

Роль производных малоновой кислоты в модуляции метаболических путей в почках при хронической сердечной недостаточности

А. Ю. Гришина¹✉, Д. Ю. Ивкин¹, А. А. Карпов^{1,2}, А. И. Большухина¹,
А. Р. Муслимов¹, А. С. Иванов¹, О. В. Буюклинская¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России). 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д. 2

✉ Контактное лицо: Гришина Анна Юрьевна. E-mail: grishina.anna@pharminnotech.com

ORCID: А. Ю. Гришина – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;
Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;
А. А. Карпов – <https://orcid.org/0000-0003-0114-5896>;
А. И. Большухина – <https://orcid.org/0009-0008-1150-3590>;
А. Р. Муслимов – <https://orcid.org/0000-0001-5736-2764>;
А. С. Иванов – <https://orcid.org/0009-0008-7766-9286>;
О. В. Буюклинская – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Статья поступила: 10.11.2025

Статья принята в печать: 21.11.2025

Статья опубликована: 21.11.2025

Резюме

Введение. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) часто приводит к прогрессирующей дисфункции почек, однако стратегии фармакологической защиты, направленные на коррекцию метаболических и окислительных нарушений в почечной ткани, остаются недостаточно разработанными. В связи с этим представляется актуальным изучение влияния новых соединений, таких как производные малоновой кислоты, в том числе 4-[(3-этокси-3-оксoproпаноил)амино]бензойная кислота (этмабен), на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты метаболических и антиоксидантных путей в почках при ХСН. Ранее для этмабена было выявлено более выраженное нефропротективное действие, нежели для другого малоната – малобена.

Цель. Оценить влияние 4-[(3-этокси-3-оксoproпаноил)амино]бензойной кислоты на экспрессию генов, регулирующих ферментативные пути в почках крыс с экспериментальной ХСН.

Материалы и методы. Исследование проведено на 30 аутобредных белых самцах крыс (300–350 г), содержавшихся в стандартных условиях (12-часовой световой режим, температура 22 ± 2 °C, влажность 50–60 %, доступ к корму и воде *ad libitum*). Животные были разделены на три группы. Группа 1 (Контроль–) состояла из здоровых животных ($n = 10$), которые получали очищенную воду (1 мл/кг/сутки, внутривентрикулярно). Группа 2 (ХСН–) включала животных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН, $n = 10$), получавших с 30-го дня после операции очищенную воду (1 мл/кг/сутки, внутривентрикулярно). Группа 3 (ХСН+) состояла из животных с ХСН ($n = 10$), которым с 30-го дня после операции внутривентрикулярно вводили этмабен в дозе 60 мг/кг/сутки. Модель ХСН воспроизводили лигированием левой коронарной артерии. Успешность модели подтверждали эхокардиографически (фракция выброса <40 %) на 30-й день после моделирования. Прооперированных животных рандомизировали методом случайного выбора. Этмабен или воду вводили ежедневно в течение 30 дней, начиная с 30-го дня после операции. На 61-й день животных эвтаназировали, ткани почек гомогенизировали в реактиве «Лири» (ООО «Биолабмикс», Россия). РНК экстрагировали с использованием хлороформа, изoproпанола и NaOAc, очищали с помощью LiCl. Концентрацию РНК определяли на Nanophotometer N60, качество – гель-электрофорезом. Обратную транскрипцию проводили из 1 мкг РНК (MMLV-RT-Kit, Eurogen). ПЦР в реальном времени выполняли на QuantStudio 5 с SYBR Green (Eurogen), анализируя гены *Gpx1*, *Nrf2*, *Nox1*, *Glut1*, *Hes1*, *mTOR*, *Txrdn1*, *HIF1a*, *Cpt1b*, *B2M* (референс). Статистическую обработку проводили в R-Studio (версия 4.3.3) с использованием пакета RQdeltaCT. Применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA,

тест Краскера – Уоллиса, апостериорные тесты Тьюки и Данна, а также анализ отношения шансов и логистическую регрессию. Для анализа экспрессии генов использовали метод 2^{-ddCt} с нормализацией относительно референсного гена B2M.

