

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 576.08

doi:10.18499/2225-7357-2023-12-4-38-46

1.5.22 – клеточная биология

3.3.2 – патологическая анатомия



## Особенности экспрессии белка Клото в почках крыс при экспериментальной гипергликемии на фоне фармакологической коррекции производными ГАМК

Д. А. Кавалерова<sup>✉</sup>, Г. Л. Снигур, С. С. Сурин, И. Н. Тюренков,  
Д. А. Бакулин, Э. Ю. Сахарова

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

**Аннотация.** Цель – выявить особенности экспрессии белка Клото в эпителии извитых канальцев почки при длительной экспериментальной гипергликемии и фармакологической коррекции производными ГАМК. **Материал и методы.** Исследование проведено на 50 беспородных крысах-самцах (исходная масса: 330,0–360,0 г) со стрептозотоциновым диабетом длительностью 6 мес. Через 6 мес. после инъекции стрептозотоцина (60 мг/кг) в исследование включали животных с уровнем гликемии  $\geq 15$  ммоль/л (после 4-часовой пищевой депривации), затем в течение 30 дней перорально вводили производные ГАМК (аминалон, мефаргин, сукцикард). Далее оценивали протеинурию и концентрацию креатинина в сыворотке крови. После эвтаназии ткань почек фиксировали в забуференном нейтральном формалине и исследовали с помощью методов иммунофлуоресцентной микроскопии. Интенсивность свечения оценивали на основании визуально-аналоговой шкалы. **Результаты.** При определении уровня суточной протеинурии и уровня креатинина в сыворотке крови в группе с хронической гипергликемией без лечения отмечалось значительное повышение содержания белка в суточной моче и уровня креатинина в сыворотке крови ( $p < 0,05$ ). При проведении иммунофлуоресцентного анализа в группе животных с хронической гипергликемией без лечения отмечалось значительное снижение экспрессии белка Клото по сравнению с группой интактных животных. В группе, курсом получавшей производное ГАМК сукцикард, отмечалось улучшение функции почек, сопровождающееся достоверным увеличением ( $p \leq 0,0001$ ) площади Клото-позитивного материала в эпителии извитых канальцев почки по отношению к группе животных с длительной гипергликемией без лечения. **Заключение.** Длительная гипергликемия вызывает выраженное нарушение функции почек у крыс со стрептозотоциновым диабетом: повышение уровня протеинурии и креатинина в сыворотке крови сопровождается снижением экспрессии белка Клото в почках. Производное ГАМК сукцикард при курсовом введении улучшает функцию почек, и данный эффект сопровождается повышением экспрессии белка Клото.

**Ключевые слова:** белок Клото, гипергликемия, почка, извитые канальцы, производные ГАМК

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №21-15-00192 от 19.04.2021.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Кавалерова Д.А., Снигур Г.Л., Сурин С.С., Тюренков И.Н., Бакулин Д.А., Сахарова Э.Ю. Особенности экспрессии белка Клото в почках крыс при экспериментальной гипергликемии на фоне фармакологической коррекции производными ГАМК // Журнал анатомии и гистопатологии. 2023. Т.12, №4. С. 38–46. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2023-12-4-38-46>

## ORIGINAL ARTICLES

Original article

## Features of Klotho Protein Expression in Rat Kidneys in Experimental Hyperglycemia Against the Background of Pharmacological Correction with GABA Derivatives

D.A. Kavalerova<sup>✉</sup>, G.L. Snigur, S.S. Surin, I.N. Tyurenkov,  
D.A. Bakulin, E.Yu. Sakharova

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

**Abstract.** The aim is to identify the features of Klotho protein expression in the epithelium of the convoluted tubules of the kidney during prolonged experimental hyperglycemia and pharmacological correction with GABA derivatives. **Material and methods.** The study used 50 mongrel male rats (initial weight: 330,0–360,0 g) with streptozotocin diabetes lasting 6 months. 6 months after the injection of streptozotocin (60 mg/kg), animals with a glycemic level of  $\geq 15$  mmol/l were included in the study (after 4 hours of food deprivation), then GABA derivatives (aminalon, mefargine, succicard) were administered orally for 30 days.

©Кавалерова Д.А., Снигур Г.Л., Сурин С.С., Тюренков И.Н., Бакулин Д.А., Сахарова Э.Ю., 2023

Proteinuria and serum creatinine concentrations were evaluated. After euthanasia, kidney tissue was fixed in buffered neutral formalin and examined using immunofluorescence microscopy. The intensity of the glow was evaluated based on a visual-analog scale. **Results.** In the group with chronic hyperglycemia without treatment, there was a significant increase in the protein content in daily urine and serum creatinine levels ( $p < 0.05$ ). In the group of animals with chronic hyperglycemia without treatment, there was a significant decrease in the expression of Klotho protein compared to the group of intact animals during immunofluorescence analysis. In the group treated with the GABA derivative succinylcholine, there was an improvement in the functional state of the kidneys, accompanied by a significant increase ( $p \leq 0.0001$ ) in the area of Klotho-positive material in the epithelium of the convoluted tubules of the kidney in relation to the group of animals with prolonged hyperglycemia without treatment. **Conclusion.** Prolonged hyperglycemia causes severe renal dysfunction in rats with streptozotocin diabetes: an increase in the proteinuria and serum creatinine levels is accompanied by a decrease in the expression of Klotho protein in the kidneys. The GABA derivative succinylcholine with course administration improves kidney function and this effect is accompanied by an increase in the expression of Klotho protein.

