

DOI: 10.28996/2618-9801-2022-2-339-348

# Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности при развитии контраст-индуцированного острого повреждения почек

С.Н. Жерегеля<sup>1</sup>, С.И. Глушков<sup>1</sup>, А.И. Карпищенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра биологической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» МЗ РФ, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2, Российская Федерация

<sup>2</sup> Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8, Российская Федерация

**Для цитирования:** Жерегеля С.Н., Глушков С.И., Карпищенко А.И. Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности при развитии контраст-индуцированного острого повреждения почек. Нефрология и диализ. 2022; 24(2):339-348. doi: 10.28996/2618-9801-2022-2-339-348

## Deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the development of contrast-induced acute kidney injury

S.N. Zheregelya<sup>1</sup>, S.I. Glushkov<sup>1</sup>, A.I. Karpishchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Chemistry, St. Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., St. Petersburg, 194100, Russian Federation

<sup>2</sup> Clinical Laboratory of Diagnostics with the course of molecular Medicine I.P. Pavlov First State Medical University, 6-8 Lev Tolstoy str., St. Petersburg, 197022, Russian Federation

**For citation:** Zheregelya S.N., Glushkov S.I., Karpishchenko A.I. Deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the development of contrast-induced acute kidney injury. Nephrology and Dialysis. 2022; 24(2):339-348. doi: 10.28996/2618-9801-2022-2-339-348

**Ключевые слова:** глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, пентозофосфатный путь, контраст-индуцированное острое повреждение почек, почка, белые беспородные крысы

### Резюме

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является ключевым ферментом пентозофосфатного пути и основным источником восстановленной формы никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфата (НАДФН). НАДФН – ведущий клеточный восстановитель, играющий центральную роль в выживании клеток. В проведенном исследовании на 200 белых беспородных крысах-самцах определяли динамику изменений концентрации восстановленного глутатиона, малонового диальдегида, а также активности ферментов антиоксидантной защиты (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и каталазы) в тканях почек и в эритроцитах лабораторных животных в условиях интоксикации рентгеноконтрастным препаратом.

Установлено, что применение неионного рентгеноконтрастного препарата «омнипак-350» (йогексол) в средне-смертельной дозе ведет к дефициту активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, снижению уровня НАДФН и повреждению ткани почек и эндотелиальных клеток. Дефицит НАДФН в свою очередь может отразиться на глутатионредуктазной активности, так как этот фермент использует НАДФН для преобразования окисленного глутатиона в восстановленный. Относительная

Адрес для переписки: Сергей Николаевич Жерегеля  
e-mail: sgergely@bk.ru

Corresponding author: Sergey N. Zheregelya  
e-mail: sgergely@bk.ru

недостаточность восстановленного глутатиона, который является основным низкомолекулярным поглотителем свободных радикалов и субстратом глутатион-пероксидазной реакции, ведет к дисбалансу в сторону прооксидантных процессов.

В эритроцитах и тканях почек крыс на фоне введения рентгеноконтрастного препарата отмечалась активация окислительного стресса в виде снижения концентрации восстановленного глутатиона и активности ферментов антирадикальной защиты, а также в виде увеличения содержания продуктов перекисного окисления липидов. Данные сдвиги активности ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы) в тканях почек животных на фоне применения рентгеноконтрастного препарата следует рассматривать как характерные признаки истощения адаптационных резервов клетки.

Тенденция к увеличению содержания креатинина и мочевины в плазме крови отравленных животных, свидетельствующая о снижении функциональной активности нефронов, и морфологическое исследование тканей почек, позволившее выявить признаки активации апоптоза в почечной ткани, послужили подтверждением адекватности выбранной экспериментальной модели на животных для изучения механизмов развития контраст-индуцированного острого повреждения почек.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что снижение активности Г-6-ФДГ может служить пусковым фактором активации свободнорадикальных процессов, играющих важную роль в развитии контраст-индуцированного острого повреждения почек.

### *Abstract*

Glucose-6-phosphate dehydrogenase is a key enzyme of the pentose phosphate pathway and the main source of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). NADPH is a leading cellular reducing agent that plays a central role in cell survival. In a study conducted on 200 white mongrel male rats, the dynamics of changes in the concentration of reduced glutathione, malondialdehyde, as well as the activity of antioxidant defense enzymes (glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and catalase) in kidney tissues and erythrocytes of laboratory animals under the conditions of intoxication with an X-ray contrast preparation were determined.

It was found that the use of the nonionic radiopaque drug omnipak-350 (yogexol) in an average lethal dose leads to a deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, a decrease in NADPH level, and damage to kidney tissue and endothelial cells. NADPH deficiency, in turn, can affect glutathione reductase activity since this enzyme uses NADPH to convert oxidized glutathione into reduced. The relative insufficiency of reduced glutathione, which is the main low-molecular-weight free radical scavenger and substrate of the glutathione peroxidase reaction, leads to an imbalance in pro-oxidant processes.

In the erythrocytes and kidney tissues of rats, against the background of the introduction of the radiopaque drug, activation of oxidative stress was noted in the form of a decrease in the concentration of reduced glutathione and the activity of antiradical protection enzymes, as well as an increase in the content of lipid peroxidation products. These shifts in the activity of antioxidant defense enzymes (catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase) in animal kidney tissues against the background of the use of radiopaque preparation should be considered as characteristic signs of depletion of adaptive reserves of the cell.