Результаты и обсуждение. Выявлено, что ХСН приводит к значительной активации транскрипционного фактора Nrf2, однако уровень экспрессии его целевого гена GPx1 оставался неизменным как при ХСН, так и при лечении этмабеном, что указывает на нарушение функционирования данного сигнального пути. Применение 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойной кислоты вызывало статистически значимое увеличение экспрессии гена Cpt1b ($p < 0,05$), что свидетельствует о смещении клеточного метаболизма в сторону β -окисления жирных кислот. Кроме того, зафиксированы достоверное подавление экспрессии прооксидантного фермента Nox1 и активация гена тиоредоксинредуктазы-1 (Txnrd1) ($p < 0,05$) в группах, получавших терапию. Сигнальный путь Notch активировался под воздействием этмабена, что проявлялось в повышении экспрессии гена Hes1 ($p < 0,05$), тогда как значимого влияния на экспрессию гена mTOR обнаружено не было.

Заключение. Этмабен функционирует как метаболический модулятор и редокс-регулятор. Его действие не связано с прямой антиоксидантной активностью, а обусловлено активацией адаптивных механизмов: уменьшением потребности в антиоксидантной защите за счет подавления источников реактивных кислородных форм (Nox1), активацией ключевого регулятора антиоксидантного ответа (Nrf2), а также изменением энергетического метаболизма через индукцию Cpt1b и Glud1.

Ключевые слова: экспрессия генов, кардиоренальный синдром, Nrf2, Glud1, Gpx, сукцинатдегидрогеназа, HIF1 α

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. Ю. Гришина – проведение эксперимента, визуализация данных, подготовка рукописи. Д. Ю. Ивкин – концептуализация исследования, проведение эксперимента, моделирование ХСН, редактирование и доработка рукописи. А. А. Карпов – проведение эксперимента, моделирование ХСН. А. Р. Муслимов – концептуализация исследования (идея эксперимента), интерпретация данных. А. С. Иванов – проведение ПЦР-анализа, подбор праймеров, анализ и статистическая обработка данных. О. В. Буюклинская – редактирование рукописи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием ресурсов ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Гришина А. Ю., Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Большухина А. И., Муслимов А. Р., Иванов А. С., Буюклинская О. В. Роль производных малоновой кислоты в модуляции метаболических путей в почках при хронической сердечной недостаточности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2227>

The role of malonic acid derivate in the modulation of metabolic pathways in the kidneys during chronic heart failure

Anna Yu. Grishina¹✉, Dmitry Yu. Ivkin¹, Andrey A. Karpov^{1,2}, Arina I. Bolshukhina¹, Albert R. Muslimov¹, Artem S. Ivanov¹, Olga V. Buyuklinskaya¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² Almazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2, Akkuratova str., Saint-Petersburg, 197341, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna Yu. Grishina. **E-mail:** grishina.anna@pharminnotech.com

ORCID: Anna Yu. Grishina – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;

Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

Andrey A. Karpov – <https://orcid.org/0000-0003-0114-5896>;

Arina I. Bolshukhina – <https://orcid.org/0009-0008-1150-3590>;

Albert R. Muslimov – <https://orcid.org/0000-0001-5736-2764>;

Artem S. Ivanov – <https://orcid.org/0009-0008-7766-9286>;

Olga V. Buyuklinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Received: 10.11.2025

Accepted: 21.11.2025

Published: 21.11.2025

Abstract

Introduction. Chronic heart failure (CHF) often leads to progressive renal dysfunction; however, pharmacological protection strategies aimed at correcting metabolic and oxidative disturbances in renal tissue remain underdeveloped. In this regard, it seems relevant to study the effect of new compounds, such as malonic acid derivatives, including 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl) amino]benzoic acid (etmaben), on the expression of genes encoding key enzymes of metabolic and antioxidant pathways in the kidneys in CHF. Previously, a more pronounced nephroprotective effect was detected for etmaben than for another malonate, maloben.