**Keywords:** Klotho protein, hyperglycemia, kidney, convoluted tubules, GABA derivatives

**Funding:** the research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation grant No. 21-15-00192 dated April 19, 2021.

**Conflict of interests:** the authors declare no conflict of interests.

**For citation:** Kavalerova D.A., Snigur G.L., Surin S.S., Tyurenkov I.N., Bakulin D.A., Sakharova E.Yu. Features of Klotho protein expression in rat kidneys in experimental hyperglycemia against the background of pharmacological correction with GABA derivatives. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2023. V. 12, №4. P. 38–46. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2023-12-4-38-46>

## Введение

Длительная гипергликемия вносит существенный вклад в механизмы повреждения структурно-функциональных элементов почки, что может сопровождаться изменениями функционального состояния и структуры сосудистой стенки внутриорганных ветвей почечной артерии, проксимальных и дистальных извитых канальцев, капиллярных петель клубочков и интерстиция. Изменения углеводного обмена сопровождаются нарушением липидного и белкового обменов, на фоне которых может возникать окислительный стресс [10, 11]. В современной литературе обсуждается роль нарушений синтеза белка Клото при нарушениях углеводного обмена, при этом остаются мало изученными причинно-следственные связи между изменением уровня и регуляцией экспрессии данного белка с патогенезом отдельных осложнений сахарного диабета [25].

Белок Клото относится к семейству 1-гликозидаз (подсемейство  $\beta$ -глюкуронидаз) и состоит из трех изоформ:  $\alpha$ -Клото,  $\beta$ -Клото,  $\gamma$ -Клото. Все они схожи между собой по первичной структуре, но различны по своей локализации в тканях и функциональной активности [8, 16]. Изоформы белка Клото состоят из цитоплазматического и внеклеточного доменов, локализованных в цитоплазме (мембранная форма). В результате протеолитической посттрансляционной модификации появляются циркулирующие (растворимые) формы белка Клото. Изоформа  $\alpha$ -Клото экспрессируется в эпителиальных клетках дистальных извитых канальцев почек, в меньших количествах определяется в клетках головного мозга и поджелудочной железы,  $\beta$ -Клото – печени,  $\gamma$ -Клото – почках, бурой жировой ткани и тканях глаза [5, 20, 23, 26].

Белок Клото принимает участие в регуляции апоптоза (подавляет путь p53/p21), является антагонистом ядерного транскрипци-

онного фактора каппа-В (NF- $\kappa$ B), предотвращает старение, уменьшает фиброз и гипертрофию, нормализует уровень артериального давления, усиливает секрецию инсулина, подавляет пролиферацию и рост опухолевых клеток, усиливает миелинизацию, участвует в поддержании фосфатного гомеостаза и метаболизма витамина D [12, 13, 15, 17, 18, 22, 24, 25]. Активно изучаются сигнальные пути и механизмы воздействия белка Клото на биологически важные процессы и способы фармакологической регуляции его экспрессии. Обсуждаются три пути действия белка Клото на клетку: через рецептор, транслокация через мембрану с вовлечением универсальных клеточных механизмов; взаимодействие с лигандом или рецептором лиганда. Известно также, что внутриклеточный белок Клото способен принимать участие в экспрессии генов, регулирующих возрастные изменения и воспаление [1].

Многочисленные исследования так же подтвердили защитный эффект гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) при остром повреждении не только инсулоцитов, но и клеток почек. Введение ГАМК и ее производных вызывает положительный эффект, подавляя аутоиммунные реакции, апоптоз и улучшая функциональное состояние инсулоцитов [3, 10]. Также ГАМК может оказывать нефропротективное действие при сахарном диабете (СД): снижать атрофию канальцев, уменьшать признаки полнокровия в интерстиции почечной ткани и окислительное повреждение тканей почек лабораторных животных, индуцированное введением стрептозотцина [9]. Активно исследуется гипотеза о способности ГАМК активировать транскрипционный фактор Nrf2 (ядерный фактор, родственный эритроидному фактору 2) и подавлять активность NF- $\kappa$ B. Активация Nrf2 приводит к повышению экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты: глутатионпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы

и др., что способствует ослаблению окислительного стресса и перекисного окисления липидов [21]. Подавление активности NF- $\kappa$ B приводит к снижению экспрессии iNOS, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , что оказывает противовоспалительное действие [9].

У лабораторных животных с нокаутом протеина Клото и стрептозотоциновой интоксикацией наблюдается ускоренное старение. С возрастом у людей при заболеваниях почек и сахарном диабете наблюдается снижение уровня циркулирующего Клото. При этом установлено, что ГАМК способна увеличивать экспрессию белка Клото при диабете, вызванном стрептозотоциновой интоксикацией в почечной ткани и в панкреатических островках [9].

Таким образом, целесообразно продолжить поиск средств для профилактики осложнений сахарного диабета, в частности диабетической нефропатии, среди производных ГАМК, которые могут проявлять более выраженную активность в отношении белка Клото.