The tendency to increase the content of creatinine and urea in the blood plasma of poisoned animals, indicating a decrease in the functional activity of nephrons, and morphological examination of kidney tissues, which revealed signs of activation of apoptosis in renal tissue, served as confirmation of the adequacy of the selected experimental model on animals to study the mechanisms of development of contrast-induced acute kidney injury.

The results obtained allow us to conclude that a decrease in the activity of G-6-FDG can serve as a trigger factor for the activation of free radical processes that play an important role in the development of contrast-induced acute kidney injury.

*Key words:* glucose-6-phosphate dehydrogenase, pentose phosphate pathway, contrast-induced acute kidney injury, kidney, white mongrel rats

### Введение

**Актуальность:** контраст-индуцированное острое повреждение почек – это ятрогенное острое повреждение почек, наблюдаемое после внутрисо-

судистого введения контрастного вещества для диагностических процедур или терапевтических ангиографических вмешательств [1].

Согласно клиническим практическим рекомендациям KDIGO по острому почечному повреждению

критериями развития ОПП являются: увеличение концентрации креатинина сыворотки по крайней мере на 26,5 мкмоль/л по сравнению с исходным значением в течение 48 часов после воздействия рентгеноконтрастного препарата или увеличение более чем в 1,5 раза по сравнению с исходным значением в течение 7 дней после воздействия рентгеноконтрастного препарата или уменьшение объема мочи до уровня ниже 0,5 мл/кг/ч в течение не менее 6 часов после воздействия [2].

Патофизиологические механизмы КИ-ОПП до конца не выяснены. В настоящее время предложено несколько потенциально взаимодействующих и усиливающих механизмов. Полагают, что критическую роль в развитии КИ-ОПП играют гипоксические повреждения мозгового слоя почки, связанные с повышением уровня внутриклеточных активных форм кислорода.

В экспериментальных исследованиях четко доказано, что контрастные вещества уменьшают почечный кровоток в мозговом веществе, индуцируют наработку свободных радикалов кислорода и вызывают апоптоз клеток почечных канальцев [3].

НАДФН является клеточным восстановителем во многих биологических процессах, обеспечивающих ряд критически важных клеточных функций. К таким функциям относятся: биосинтез липидов, цитохром P<sub>450</sub> – зависимые монооксигеназы [4], синтез оксида азота [5], активность антиоксидантной системы, синтез тетрагидробиоптерина [6], активность ГМГ-КоА-редуктазы [7], а также активность НАДФН-оксидазы [8, 9]. Ключевым ферментом пентозофосфатного пути является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ).

В отличие от НАДН, которая обеспечивает электронами митохондриальную дыхательную цепь, НАДФН является источником восстанавливающих эквивалентов в цитоплазме, которые являются необходимыми кофакторами для многих цитоплазматических ферментов, включая антиоксидантную систему. А Г-6-ФДГ можно рассматривать как основной источник НАДФН для функционирования антиоксидантной системы.

В ряде источников [10-13] показано, что именно Г-6-ФДГ является основным источником НАДФН для указанных выше процессов [14-18]. Показано, что мыши с нокаутом Г-6-ФДГ были чрезвычайно чувствительны к пагубному воздействию прооксидантов [19]. 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа производит столько же НАДФН сколько и Г-6-ФДГ, но ее активность лимитируется Г-6-ФДГ, так как последняя находится выше в цепи пентозофосфатного пути и является источником субстрата – 6-фосфоглюконата.

Целью исследования явилось: определение активности Г-6-ФДГ, содержания продуктов липопероксидации (МДА) и состояния антиоксидантной системы (концентрация ВГ, активность ГР, ГП и каталазы)

в тканях почек и эритроцитах белых беспородных крыс в условиях применения неионного РКП в среднесмертельной дозе.

## Материалы и методы

### Модель на животных

Экспериментальные исследования выполнены на 200 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г. Содержание и использование животных в эксперименте проводилось согласно положениям, изложенным в работе И.П. Западнюка (1983). Животных содержали в виварии в пластмассовых клетках по 10 голов при температуре воздуха 20-22°C, естественном освещении, на подстилках из опилок деревьев лиственных пород. Кормление осуществлялось *ad libitum*, в первой половине дня. Сопоставимость экспериментальных групп обеспечивали рандомизацией выборок, использовавшихся в экспериментах.

В ходе экспериментального исследования проводили оценку влияния острого отравления неионным рентгеноконтрастным препаратом (РКП) – «омнипак-350» (йогексол) – водный раствор N,N-бис (2,3-дигидроксипропил)-5-[N-(2,3-дигидроксипропил) ацетамида 2,4,6-триизоталамида («Nicomed», Норвегия) в среднесмертельной дозе (LD<sub>50</sub>) на состояние оксидантной и антиоксидантной систем в тканях почек и эритроцитах лабораторных животных в различные сроки исследования.

Определение LD<sub>50</sub> РКП проводили с использованием «табличного экспресс-метода» по В.Б. Прозоровскому (1994) на 20 животных, срок наблюдения составлял 28 суток. Численное значение LD<sub>50</sub> для омнипак-300 (водный раствор) при внутрибрюшинном введении составило 20 г/кг массы животного.