Aim. To evaluate the effect of 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid on the expression of genes regulating enzymatic pathways in the kidneys of rats with experimental CHF.

Материалы и методы. The study was conducted on 30 outbred white male rats (300–350 g) housed under standard conditions (12-hour light/dark cycle, temperature 22 ± 2 °C, humidity 50–60 %, with ad libitum access to food and water). The animals were divided into three groups. Group 1 (Control–) consisted of healthy animals ($n = 10$) that received purified water (1 mL/kg/day, intragastrically). Group 2 (CHF–) included animals with chronic heart failure (CHF, $n = 10$) that were administered purified water (1 mL/kg/day, intragastrically) starting from day 30 after the surgery. Group 3 (CHF+) was composed of animals with CHF ($n = 10$) that received etmaben (60 mg/kg/day, intragastrically) starting from day 30 after the surgery. CHF was modeled by ligation of the left coronary artery. Successful model induction was confirmed echocardiographically (ejection fraction <40 %). Operated animals were randomized using a random selection method. Etmben or water was administered daily for 30 days, starting from day 30 after surgery. On day 61, the animals were euthanized, and kidney tissues were homogenized in Lira reagent (LLC "Biolabmix", Russia). RNA was extracted using chloroform, isopropanol, and NaOAc, and purified with LiCl. RNA concentration was measured on a Nanophotometer N60, and quality was assessed by gel electrophoresis. Reverse transcription was performed from 1 µg of RNA (MMLV-RT-Kit, Eurogen). Real-time PCR was run on a QuantStudio 5 with SYBR Green (Eurogen), analyzing the genes Gpx1, Nrf2, Nox1, Glud1, Hes1, mTOR, Txnrd1, Hif1a, Cpt1b, and B2M (reference). Statistical analysis was performed in R-Studio (version 4.3.3) using the RQdeltaCT package. One-way ANOVA, the Kruskal–Wallis test, post-hoc Tukey and Dunn tests, as well as odds ratio analysis and logistic regression were applied. Gene expression analysis was performed using the 2^{-ddCt} method with normalization to the reference gene B2M.

Results and discussion. It was found that CHF led to significant activation of the transcription factor Nrf2; however, the expression level of its target gene, GPx1, remained unchanged both in CHF and after etmben treatment, indicating impaired functioning of this signaling pathway. Administration of 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid caused a statistically significant increase in the expression of the Cpt1b gene ($p < 0.05$), suggesting a shift in cellular metabolism towards fatty acid β -oxidation. Furthermore, significant suppression of the pro-oxidant enzyme Nox1 and activation of the thioredoxin reductase 1 (Txnrd1) gene ($p < 0.05$) were recorded in the treatment groups. The Notch signaling pathway was activated by etmben, as evidenced by increased expression of the Hes1 gene ($p < 0.05$), while no significant effect on the expression of the mTOR gene was detected.

Conclusion. Etmben functions as a metabolic modulator and redox regulator. Its action is not associated with direct antioxidant activity but is due to the activation of adaptive mechanisms: reducing the demand for antioxidant defense by suppressing sources of reactive oxygen species (Nox1), activating a key regulator of the antioxidant response (Nrf2), and altering energy metabolism through the induction of Cpt1b and Glud1.

Keywords: gene expression, cardiorenal syndrome, Nrf2, Glud1, Gpx, succinate dehydrogenase, HIF1 α

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anna Yu. Grishina – conducting the experiment, data visualization, manuscript preparation. Dmitry Yu. Ivkin – conceptualization, conducting the experiment, CHF modeling, manuscript editing and revision. Andrey A. Karpov –conducting the experiment, CHF modeling. Albert R. Muslimov – conceptualization (idea of the experiment), data interpretation. Arina I. Bolshukhina, Artem S. Ivanov – performing PCR analysis, primer selection, data analysis and statistical processing. Olga V. Buyuklinskaya – manuscript editing.