### Материалы и методы исследования

В исследовании использовались 50 беспородных крыс-самцов с массой тела 330,0–360,0 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета с 12 ч / 12 ч свето-темновым циклом при относительной влажности воздуха 40–50% и температуре 22–24°C (ГОСТ Р 33044-2014, 2015). Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986 г.), Директиве Совета Европейских сообществ от 22 сентября 2010 г. (2010/63/EU) по уходу за лабораторными животными, а также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 33044-2014, 2015) и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199-н от 01.04.2016 г.). Дизайн исследования и протокол были одобрены локальным этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета, протокол № 2022/116 от 04.03.2022 г. (регистрационный номер: IRB 00005839 IORG 0004900 (OHPR)).

В работе была использована экспериментальная модель, рекомендованная в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств для изучения отдаленных последствий СД, в которой с целью формирования осложнений используют крыс со стрептозотоциновым диабетом длительностью 6 месяцев [2]. Патологию моделировали однократным внутривенным вве-

дением растворенного в цитратном буфере (0,1 М, pH 4,5) стрептозотоцина («Sigma», США) в дозе 60 мг/кг после ночного голодания. Используемая доза обеспечивает полную гибель бета-клеток с развитием через 3 дня выраженной тощаковой (забор корма за 4 часа до измерения) гликемии  $\geq 15$  ммоль/л, которая сохранялась на протяжении 6 месяцев после инъекции. Для измерения уровня гликемии использовали глюкометр Contour TS и соответствующие тест-полоски (Bayer, Германия). Кровь для измерений забирали при пункции подъязычной вены.

Через 6 месяцев после моделирования СД формировали экспериментальные группы и в течение 30 дней проводили соответствующее лечение: вещества вводили перорально в виде водных суспензий в объеме 0,5 мл на 1 кг массы тела. В качестве лечения использовали производные линейной и циклической ГАМК (композиции мефаргин и сукцикард соответственно), которые были синтезированы в ФГБОУ ВО РГПУ им. А.И. Герцена. Мефаргин представляет собой композицию гидрохлорида метилового эфира DL-4-амино-3-фенилбутановой кислоты и моногидрохлорида L-2-амино-5-гуанидинпентановой кислоты (моногидрохлорида L-аргинина) в соотношении 1:1. Сукцикард представляет собой композицию 2-(2-Оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)ацетамида и бутандиовой (янтарной) кислоты в соотношении 2:1. В качестве референтного препарата была выбрана линейная ГАМК – препарат аминалон (Борисовский ЗМП ОАО, Беларусь). Группе негативного контроля вводили физиологический раствор – «СД+физ.р-р» в объеме 0,5 мл на 1 кг массы тела (per os). В качестве позитивного контроля использовали крыс без СД той же партии животных – «Интакт». Экспериментальные группы: 1) «Интакт» – группа интактных животных, физ. р-р 10 мл/кг (n=10); 2) «СД+физ. р-р» – животные с СД, физ. р-р 10 мл/кг (n=10); 3) «СД+Аминалон» – животные с СД, аминалон 1000 мг/кг (n=10); 4) «СД+Мефаргин» – животные с СД, мефаргин 20 мг/кг (n=10); 5) «СД+Сукцикард» – животные с СД, сукцикард 50 мг/кг (n=10).

Количественное определение содержания белка в суточной моче и креатинина в сыворотке крови проводили с использованием наборов реагентов КлиниТест-БМ ПГК (В-10862) (Эко-Сервис, Россия) и Креатинин-Д-Ольвекс (004.002) (Ольвекс, Россия) соответственно, согласно инструкциям изготовителя. Мочу собирали с использованием метаболитических камер 3701M081 (Tecniplast, Италия).

Вывод животных из эксперимента проводился через 24 ч после последнего введения экспериментальных субстанций путем декапитации под хлоралгидратным наркозом. Для гистологического исследования из группы случайным образом отбирались по 6 животных, у которых выделяли почки, затем ткань

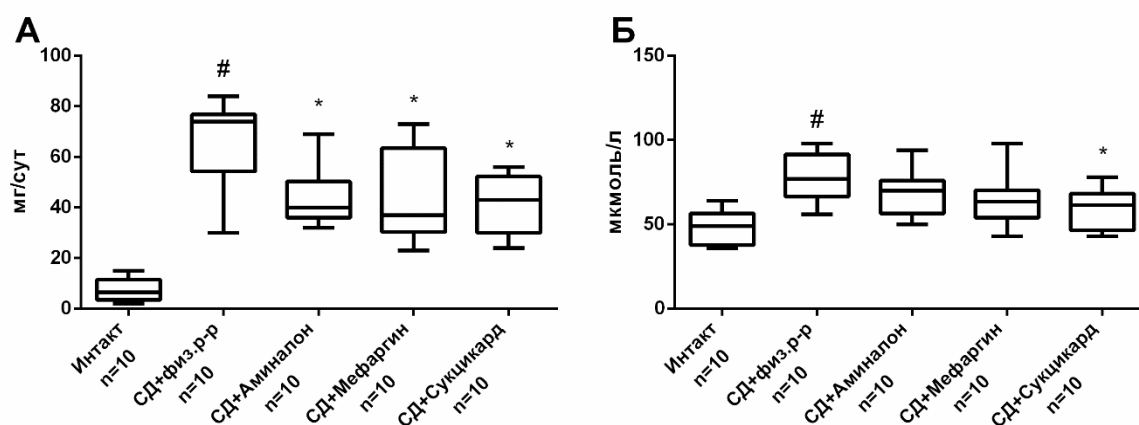


Рис. 1. Уровень суточной протеинурии (мг/сут) (А) и концентрация креатинина в сыворотке (Б) экспериментальных животных. Примечание: # –  $p < 0,05$  – различия статистически значимы по сравнению с группой «Интакт»; \* –  $p < 0,05$  – различия статистически значимы по сравнению с группой «СД+физ.р-р».