Экспериментальное исследование проводилось в 3 этапа (в зависимости от сроков экспозиции РКП). На каждом этапе выделялось две группы животных (опытная и контрольная) по 30 особей в каждой. Забой животных проводился через 1 сутки (I этап), 3 суток (II этап) и 5 суток (III этап) после однократного введения препаратов в среднесмертельной дозе. Контрольным животным (интактный контроль) однократно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в дозе 10 мл/кг массы. После затравки до момента забоя животные опытных групп содержались в тех же условиях, что и животных контрольной группы.

Таким образом, каждая из групп (3 опытные и 3 контрольные) включала по 30 лабораторных животных. Так как между контрольными группами отсутствовали достоверные различия, все контрольные группы были объединены.

Погибшие животные из исследования исключались, все биохимические и морфологические исследова-

дования проводились с использованием образцов тканей выживших животных.

### *Получение образцов тканей для исследований*

В день умерщвления животных взвешивали и анестезировали изофлураном. С целью получения материала для исследований от лабораторных животных производили декапитацию крыс. Полученную кровь стабилизировали 4% раствором цитрата натрия в соотношении стабилизатор: кровь – 1:6-1:8, затем охлаждали и немедленно использовали в исследованиях. Извлеченные после декапитации почки отмывали холодным физиологическим раствором от крови в течение 35-50 с и замораживали в жидком азоте. Образцы хранились до момента исследования в сосуде Дюара с жидким азотом.

Перед исследованием почки лабораторных животных извлекали из жидкого азота, взвешивали, измельчали и гомогенизировали в микроизмельчителе тканей РТ-2 (Россия) с пестиковым гомогенизатором при 3000 об./мин, добавляя охлажденный до температуры 0°C 0,1 М калий-фосфатный буфер с рН 7,4 в соотношении ткань:буфер – 1:6.

Полученный гомогенат использовали для определения концентрации восстановленного глутатиона (ВГ), малонового диальдегида (МДА). Время от момента размораживания тканей до отбора проб гомогенатов и осаждения в них белка кислотами не превышало 45-60 с.

Для определения активности ферментов использовали очищенную цитоплазматическую фракцию, которую получали дифференциальным центрифугированием. Гомогенат переносили в пластиковые стаканчики и центрифугировали в течение 20 мин при +4°C с ускорением 20 000 g на центрифуге K-24D (Германия). Супернатант речентрифугировали в течение 60 мин при +2°C при 44 500 об./мин (ускорение 150 000 g) с использованием ротора Type 50 3.Ti на ультрацентрифуге L8-M («Beckman», США). Полученный супернатант использовали для определения активности исследуемых ферментов.

### *Гистологическое исследование ткани почек экспериментальных животных*

Гистологические препараты изготавливали по общепринятой методике [3]. Тканевый материал (почки) получали сразу после декапитации животного, разделяли на две половины и фиксировали в нейтральном формалине (10%). Для проведения гистологических исследований отбирался материал (по одной почке) от 5 животных из каждой группы. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопию выполняли на бинокулярном микроскопе Билам Р-11 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Цифровые микрофотографии выполняли при различных

увеличениях на микроскопе Karl Zeiss (Германия), оборудованным видеовыходом на ПК.

### *Измерение активности Г-6-ФДГ*

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли по методу А. Kornberg и соавт. [20, 21] в модификации С.И. Глушкова [22]. Активность выражали в мкмоль/(мин г белка) для тканей или мкмоль/(мин г гемоглобина) для эритроцитов.

Содержание белка в каждом образце определяли методом Лоури в модификации G.L. Peterson [23, 24].

### *Определение концентрации гемоглобина*

Содержание гемоглобина в гемолизатах эритроцитов определяли с помощью стандартных наборов «Ольвекс» (Россия) гемиглобинцианидным методом [23].

### *Измерение маркеров окислительного стресса*

Уровни глутатиона и активности глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР) и каталазы (КАТ) определяли с помощью спектрофотометрических методов. Так, концентрацию ВГ определяли методом G.L. Ellman (1959) в нашей модификации, заключающейся в осаждении белка 20% раствором сульфосалициловой кислоты. Концентрацию МДА определяли по методу M. Uchiyama (1978). Определение активности ферментов системы глутатиона проводили в гемолизате эритроцитов или в цитозольной фракции, полученной после центрифугирования гомогенатов тканей в течение часа при 150 000 g на ультрацентрифуге L8-M («Beckman», США). Активность глутатионредуктазы определяли по методу I. Garlberg, B. Mannervik (1985), глутатионпероксидазы – по методу А.Н. Гавриловой и Н.Ф. Хмары (1986) с использованием в качестве субстрата гидроперекиси трет-бутила, каталазы – по М.А. Королюку (1988), глутатион-S-трансферазы – методом W.H. Nabig, W.B. Jakoby (1981). Расчет активности ферментов производили на грамм белка или гемоглобина (в гемолизате эритроцитов).

### *Определение биохимических показателей функциональной активности нефронов в сыворотке крови экспериментальных животных*

Биохимические показатели функциональной активности нефронов [25] (концентрации креатинина, мочевины) в сыворотке крови экспериментальных животных определяли на автоматическом биохимическом анализаторе «Synchron» («Beckman – Coulter», США), мочевины на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi – 902 Automatik («Hitachi», Япония).

### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA 6,0». В каждой группе рассчитывали средние значения и ошибку среднего. Проводился корреляционный анализ изменений исследуемых биохимических показателей в эритроцитах и тканях почек лабораторных животных. Достоверность различий в опытной и контрольной группах оценивали по t-критерию Стьюдента. Приведенные в тексте и таблицах значения представляли в виде  $\bar{X} \pm m\bar{x}$ .

### Полученные результаты

#### Общая характеристика животных

В ходе проведения эксперимента у лабораторных животных опытной группы отмечались выраженные клинические изменения, которые проявлялись в виде увеличения массы тела за счет развития отеков, повышенной проницаемости передней брюшной стенки, сопровождающейся выделением жидкости, и летальных исходов. Кроме того, проводилось сравнение количества выпитой жидкости всего экспериментальной группой по отношению к контрольной.

При контрольных взвешиваниях: через 1 сутки после применения неионного РКП увеличения массы тела не отмечалось, на 3 сутки у 10% животных опытной группы наблюдалось увеличение массы тела на 10-30 г (на 5-15% от исходной массы тела).

В первые трое суток в группе опытных животных отмечалось увеличение количества выпитой жидкости (в среднем по 20-25 мл на каждого животного). В более поздние сроки объем выпитой жидкости животными этой группы незначительно отличался от показателей в группе контроля.

В ходе проведенной работы смертность животных от применения неионного рентгеноконтрастного препарата составила по 10% в I опытной группе (через 1 сутки) и по 50% во II и III опытных группах (к исходу 3 и 5 суток). Практически все животные по-

гибали на фоне развития отеков, сопровождающихся увеличением массы тела на 40-70 г, что составляет в среднем около 30% от общей массы тела. Повышенная проницаемость тканевых барьеров проявлялась постоянным мокнутием передней брюшной стенки, а при вскрытии в брюшной полости определялось порядка 7-10 мл асцитической жидкости. У животных опытной и контрольной групп не наблюдалось статистически значимых различий таких показателей как масса почек, ее отношение к массе тела, уровень сывороточного гемоглобина.

#### Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях почек и эритроцитах лабораторных животных при введении РКП

Сравнительная оценка динамики активности Г-6-ФДГ в эритроцитах и тканях почек позволила выявить следующие закономерности. Активность Г-6-ФДГ в эритроцитах животных после применения РКП достоверно не изменялась, хотя и отмечалась стойкая тенденция к снижению (на 22%, 34% и 18%, соответственно, на 1, 3 и 5 сутки) (табл. 1).

В тканях почек животных, получавших РКП, изменения активности фермента были более выраженными: уже в 1 сутки исследования происходило достоверное снижение в 3,7 раза ( $p < 0,05$ ), которое сохранялось в течение всего исследования, и на 5 сутки активность оставалась Г-6-ФДГ в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) ниже показателей животных контрольной группы (табл. 1).

Таким образом, отравления рентгеноконтрастными веществами приводят к заметным сдвигам глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности в ткани почек в виде раннего, стойкого, выраженного ее угнетения. Наиболее существенные изменения, отмечаемые в тканях почек, не могут не сказаться и на состоянии активности всей антиоксидантной системы.

Следует отметить и наличие умеренной положительной корреляционной связи между изменениями данного показателя в эритроцитах и в тканях почек при применении РКП (коэффициент корреляции составил  $-0,53$ ).

Таблица 1 | Table 1

Изменения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях почек и эритроцитах белых беспородных крыс при однократном введении неионного РКП в дозе 200 мг/кг  
Changes in the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in kidney tissues and erythrocytes of white mongrel rats with a single administration of nonionic RCP at a dose of 200 mg/kg

Группа исследования	Количество животных, особей	Сроки исследования, сутки	Эритроциты, мкмоль/(мин г гемоглобина)	Почки, мкмоль/(мин г белка)
Контроль	n=90		6,16 ± 1,10	55,79 ± 9,45
	n=27	1	4,71 ± 0,45	15,23 ± 5,87*
	n=15	3	4,11 ± 0,19	34,94 ± 8,80
	n=15	5	5,09 ± 0,71	23,98 ± 5,23*

\* достоверность отличия  $p < 0,05$  по сравнению с группой контроля

Таблица 2 | Table 2

## Изменения маркеров окислительного стресса и активности антиоксидантных ферментов в тканях почек и эритроцитах белых беспородных крыс при однократном введении неионного РКП в дозе 200 мг/кг

Changes in markers of oxidative stress and activity of antioxidant enzymes in kidney tissues and erythrocytes of white mongrel rats with a single administration of nonionic RCP at a dose of 200 mg/kg