Funding. The results of the work were obtained using the resources of the Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education St. Petersburg Chemical Federal University of the Ministry of Health of the Russian Federation under Agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021, with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

For citation: Grishina A. Yu., Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Bolshukhina A. I., Muslimov A. R., Ivanov A. S., Buyuklinskaya O. V. The role of malonic acid derivate in the modulation of metabolic pathways in the kidneys during chronic heart failure. *Drug development & registration*. 2025;14(4). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2227>

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является системным патологическим состоянием, часто осложняющимся развитием почечной дисфункции в рамках кардиоренального синдрома. В основе этого осложнения лежат комплексные нарушения гемо-

динамики, нейрогормональной регуляции и метаболизма почечной ткани [1].

На ранних стадиях ХСН имеет место увеличение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) за счет компенсаторных механизмов организма, направленных на поддержание объема циркулирующей крови (ОЦК) и артериального давления в условиях снижен-

ного сердечного выброса. В частности, активируются ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и симпатическая нервная система (СНС), способствующие вазоконстрикции, задержке натрия и воды, а также увеличению ОЦК. Однако по мере прогрессирования сердечной недостаточности данные механизмы теряют эффективность, что ведет к снижению СКФ [2].

Расстройства гемодинамики являются ключевыми в патогенезе развития почечной дисфункции при ХСН. Наблюдается уменьшение сердечного выброса, приводящее к снижению почечного перфузионного давления и СКФ, в то время как повышение венозного давления способствует развитию почечного застоя и гиперемии сосудистого русла [3].

Гиперактивация РААС и СНС вызывает вазоконстрикцию афферентных и эфферентных артериол почечных клубочков, что усугубляет гипоперфузию паренхимы и способствует задержке натрия и воды в организме. Эти механизмы создают патологический цикл, усиливающий как прогрессирование сердечной недостаточности, так и развитие почечной дисфункции [2]. Важную роль в этом процессе играет метаболический стресс, связанный с нарушением энергетического баланса в клетках почек, которые обладают высоким уровнем метаболизма и зависят от аэробного производства АТФ [4]. Нарушение доставки кислорода и субстратов приводит к митохондриальной дисфункции, оксидативному стрессу и метаболическому ремоделированию, что в конечном итоге способствует прогрессированию болезни [5, 6].

Перспективным направлением фармакотерапии является поиск соединений, способных модулировать метаболические пути и снижать оксидативный стресс в почечной ткани. 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота (этмабен), производное малоновой кислоты, является ингибитором сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – ключевого фермента II комплекса дыхательной цепи митохондрий и цикла Кребса [7]. Известно, что производные малоновой кислоты обладают широким спектром биологической активности, включающим кардиопротективный эффект [8, 9].

В связи с этим возникает вопрос о возможности экстраполяции полученных результатов на другие производные малоновой кислоты, имеющие схожую химическую структуру и потенциально аналогичные механизмы действия. Одним из таких соединений является малобен, также производное малоновой кислоты, обладающее высокой растворимостью в воде, что, возможно, может обеспечить улучшенные фармакокинетические характеристики. Исходя из этого, можно предположить, что общая химическая структура консервативна и определяет типовые молекулярные мишени, включая СДГ, что ведет к схожей модификации экспрессии генов, участвующих в метаболическом перепрограммировании и антиоксидантной защите.

Целью настоящего исследования стала оценка влияния этмабена на экспрессию генов, кодирующих ферменты, связанные с метаболическими и антиоксидантными процессами в почках крыс с моделью ХСН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 30 крысах самцах (300–350 г). Животные содержались в стандартных условиях (12-часовой световой режим, температура 22 ± 2 °C, влажность 50–60 %, доступ к корму и воде *ad libitum*). Исследования были проведены в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными и одобрены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (протокол заседания № Rat-03 от 10.10.2024).