Fig. 1. Level of daily proteinuria (mg/24h) (A) and serum creatinine concentration (B). Note: # –  $p < 0.05$  – differences are statistically significant compared to the “Intact” group; \* –  $p < 0.05$  – the differences are statistically significant compared to the “DM + saline” group.

почек фиксировали в 4% забуференном растворе нейтрального формалина в течение 24 ч с последующей заливкой в парафиновые блоки по общепринятым гистологическим методикам. На ротаторном микротоме «Microm HM 325» (Thermo scientific, США) изготавливали парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм, с последующей монтировкой на адгезивные стекла с поли-L-лизинном (Sigma-Aldrich, США). После депарафинизации проводили иммунофлуоресцентное окрашивание по общепринятому протоколу с температурной демаскировкой антигенов в «Dewax and HIER Buffer L» буфере (Thermo scientific, США) при температуре 98°C в течение 30 минут. Неспецифическое окрашивание блокировалось раствором нормальной сыворотки осла при комнатной температуре в течение 60 мин. Срезы инкубировали с кроличьими антикрысиными первичными поликлональными антителами анти-Клото (Cloud-Clone, США) и затем ослиными антикроличьими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluore 488 (Abcam, Великобритания) при 37°C в течение 12 ч. Ядра докрашивали DAPI (Thermo Scientific, США) при комнатной температуре в течение 15 минут. Препараты заключали в монтирующую не флуоресцирующую среду под покровные стекла. Полученные результаты анализировали с помощью люминесцентного микроскопа AxioImager.A2 «Carl Zeiss» (Германия), при увеличении  $\times 200$  с использованием программного обеспечения Ikaros «Meta Systems» (Германия). Интенсивность свечения оценивали на основании визуально-аналоговой шкалы: интенсивность свечения – нет свечения (0), сомнительное (-+), слабое (+), умеренное (++) , выраженное (+++). Характер свечения – крупно-, средне-, мелко-гранулярный.

Уровень экспрессии белка Клото оценивали путем подсчета площади иммунопозитивного материала в 30 случайных полях зрения. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения Prism 5 (Graph Pad Software Inc., США). Данные представлялись в виде среднего, медианы и интерквартильного интервала. Проверка выборки на нормальность проводилась с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки вариабельности показателей указывался интерквартильный размах [Q1; Q3]. Сравнение трех и более независимых выборок проводилось непараметрическим методом (критерий Краскела–Уоллиса с пост-тестом Данна). Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

При определении уровня суточной протеинурии в группе животных с СД без лечения «СД+физ. р-р» отмечалось значительное повышение уровня протеинурии (рис. 1А), что указывает на увеличенную клубочковую проницаемость белка и/или его недостаточную канальцевую реабсорбцию. При этом у животных с патологией отмечался статистически значимо больший уровень креатинина в сыворотке крови ( $p < 0,05$ ), что также указывает на нарушение выделительной и фильтрационной функций почек (рис. 1Б).

В опытных группах, получавших в течение 30 дней терапию производными ГАМК, отмечалось улучшение выделительной и фильтрационной функций почек, что проявлялось статистически значимым снижением уровня суточной протеинурии во всех опытных группах (рис. 1А) и статистически

Таблица 1 / Table 1

**Сравнительная характеристика медиан площадей иммунопозитивного материала (белка Клото), мкм<sup>2</sup>**  
**Comparative characteristics of median areas of immunopositive material (Klotho protein), μm<sup>2</sup>**

Экспериментальные группы	n	Медиана, мкм <sup>2</sup>
Интакт	10	14792 [5703; 32041]
СД+физ.р-р	10	982,2 [352,5; 2600]****
СД+Аминалон	10	1562 [225,5; 5784]****
СД+Мефаргин	10	2003 [971,7; 3099]****
СД+Сукцикард	10	4966 [3729; 8037]###

Примечание: \*\*\*\* –  $p < 0,0001$  – различия достоверны по сравнению с группой «Интакт», ### –  $p < 0,0003$  – различия достоверны по сравнению с группой «СД+физ.р-р». n – количество животных в группе. Уровень экспрессии белка Клото оценивали путем подсчета площади иммунопозитивного материала в 30 случайных полях зрения. Данные представлены в виде медианы с указанием интерквартильного размаха (Me [Q1; Q3]).

значимым снижением концентрации креатинина в сыворотке крови в группе, получавшей сукцикард (рис. 1Б).

При флуоресцентном исследовании микропрепаратов у животных в интактной группе преимущественно в корковом веществе в большинстве дистальных извитых канальцев определялись Клото-позитивные клетки эпителия. Интенсивность свечения была выраженной (+++) в большинстве эпителиоцитов, в отдельных клетках отмечалось умеренное (++) свечение. Преобладал крупно-гранулярный иммунопозитивный материал с небольшим количеством средне- и мелкогранулярных цитоплазматических включений. Иммунопозитивный материал присутствовал во всех клетках эпителия в виде элементов округлой формы разного размера. Гранулы распределялись по цитоплазме равномерно. В отдельных клетках визуализировалось слияние иммунопозитивного материала в конгломераты неправильной формы (рис. 2).