Маркер	Количество животных, особей	Сроки исследования, сутки	Эритроциты	Почки
Восстановленный глутатион (ммоль/г ткани или мкмоль/г гемоглобина)	n=90	Контроль	6,46 ± 0,78	7,44 ± 0,30
	n=27	1	6,05 ± 0,45	7,37 ± 0,35
	n=15	3	6,62 ± 0,73	6,82 ± 0,14
	n=15	5	7,39 ± 0,62	6,93 ± 0,16
Малоновый диальдегид (нмоль/г ткани или нмоль/г гемоглобина)	n=90	Контроль	10,75 ± 0,65	156,57 ± 9,21
	n=27	1	10,94 ± 0,91	178,22 ± 8,55
	n=15	3	11,22 ± 0,46	230,79 ± 18,35*
	n=15	5	12,36 ± 1,07	179,08 ± 6,49
Глутатионредуктаза (мкмоль/(мин г белка) или ммоль/(мин г гемоглобина)	n=90	Контроль	461,87 ± 19,52	154,06 ± 21,74
	n=27	1	439,20 ± 39,96	190,38 ± 27,62
	n=15	3	486,66 ± 38,44	106,72 ± 15,44
	n=15	5	529,58 ± 48,88	59,29 ± 5,66*
Глутатионпероксидаза (ммоль/(мин г белка) или мкмоль/(мин г гемоглобина)	n=90	Контроль	1,58 ± 0,31	3,61 ± 0,30
	n=27	1	1,39 ± 0,07	3,15 ± 0,36
	n=15	3	1,51 ± 0,07	2,16 ± 0,35*
	n=15	5	1,47 ± 0,07	1,83 ± 0,21*
Каталаза (мкмоль/(мин г белка) или мкмоль/(мин г гемоглобина)	n=90	Контроль	19,42 ± 1,91	606,49 ± 70,38
	n=27	1	19,99 ± 1,28	428,08 ± 117,79
	n=15	3	21,22 ± 2,01	138,90 ± 23,82*
	n=15	5	18,43 ± 2,38	334,64 ± 59,07*

\* достоверность отличия  $p < 0,05$  по сравнению с группой контроля**Биомаркеры окислительного стресса**

Биомаркеры используемые для оценки окислительного стресса представлены в таблице 2.

В реализации цитотоксического действия различных ксенобиотиков одно из ключевых мест занимает активация свободнорадикальных процессов, следствием которых и является повышение интенсивности процессов перекисидации липидов в тканях. Несмотря на то, что перекисидации могут подвергаться различные биомолекулы клетки – липидные структуры, нуклеиновые кислоты и белки, изучение состояния процессов перекисидного окисления липидов (ПОЛ) в условиях применения РКП не только отражает степень окислительного повреждения макромолекул клетки, но и позволяет оценить влияние токсиканта на состояние ряда мембранных функций клеток и органов.

Введение РКП сопровождалось активацией процессов перекисидного окисления липидов, о чем свидетельствует накопление их конечных продуктов – МДА в тканях почек (табл. 2.).

Максимальный рост содержания МДА – на 47% ( $p < 0,05$ ) выше нормы отмечался на 3 сутки после введения РКП.

**Основные компоненты антиоксидантной защиты**

В настоящее время в работах ряда авторов приводятся данные как об активации системы антиоксидантной защиты в ответ на повышенное образование свободных радикалов и органических гидроперекисей [7, 26], так и о возможности истощения адаптивных возможностей системы антирадикальной защиты [26].

К числу антиоксидантных ферментов, осуществляющих утилизацию не только АФК, но и продуктов перекисидации органических биомолекул, относятся глутатионпероксидаза, а также глутатион-S-трансфераза, которая проявляет Se-независимую глутатионпероксидазную активность. Действуя функционально синергично, ГП и ГТ обеспечивают защиту клетки от повреждающего действия АФК и свободных радикалов, взаимно дополняя антиоксидантную активность. Немалый вклад в антиоксидантную защиту вносит каталаза, которая принимает непосредственное участие в восстановлении перекиси водорода, а также обладает определенной пероксидазной активностью.

В эритроцитах отравленных животных мы не отмечали существенных сдвигов со стороны компо-

Таблица 3 | Table 3

## Изменения концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови белых беспородных крыс при введении неионного РКП в суточной дозе 20 г/кг на 1-5 сут

Changes in the concentration of urea and creatinine in the blood serum of white mongrel rats with the introduction of nonionic RCP at a daily dose of 20 g/kg for 1 to 5 days

Группа исследования	Сроки исследования, сутки	Исследуемый орган	
		Мочевина, ммоль/л	Креатинин, ммоль/л
Контроль		2,17 ± 0,19	26,40 ± 4,34
	1	2,19 ± 0,83	27,01 ± 2,65
	3	3,95 ± 1,31	39,19 ± 13,69
Омнипак LD <sub>50</sub>	5	2,39 ± 0,45	29,31 ± 1,01

\* достоверность отличия  $p < 0,05$  по сравнению с группой контроля

нентов системы антирадикальной защиты, в течение всего периода исследования концентрация ВГ и активность ферментов практически не отличались от контрольных значений (табл. 2). Иная картина была характерна для почечной ткани: нам удалось установить, что на фоне использования РКП, даже несмотря на отсутствие существенных изменений концентрации ВГ, происходят выраженные сдвиги активности ферментов антиоксидантной защиты – каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (табл. 2), которые следует признать характерными для истощения адаптационных резервов. Действительно, после умеренного подъема активности ГР в ранние сроки в 1,24 раза, затем происходило её снижение в 2,60 раза ( $p < 0,05$ ) ниже контрольных значений. Практически в течение всего периода исследования отмечалось достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение активности ГП и каталазы с максимальной выраженностью на 3-5 сутки: в 1,97 и в 4,37 раза, соответственно.

*Лабораторные показатели функциональной активности нефронов* [25] (содержание креатинина и мочевины в плазме крови) (табл. 3). На фоне введения РКП в плазме крови животных была отмечена тенденция к увеличению содержания креатинина – в 1,48 раза и мочевины – в 1,82 раза, соответственно. Это косвенно может свидетельствовать о снижении функциональной активности нефронов.