ХСН моделировали путем торакотомии и лигирования левой коронарной артерии под ингаляционным изофлурановым наркозом [1]. Через 30 дней после операции для верификации ХСН проводили эхокардиографическое исследование (MyLabTouchSL 3116, Esaot; Италия) для верификации систолической дисфункции левого желудочка (ЛЖ). В качестве ключевого параметра оценки использовали фракцию выброса ЛЖ, рассчитанную по методу Teicholz. В последующий анализ включали животных со снижением фракции выброса ЛЖ до значений менее 40 %. Успешно прооперированные животные были рандомизированы на 2 группы по 10 животных (группы 2 и 3 соответственно).

Дизайн экспериментальных групп

Животные были рандомизированы на 3 группы.

1. Группа 1 (здоровые + вода, $n = 10$): животные, получавшие очищенную воду внутривентрикулярно в объеме 1 мл/кг/сутки.
2. Группа 2 (ХСН + вода, $n = 10$): животные с ХСН, получавшие очищенную воду внутривентрикулярно в объеме 1 мл/кг/сутки.
3. Группа 3 (ХСН + этмабен, $n = 10$): животные с ХСН, получавшие этмабен в дозе 60 мг/кг/сутки.

Выбор доз обоснован ранее проведенными исследованиями, продемонстрировавшими эффективность данной дозы при ХСН [10]. Препарат или вода вводились ежедневно в течение 30 дней, начиная с 30-го дня после операции. На 61-й день животных выводили из эксперимента. Почки извлекали, фрагменты коркового вещества немедленно замораживали и хранили при -80 °C для последующего молекулярно-биологического анализа.

Молекулярно-биологический анализ

Тотальную РНК выделяли из гомогенизированной почечной ткани с использованием реактива «Лира» («Биолабмикс», Россия). Для экстракции РНК гомогенизаты были смешаны с хлороформом в соотношении 1:5, после чего проводилось центрифугирование при 10 000 RCF при температуре 4 °C в течение

10 мин. Полученный водный супернатант был отобран и смешан с изопропанолом в соотношении 1:1, а также с ацетатом натрия до достижения конечной концентрации соли 0,3 М. Полученная смесь вновь центрифугировалась при 10 000 RCF при комнатной температуре в течение 10 мин. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок промывали 80%-м раствором этанола. Затем осадок снова центрифугировали 10 мин, супернатант удаляли, а осадок РНК растворяли в 50 мкл стерильной дистиллированной воды.

Для удаления возможных примесей геномной ДНК из каждого образца была выполнена обработка аликвоты раствора РНК инкубацией с термолабильной ДНКазой (ООО «Биолабмикс», Россия) при температуре 37 °С в течение 1 ч. После завершения инкубационной стадии был выполнен этап окончательной очистки РНК посредством осаждения с использованием 7,5 М раствора лития хлорида. Очищенную РНК ресуспендировали в стерильной воде до концентрации 100 нг/мкл. Концентрация нуклеиновых кислот определялась с помощью нанофотометрического анализа на приборе Implen NanoPhotometer N60. Контроль качества и целостности РНК осуществлялся методом денатурирующего гель-электрофореза в агарозе (55 В, 2 ч) с добавлением формальдегида до конечной концентрации 0,4 М.

Для проведения обратной транскрипции из каждой пробы отбирали аликвоту раствора РНК с суммарной массой 1 мкг. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора MMLV-RT-Kit (Eurogen) согласно протоколу производителя. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (qPCR) проводилась на термоциклере

QuantStudio 5 (Applied Biosystems) с применением набора 5x qPCR-HS SYBR (Eurogen). Каждая исследуемая проба анализировалась в двух технических репликах.