У крыс с моделью стрептозотоциновой интоксикации не во всех клетках сохранялось умеренное (++) цитоплазматическое свечение преимущественно в эпителии дистальных извитых канальцев. В отдельных клетках наблюдалось слабое (+) свечение. В некоторых клетках эпителия фрагментарно присутствовал в малом количестве иммунопозитивный материал в виде элементов округлой формы разного размера. Гранулы распределялись по цитоплазме неравномерно (рис. 2).

В группе животных на фоне введения аминалона иммунопозитивный материал распределялся неравномерно, наблюдалось, как умеренное (++) , так и слабое (+) цитоплазматическое свечение не во всех эпителиоцитах извитых канальцев в виде гранул округлой формы в основном среднего размера (рис. 2).

В группе животных на фоне введения мефаргина так же наблюдалось умеренное (++) цитоплазматическое свечение в отдельных эпителиоцитах извитых канальцев. Иммунопозитивный материал визуализировался диффузно, в умеренном количестве не во всех клетках, округлой формы, преимущественно в

виде гранул разного размера, которые распределялись по цитоплазме неравномерно (рис. 2).

В группе животных на фоне введения сукцикарда Клото-позитивный материал визуализировался не во всех клетках, в виде гранул разного размера округлой формы диффузно рассеянных по цитоплазме. Сохранялась умеренной интенсивность свечения (++) . В некоторых эпителиоцитах наблюдалась выраженная интенсивность свечения (+++) (рис. 2).

При проведении морфометрического исследования у животных интактной группы медиана площади иммунопозитивного материала составляла 14792 мкм<sup>2</sup> [5703; 32041]. В группах со стрептозотоциновой интоксикацией и в группах на фоне введения аминалона и мефаргина отмечалось статистически значимое ( $p \leq 0,0001$ ) уменьшение площади иммунопозитивного материала по сравнению с медианой площади иммунопозитивного материала в интактной группе. Медиана площади иммунопозитивного материала у животных со стрептозотоциновой интоксикацией составляла 982,2 мкм<sup>2</sup> [352,5; 2600], аминалона – 1562 мкм<sup>2</sup> [225,5; 5784], мефаргина – 2003 мкм<sup>2</sup> [971,7; 3099].

По сравнению с группой со стрептозотоциновой интоксикацией на фоне введения сукцикарда отмечалось статистически значимое ( $p \leq 0,0001$ ) увеличение площади иммунопозитивного материала, медиана составила 4966 мкм<sup>2</sup> [3729; 8037]. На фоне введения аминалона и мефаргина статистически значимого увеличения площади иммунопозитивного материала в эпителии дистальных извитых канальцах не происходило. В группе животных на фоне введения аминалона и мефаргина медиана площади позитивного материала составляла 1562 мкм<sup>2</sup> [225,5; 5784] и 2003 мкм<sup>2</sup> [971,7; 3099] соответственно (табл. 1).

С ростом распространенности СД увеличивается количество больных с нефропатией. Диабетическая нефропатия является одним из наиболее тяжелых микрососудистых