**Морфологическая картина тканей почек экспериментальных животных при введении РКП**

На 1 сутки отмечается субтотальная баллонная гидропическая дистрофия, в большинстве случаев уже переходящая в коликвационный некроз. Некоторая контракция почечных клубочков. У основания собирательных трубочек единичные длинные эозинофильные гиалиновые цилиндры. Эпителий собирательных трубочек так же подвержен баллонной дистрофии, о чем свидетельствует сильно вакуолизированная цитоплазма. Лейкоцитарной инфильтрации нет.

К 3 суткам отмечается субтотальный некроз почечной паренхимы. Неповрежденные нефроны

практически не регистрируются. В некоторых участках коркового вещества имеются канальцы с признаками гидропической дистрофии, в остальных отделах произошла гибель эпителиоцитов. Их цитоплазма крупно-вакуолизирована и разрушена, клеточный детрит полностью заполняет просветы, что приводит к формированию базофильных гиалиновых цилиндров. Имеются большие участки с десквамированным эпителием. В области основания собирательных трубочек имеется незначительное количество эозинофильных гиалиновых цилиндров, в дистальных отделах цилиндры так же немногочисленны. Тенденция к контракции и гибели клубочков сохранена. Отмечается присутствие единичных нейтрофильных гранулоцитов.

Выявленные морфологические изменения, а также лабораторные показатели нарушения функциональной активности нефронов послужили подтверждением адекватности выбранной экспериментальной модели на животных для изучения механизмов развития контраст-индуцированного острого повреждения почек.

### Обсуждение

При обобщении полученных результатов исследования в тканях лабораторных животных при введении РКП можно отметить следующее:

1. Морфологические изменения почечной ткани происходят на фоне выраженного снижения активности Г-6-ФДГ.

2. Уже через 1 сутки после введения РКП на фоне отсутствия достоверных изменений концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови происходят умеренные морфологические изменения в почечной ткани. Выявляются дистрофически измененные и некротизированные нефроциты канальцев, гибель эпителия почечных канальцев. Отмечается раннее снижение активности Г-6-ФДГ в тканях почек и эритроцитах экспериментальных животных.

3. К 3 суткам эксперимента на фоне сохраняющегося снижения активности Г-6-ФДГ в почечной ткани отмечается накопление концентрации МДА, снижение активности глутатионпероксидазы, глута-

тионредуктазы и каталазы, формируются морфологические изменения (полная десквамация почечного эпителия в канальцах), имеющие необратимый характер. В эти сроки становятся информативными лабораторные маркеры развития функциональной недостаточности нефронов.

Нормальное функционирование системы детоксикации РКП тесно связано с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакцией как основного поставщика восстановленных эквивалентов (НАДФН). В связи с этим, именно активность Г-6-ФДГ может явиться лимитирующим фактором данного процесса [27-30].

Повышенный окислительный стресс наблюдается при многих заболеваниях, в том числе связанных с повреждением почек, гипертонией и сахарным диабетом [31-34]. НАДФН, продуцируемый Г-6-ФДГ, имеет центральное значение для регуляции многих систем, связанных с активностью антиоксидантных ферментов. Многие исследования показали, что частичное или полное ингибирование активности Г-6-ФДГ делает клетки чрезвычайно чувствительными к окислительному стрессу. Например, Rosenstrauss и Chasin [35], используя Г-6-ФДГ-дефицитную клеточную линию CHO, показали, что Г-6-ФДГ-дефицитные клетки более восприимчивы к окислительному стрессу.

Полученные данные о динамике изменений активности этого фермента можно объяснить его структурными особенностями – наличием в активном центре фермента сульфгидрильной группы. Поэтому снижение активности Г-6-ФДГ при введении РКП может быть связано с образованием дисульфидов тиоловых групп энзима, а также с повреждающим действием на молекулы фермента АФК и свободных радикалов [36, 37]. В свою очередь, усиленное расходование НАДФН в глутатион-редуктазной и цитохром Р-450-редуктазной реакциях [26, 38] усугубляет процессы истощения резервов компенсаторного ответа системы глутатиона. Подтверждением роли образования дисульфидных групп в падении активности Г-6-ФДГ может служить и снижение концентрации сульфгидрильных групп на 22% ( $p < 0,05$ ) в тканях почек отравленных животных уже в 1 сутки исследования.

Дефицит НАДФН в свою очередь может отразиться на глутатион-редуктазной активности, так как ГР использует НАДФН для преобразования окисленного глутатиона в восстановленный. А относительная недостаточность ВГ, который является основным низкомолекулярным поглотителем свободных радикалов и субстратом глутатион-пероксидазной реакции [39], ведет к дисбалансу в сторону прооксидантных процессов. Кроме того, активность каталазы и супероксиддисмутазы также зависят от НАДФН. Супероксиддисмутаза не использует в качестве субстрата НАДФН, но эффективное превращение супероксиданиона в  $H_2O_2$  возможно только в слу-

чае снижения концентрации перекиси с помощью НАДФН-зависимых систем: каталазы или глутатионпероксидазы. Следует добавить, что каталаза хоть и не превращает НАДФН в НАДФ, но имеет аллостерический сайт связывания для НАДФН, который поддерживает фермент в его наиболее активной тетрамерной форме [16, 40]; следовательно, активность каталазы зависит от уровня НАДФН. Таким образом, адекватные уровни НАДФН необходимы для поддержания работы основных компонентов клеточной антиоксидантной системы, а изменения, наблюдаемые у животных на фоне введения РКП, вероятно, связаны с дисфункцией антиоксидантной системы из-за недостаточного производства НАДФН.

