cavaglieri RC, Day RT, Feliers D, Abboud HE. Metformin prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 412: 116-122
5. Duffield JS, Grafals M, Portilla D. MicroRNAs are potential therapeutic targets in fibrosing kidney disease: lessons from animal models. *Drug Discov Today Dis Models* 2013 Fall;10(3):e127-e135
6. Chung AC, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis. *Front Physiol* 2015; 6:50. doi: 10.3389/fphys.2015.00050
7. Смирнов АВ, Карунная АВ, Зарайский МИ и др. Экспрессия микроРНК-21 в моче у пациентов с нефропатиями. *Нефрология* 2014; 18(6): 59-63 [Smirnov AV, Karunnaya AV, Zarayskiy MI i dr. Ekspressiya mikroRNK-21 v moche u patsientov s nefropatiyami. *Nefrologiya* 2014; 18(6): 59-63]
8. Добронравов ВА. Обзор патофизиологии острого повреждения почек. В: Смирнов АВ, Добронравов ВА, Румянцев АШ, Каюков ИГ. *Острое повреждение почек*. МИА, М., 2015; 30-79 [Dobronravov VA. Obzor patofiziologii ostrogo povrezhdeniya pochek. V: Smirnov AV, Dobronravov VA, Rummyantsev ASH, Kayukov IG. *Ostroe povrezhdenie pochek*. MIA, M., 2015; 30-79]
9. Пролетов ЯЮ, Саганова ЕС, Галкина ОВ. Значение биомаркеров в предиктивной диагностике острого повреждения почек. В: Смирнов АВ, Добронравов ВА, Румянцев АШ, Каюков ИГ. *Острое повреждение почек*. МИА, М., 2015; 94-105 [Proletov YaYu, Saganova ES, Galkina OV. Znachenie biomarkerov v prediktivnoy diagnostike ostrogo povrezhdeniya pochek. V: Smirnov AV, Dobronravov VA, Rummyantsev ASH, Kayukov IG. *Ostroe povrezhdenie pochek*. MIA, M., 2015; 94-105]

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 15.05.2015 г.
Принята в печать: 02.11.2015 г.