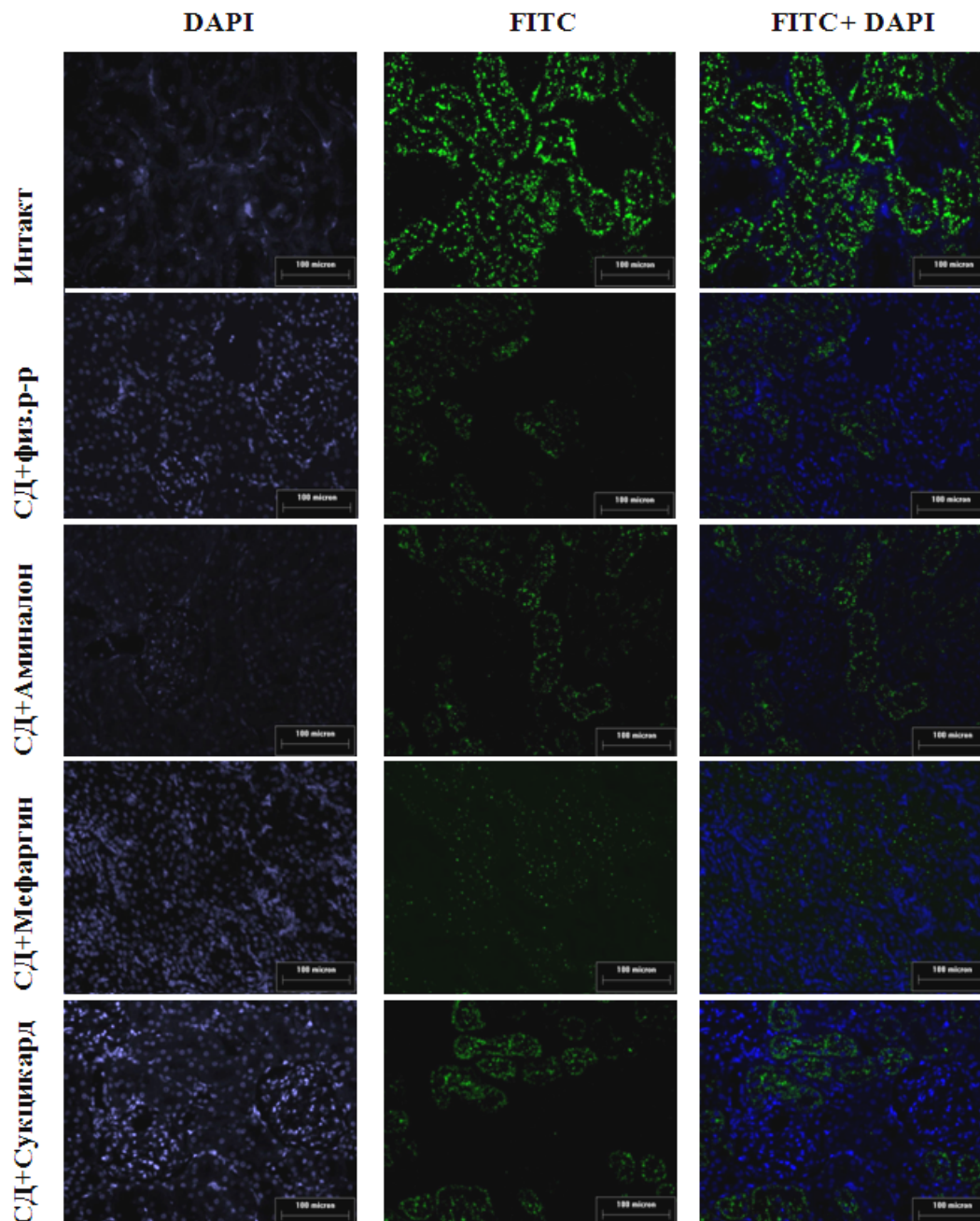


Рис. 2. Экспрессия протеина Клото в корковом веществе почек. Клото-позитивные клетки окрашены в зеленый цвет. А – антитела анти-Клото, FITC, В – DAPI, С – объединенный снимок. Об. 40; ок. 10.  
Fig. 2. Klotho protein expression in the renal cortex. Klotho-positive cells are stained in green. A – anti-Klotho antibodies, FITC, B – DAPI, C – merged image (magnification  $\times 400$ ).

осложнений сахарного диабета и ведущей причиной терминальной стадии почечной недостаточности [4].

В последние годы значительное внимание уделяется белку Клото. Белок Клото, обнаруженный японскими исследователями, случайно при повреждении гена, экспрессирующего его синтез и идентифицирован как молекула против старения [8]. Белок Клото действует как гормон с антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, и возможно, вследствие этого, он замедляет старение [12]. Белок Клото экспрессируется в основном в почках, сосудистом сплетении мозга, зубчатой извилине [5].

Установлено, что дефицит белка Клото тесно связан с патогенезом диабетической нефропатии [5].

Во время гипергликемии уровень мембраносвязанного белок Клото в почечной ткани снижается [28]. Гипергликемия (глюкозотоксичность и липотоксичность) активирует оксидативный и нитрозативный стресс, а также воспаление, выраженность которых уменьшает белок Клото. Белок Клото также уменьшает воспаление за счет подавления транскрипции ядерного фактора Nf-kB, активирующего экспрессию генов провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF и др.) [28].



Проведенное нами экспериментальное исследование свидетельствует о формировании выраженного нарушения функции почек и эндотелиальной дисфункции в условиях экспериментальной длительной 6-месячной гипергликемии у животных с СД 2, что проявлялось в выраженном нарушении процесса фильтрации белка микроальбуминурии и выделения креатинина. Отмеченные нарушения сопровождались достоверным снижением ( $p \leq 0,0001$ ) экспрессии белка Клото в эпителии почечных канальцев при длительной гипергликемии по отношению к интактной группе животных, что снижение уровня белка Клото в сыворотке крови сопряжено с ангиопатией и почечной недостаточностью. На фоне введения аминалона, мефаргина и в большей мере сукцикарда наблюдалось улучшение функционального состояния почек: снижение суточной протеинурии и уровня креатинина в сыворотке крови, сопровождающееся достоверным увеличением ( $p \leq 0,0003$ ) площади Клото-позитивного материала в эпителии извитых канальцев почки по отношению к группе животных с длительной гипергликемией без лечения.

В основе различных осложнений сахарного диабета, включая диабетическую нефропатию, лежат окислительный стресс и воспаление.

Можно предположить, что ренопротективное действие производных ГАМК, мефаргина и сукцикарда обусловлено увеличением экспрессии белка Клото в эпителии почечных канальцев и снижением его содержания в почечной ткани и, вследствие этого, усилением антиоксидантной и противовоспалительной защиты. Производные ГАМК и белок Клото могут выступать как синергисты при формировании этих эффектов. Установлено, что ГАМК повышает продукцию белка Клото при экспериментальном сахарном диабете. ГАМК и белок Клото активируют ядерный транскрипционный фактор Nrf-2 [7, 10], взаимодействующий с элементом антиоксидантного ответа в промоторе батареи генов, ответственных за активацию генов ферментов антиоксидантной защиты [7, 24]. В настоящее время активация системы Nrf-2 считается мощной цитопротекторной стратегией лечения различных патологий, в основе которых лежит окислительный стресс [7, 24].