## Выводы

Снижение активности Г-6-ФДГ в тканях почек может внести существенный вклад в формирование окислительного стресса, активацию воспалительных процессов и развитие контраст-индуцированного острого почечного повреждения.

Проведенное исследование показало, что возрастающая прооксидантная нагрузка приводит к увеличению потребности в восстановленных эквивалентах, в частности НАДФН, однако интенсивность процессов восстановления последнего недостаточна, в связи с выраженным снижением активности Г-6-ФДГ.

Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности является одним из патофизиологических механизмов в патогенезе дисфункции почек при контраст-индуцированном остром повреждении почек.

*Никто из авторов не имеет конфликтов интересов.*

*None of the authors has any conflicts of interest.*

*Вклад авторов: Ж.С.Н. – сбор и обработка материала, написание исходного варианта текста; Г.С.И. – концепция и дизайн исследования, написание текста, К.А.И. – концепция и дизайн исследования, окончательное редактирование текста рукописи.*

*Authors contribution: Zh.S.N. – collection and processing of the material, writing the original version of the text; G.S.I. – concept and design research, writing the text; K.A.I. – concept and design research, final editing of the text of the manuscript.*

## Список литературы

1. Pattharanitima P., Tasanarong A. Pharmacological Strategies to Prevent Contrast-Induced Acute Kidney Injury. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 1-21. doi:

10.1155/2014/236930.

2. Work Group Membership. *Kidney Int Suppl* (2011). 2012; 2(1): 2. doi: 10.1038/kisup.2012.2.

3. *Vandenbergh W., De Corte W., Hoste E.* Contrast-associated AKI in the critically ill. *Curr Opin Crit Care*. 2014; 20(6): 596-605. doi: 10.1097/mcc.0000000000000156.

4. *Munro A., Girvan H., McLean K.* Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2007; 1770(3): 345-359. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.08.018.

5. *Kitagawa A., Kizub I., Jacob C. et al.* CRISPR-Mediated Single Nucleotide Polymorphism Modeling in Rats Reveals Insight Into Reduced Cardiovascular Risk Associated With Mediterranean G6PD Variant. *Hypertension*. 2020; 76(2): 523-532. doi: 10.1161/hypertensionaha.120.14772.

6. *Leopold J., Zhang Y., Scribner A. et al.* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Overexpression Decreases Endothelial Cell Oxidant Stress and Increases Bioavailable Nitric Oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(3): 411-417. doi: 10.1161/01.atv.0000056744.26901.ba.

7. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы. *Успехи совр. биол.* 1993. 113(1): 107–122.

*Kulinskij V.I., Kolesnichenko L.S.* Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы. *Успехи совр. биол.* 1993. 113(1): 107–122.

8. *Muller G., Morawietz H.* NAD(P)H Oxidase and Endothelial Dysfunction. *Hormone and Metabolic Research*. 2008; 41(02): 152-158. doi: 10.1055/s-0028-1086023.

9. *Thomas J., Kang S., Wyatt C. et al.* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency is Associated with Cardiovascular Disease in U.S. Military Centers. *Tex Heart Inst J*. 2018; 45(3): 144-150. doi: 10.14503/thij-16-6052.

10. *Longo L.* Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. *EMBO J*. 2002; 21(16): 4229–v4239. doi: 10.1093/emboj/cdf426.

11. *Nicol C.J., Zielenski J., Tsui L.C., Wells P.G.* An embryo-protective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *The FASEB Journal*. 2000; 14(1): 111-127. doi: 10.1096/fasebj.14.1.111.

12. *Pandolfi P., Sonati F., Rivi R. et al.* Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J*. 1995; 14(21): 5209-5215. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00205.x.

13. *Pes G., Parodi G., Dore M.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of cardiovascular disease: A propensity score-matched study. *Atherosclerosis*. 2019; 282: 148-153. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.027.

14. *Ho H., Cheng M., Lu F. et al.* Enhanced oxidative stress and accelerated cellular senescence in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 29(2): 156-169. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00331-2.

15. *Ou Z., Chen Y., Li J. et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and stroke outcomes. *Neurology*. 2020; 95(11): 1471-1478. doi: 10.1212/wnl.00000000000010245.

16. *Stincone A., Prigione A., Cramer T. et al.* The return of

metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*. 2014; 90(3): 927-963. doi: 10.1111/brv.12140.

17. *Tian W., Braunstein L., Apse K. et al.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1999; 276(5): C1121-C1131. doi: 10.1152/ajpcell.1999.276.5.c1121.

18. *Tian W., Braunstein L., Pang J. et al.* Importance of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity for Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(17): 10609-10617. doi: 10.1074/jbc.273.17.10609.

19. *Lee C., Chasalow F., Lee S. et al.* A null mutation of cytoplasmic malic enzyme in mice. *Mol Cell Biochem*. 1980; 30(3). doi: 10.1007/bf00230167.