Активация белка Клото значительно снижает окислительный стресс вследствие активации Nrf-2, которая является нижестоящим эффектором антиоксидантной защиты.

ГАМК и белок Клото подавляют активность Nf-kB, играющего ключевую роль в инициации иммунных и/или воспалительных реакций, опосредованных В- и Т-клетками, макрофагами и полиморфно-ядерными лейкоцитами. ГАМК и белок Клото приводят к подавлению генов, ответственных за экспрес-

сию провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, iNOS и за подавление системного воспаления, включая почки [12].

## Заключение

Таким образом, можно считать, что ренопротективное действие используемых веществ обусловлено повышением содержания белка Клото и, вследствие этого, подавлением окислительного стресса и воспаления, играющих ключевую роль в патогенезе диабетической нефропатии.

Представленные данные о ренопротективном действии аминалона, мефаргина и в большей степени сукцикарда, свидетельствуют о перспективности разработки на основе сукцикарда препарата для профилактики и лечения диабетической нефропатии.

## Список источников/References

1. Нестерова А.А., Глинка Е.Ю., Тюренков И.Н., Перфилова В.Н. Белок Клото – универсальный регулятор физиологических процессов в организме. Успехи физиологических наук. 2020;51(2):88–104. Nesterova A.A., Glinka E.Yu., Tyurenkov I.N., Perfilova V.N. Protein Klotho – Universal Regulator of Physiological Processes in the Organism. Progress in Physiological Science. 2020;51(2):88–104 (In Russ.). doi: 10.31857/S0301179820020083
2. Спасов А.А., Воронкова М.П., Снигур Г.Л. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. Ч.1. М.: Гриф и К, 2012; 670–84. Spasov A.A., Voronkova M.P., Snigur G.L. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu peroral'nykh lekarstvennykh sredstv dlya lecheniya sakharnogo diabeta. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv: pod red. A.N. Mironova. Ch.1. M.: Grif i K, 2012; 670–84 (In Russ.).
3. Тюренков И.Н., Файбисович Т.И., Дубровина М.А., Бакулин Д.А., Куркин Д.В. ГАМК-ергическая система в регуляции функционирования бета-клеток поджелудочной железы в условиях нормы и при сахарном диабете. Успехи физиологических наук. 2023;54(2):86–104. doi: 10.31857/S030117982302008x Tyurenkov I.N., Faibisovich T.I., Dubrovina M.A., Bakulin D.A., Kurkin D.V. Gabaergic System in The Regulation of the Functioning of Pancreas Beta-Cells in Normal Physiological Conditions And In Diabetes. Progress in Physiological Science. 2023;54(2):86–104. doi: 10.31857/S030117982302008x (In Russ.).
4. Anders HJ, Huber TB, Isermann B, Schiffer M. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. Nature Reviews Nephrology. 2018 Apr 13;14(6):361–77. doi: 10.1038/s41581-018-0001-y
5. Buendia P, Ramirez R, Aljama P, Carracedo J. Klotho Prevents Translocation of NFkB. Vitamins

- and hormones. 2016 Jan 1;(101):119–50. doi: 10.1016/bs.vh.2016.02.005
6. Buendia-Roldan I, Machuca N, Mejía M, Maldonado M, Pardo A, Selman M. Lower levels of  $\alpha$ -Klotho in serum are associated with decreased lung function in individuals with interstitial lung abnormalities. *Scientific Reports*. 2019 Jul 25;9(1):10801. doi: 10.1038/s41598-019-47199-0
7. Chen Z, Zhou Q, Liu C, Zeng Y, Yuan S. Klotho deficiency aggravates diabetes-induced podocyte injury due to DNA damage caused by mitochondrial dysfunction. *International Journal of Medical Sciences*. 2020;17(17):2763–72. doi: 10.7150/ijms.49690
8. Doi S, Zou Y, Osamu Togao, Pastor J, John G, Wang L, et al. Klotho Inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) Signaling and Suppresses Renal Fibrosis and Cancer Metastasis in Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Mar 11;286(10):8655–65. doi: 10.1074/jbc.M110.174037
9. Gheith O, Farouk N, Nampoory N, Halim MA, Al-Otaibi T. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephropharmacol*. 2015 Oct 9;5(1):49–56. PMID: 28197499; PMCID: PMC5297507.
10. Guo L, Tian J, Du H. Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Transmission Failure in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017 Apr 19;57(4):1071–86. doi: 10.3233/JAD-160702
11. Guo YL, Zhuang X, Huang Z, Zou J, Yang D, Hu X, et al. Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF- $\kappa$ B-mediated inflammation both in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018 Jan 1;1864(1):238–51. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.09.029
12. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Feb 13;104(7):2331–6. doi: 10.1073/pnas.0611079104
13. Hua S, Liu Q, Li J, Fan M, Yan K, Ye D. Beta-klotho in type 2 diabetes mellitus: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2021 Jun 13;22(4):1091–109. doi: 10.1007/s11154-021-09661-1
14. Jiang W, Xiao T, Han W, Xiong J, He T, Liu Y, et al. Klotho inhibits PKC $\alpha$ /p66SHC-mediated podocyte injury in diabetic nephropathy. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2019 Aug 1;494:110490. doi: 10.1016/j.mce.2019.110490
15. Khanijou V, Zafari N, Coughlan MT, MacIsaac RJ, Ekinci EI. Review of potential biomarkers of inflammation and kidney injury in diabetic kidney disease. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2022 Jul 11;38(6):3556. doi: 10.1002/dmrr.3556
16. Koch EAT, Nakhoul R, Nakhoul F, Nakhoul N. Autophagy in diabetic nephropathy: a review. *International Urology and Nephrology*. 2020 Jul 13;52(9):1705–12. doi: 10.1007/s11255-020-02545-4
17. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45–51. doi: 10.1038/36285
18. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2018 Nov 19;15(1):27–44. doi: 10.1038/s41581-018-0078-3
19. Memmos E, Sarafidis P, Pateinakis P, Tsiantoulas A, Faitatzidou D, Giamalis P, et al. Soluble Klotho is associated with mortality and cardiovascular events in hemodialysis. *BMC Nephrology*. 2019 Jun 11;20(1):217. doi: 10.1186/s12882-019-1391-1
20. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2—an update. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014 Jan;66:36–44. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008
21. Oh HJ, Nam BY, Wu M, Kim SH, Park J, Sukyung K, et al. Klotho plays a protective role against glomerular hypertrophy in a cell cycle-dependent manner in diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-renal Physiology*. 2018 Oct 1;315(4):F791–805. doi: 10.1152/ajprenal.00462.2017
22. Olejnik A, Franczak A, Krzywonos-Zawadzka A, Kałużna-Oleksy M, Bil-Lula I. The Biological Role of Klotho Protein in the Development of Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*. 2018;2018:5171945. doi: 10.1155/2018/5171945
23. Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, Vaziri ND. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney International*. 2013 Jun;83(6):1029–41. doi: 10.1038/ki.2012.439
24. Shen S, Ji C, Wei K. Cellular Senescence and Regulated Cell Death of Tubular Epithelial Cells in Diabetic Kidney Disease. *Frontiers in Endocrinology*. 2022 Jun 28;13:924299. doi: 10.3389/fendo.2022.924299
25. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, et al. Klotho Is a Novel  $\beta$ -Glucuronidase Capable of Hydrolyzing Steroid  $\beta$ -Glucuronides. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Mar 12;279(11):9777–84. doi: 10.1074/jbc.M312392000
26. Typiak M, Piwkowska A. Antiinflammatory Actions of Klotho: Implications for Therapy of Diabetic Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan 19;22(2):956–6. doi: 10.3390/ijms22020956
27. Tang A, Zhang Y, Wu L, Lin Y, Lizyeyu L, Zhao L, et al. Klotho's impact on diabetic nephropathy and its emerging connection to diabetic retinopathy. *Frontiers in Endocrinology*. 2023 Apr 18;14:1180169. doi: 10.3389/fendo.2023.1180169
28. Casanova A, Wevers A, Navarro-Ledesma S, Pruimboom L. Mitochondria: It is all about energy. *Frontiers in Physiology*. 2023 Apr 25;14:1114231. doi: 10.3389/fphys.2023.1114231

#### Информация об авторах

✉ Кавалерова Дарья Алевтиновна – старший преподаватель кафедры биологии Волгоградского государственного медицинского университета; пл. Павших борцов, 1, Волгоград, 400066, Россия; dareznikova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4525-3688>

#### Information about the authors

✉ Dar'ya A. Kavalerova – senior teacher of the Department of Biology of the Volgograd State Medical University; pl. Pavshikh bortsov, 1, Volgograd, 400066, Russia; dareznikova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4525-3688>



Снигур Григорий Леонидович – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой биологии Волгоградского государственного медицинского университета; sgrigoryl@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8612-6186>

Сурин Святослав Сергеевич – старший преподаватель кафедры биологии Волгоградского государственного медицинского университета; svyatoslavsurin@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7770-5995>

Тюренков Иван Николаевич – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой фармакологии и фармации Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования Волгоградского государственного медицинского университета; fibfuv@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-7574-3923>

Бакулин Дмитрий Александрович – канд. мед. наук, старший научн. сотр. лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств Волгоградского государственного медицинского университета; mbfdoc@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0003-4694-3066>

Сахарова Элина Юрьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры биологии Волгоградского государственного медицинского университета; saharova\_elina@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0143-9245>

Grigorii L. Snigur – Doct. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Biology of the Volgograd State Medical University; sgrigoryl@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8612-6186>

Svyatoslav S. Surin - senior teacher of the Department of Biology of the Volgograd State Medical University; svyatoslavsurin@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7770-5995>

Ivan N. Tyurenkov – Doct. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of RAS, Head of the Department of Pharmacology and Pharmacy of Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education of the Volgograd State Medical University; fibfuv@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-7574-3923>

Dmitrii A. Bakulin – Cand. Sci. (Med.), senior researcher of Laboratory of Pharmacology of Cardiovascular Drugs of the Volgograd State Medical University; mbfdoc@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0003-4694-3066>

Elina Yu. Sakharova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Biology of the Volgograd State Medical University; saharova\_elina@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0143-9245>

Статья поступила в редакцию 30.05.2023; одобрена после рецензирования 26.10.2023; принята к публикации 26.12.2023.  
Submitted 30.05.2023; Revised 26.10.2023; Accepted 26.12.2023.