20. *Медицинские лабораторные технологии: Руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2-х т. Под ред. А.И. Карпищенко. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. ГЭОТАР-Медиа, 2012. 1. 792 с.*

*Medicinskie laboratornye tekhnologii: Rukovodstvo po klinicheskoj laboratornoj diagnostike: v 2-h t. Pod red. A.I. Karpishchenko. – 3-e izd., pererab. i dop. – M. GEOTAR-Media, 2012. 1. 792 s.*

21. *Kornberg A., Horecker B.L., Smyrniot P.Z.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase – 6-phosphogluconic dehydrogenase. *Meth. Enzymol*. 1955; 1: 323-327.

22. *Глушков С.И.* Нарушения системы глутатиона и их роль в патогенезе острых интоксикаций ксенобiotиками с различными механизмами токсического действия: Дис. на соискание уч. степени д-ра. мед. наук. 2006. Воен.-мед. акад. СПб. 451 с.

*Glushkov S.I.* Narusheniya sistemy glutationa i ih rol' v patogeneze ostryh intoksikacij ksenobiotikami s razlichnymi mekhanizmami toksicheskogo dejstviya: Dis. na soiskanie uch. stepeni d-ra. med. nauk. 2006. Voen.-med. akad. SPb. 451 s.

23. *Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2-х т. Под ред. А.И. Карпищенко. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. ГЭОТАР-Медиа, 2013. 2. 472 с.*

*Medicinskie laboratornye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoj laboratornoj diagnostike: v 2-h t. Pod red. A.I. Karpishchenko. – 3-e izd., pererab. i dop. – M. GEOTAR-Media, 2013. 2. 472 s.*

24. *Peterson G.* A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977; 83(2): 346-356. doi:10.1016/0003-2697(77)90043-4.

25. *WHO Handbook for reporting results of cancer treatment // WHO Offset Publication NO. Geneva, 1985. 48 p.*

26. *Туинов Л.А.* Механизмы естественной детоксикации и антиоксидантной защиты. *Вестник РАМН*. 1995; 3: 9-13.

*Tuinov L.A.* Mekhanizmy estestvennoj detoksikacii i antioksidantnoj zashchity. *Vestnik RAMN*. 1995; 3: 9-13.

27. *Туинов Л.А., Иванова В.А.* Роль глутатиона в процессах детоксикации. *Вест. АМН СССР*. 1988; 1: 62-69.

*Tuinov L.A., Ivanova V.A.* Rol' glutationa v processah detoksikacii. *Vest. AMN SSSR*. 1988; 1: 62-69.

28. *Corbucci G.G.* The role of reduced glutathione during the course of acute haemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients: clinical and pharmacodynamic aspects.

Int. J. Clin. Pharmacol. Res. 1990; 10(5): 305-310.

29. Fico A., Pagliarunga F., Cigliano L. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2004; 11(8): 823-831. doi:10.1038/sj.cdd.4401420.

30. Жерегеля С.Н. Обмен глутатиона в патогенезе развития рентгеноконтрастных нефропатий. Дис. на соискание уч. степени. канд. мед. наук. Воен.-мед. акад. СПб, 2010. 197 с.

Zheregehya S.N. Obmen glutatiiona v patogeneze razvitiya rentgenokonstrastnykh nefropatij. Dis. na soiskanie uch. stepeni. kand. med. nauk. Voen.-med. akad. SPb, 2010. 197 s.

31. Rahangdale S. Therapeutic interventions and oxidative stress in diabetes. *Frontiers in Bioscience*. 2009; 14:192. doi: 10.2741/3240.

32. Touyz R. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension. *Hypertension*. 2004; 44(3): 248-252. doi: 10.1161/01.hyp.0000138070.47616.9d.

33. Zhao J., Zhang X., Guan T. et al. The association between glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and abnormal blood pressure among prepregnant reproductive-age Chinese females. *Hypertension Research*. 2018; 42(1): 75-84. doi: 10.1038/s41440-018-0118-1.

34. Horton J. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30(6): 1091-1095. doi: 10.1042/bst0301091.

35. Rosenstraus M., Chasin L. Isolation of mammalian cell mutants deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity: linkage to hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975; 72(2): 493-497. doi: 10.1073/pnas.72.2.493.

36. Nóbrega-Pereira S., Fernandez-Marcos P., Briocbe T. et al. G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice. *Nat Commun*. 2016; 7(1): doi: 10.1038/ncomms10894.

37. Cachofeiro V., Goicochea M., de Vinuesa S. et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int*. 2008; 74: 4-9. doi: 10.1038/ki.2008.516.

38. Еропкина М.Ю., Еропкина Е.М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. СПб. МОРСАР АВ, 2003. 239 с.

Eropkin M.YU., Eropkina E.M. Kul'tury kletok kak model'naya sistema issledovaniya toksichnosti i skringinga citoprotekturnykh preparatov. SPb. MORSAR AV, 2003. 239 s.

39. Kebrer J., Lund L. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994; 17(1): 65-75. doi: 10.1016/0891-5849(94)90008-6.

40. Majumder P., Blacker T., Nolan L. et al. Multiphoton NAD(P)H FLIM reveals metabolic changes in individual cell types of the intact cochlea upon sensorineural hearing loss. *Sci Rep*. 2019; 9(1). doi:10.1038/s41598-019-55329-x.

Дата получения статьи: 26.09.2021

Дата принятия к печати: 26.03.2022

Submitted: 26.09.2021

Accepted: 26.03.2022