Анализировали экспрессию следующих генов: глутатионпероксидазы-1 (Gpx1), ядерного фактора эритроида 2 – родственного фактора 2 (Nrf2), НАДФН-оксидазы-1 (Nox1), глутаматдегидрогеназы (Glud1), карнитинпальмитоилтрансферазы-1В (Cpt1b), мишени рапамицина млекопитающих (mTOR), гена-преобразователя Hes1, тиоредоксинредуктазы-1 (Txrnd1), фактора, индуцируемого гипоксией, 1-альфа (HIF1a). Предварительным референсным геном был выбран B2M (β-2-микроглобулин). Для окончательного установления референсного гена на тотальную панель генов был проведен анализ стабильности экспрессии с применением алгоритмов GeNorm и NormFinder.

Дизайн исследования приведен на рисунке 1.

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили в среде R (v.4.3.3) с использованием пакетов rstatix, ggplot2 и RQdeltaCT. Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для межгруппового сравнения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Тьюки для параметрических данных и критерий Краскела – Уоллиса с тестом Данна для непараметрических данных. Для анализа корреляционных взаимосвязей применяли метод Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Me [Q25; Q75]).

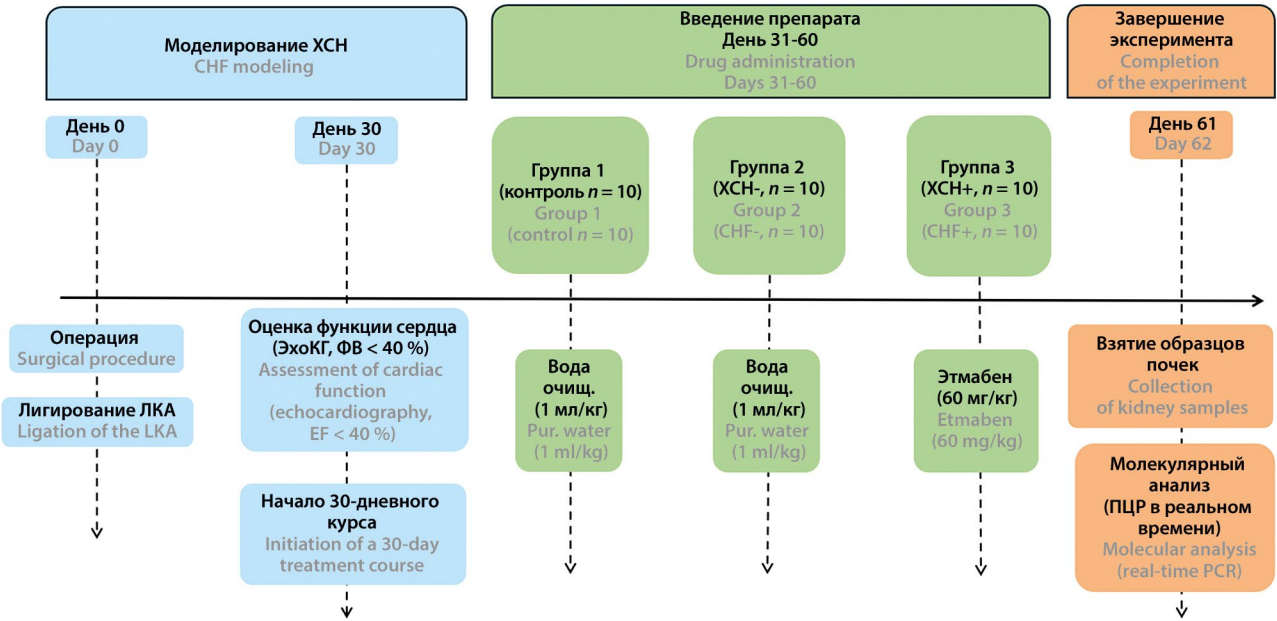


Рисунок 1. Дизайн исследования

Figure 1. Study design

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам эхокардиографического исследования фракция укорочения у животных, получавших этмабен в течение 1 месяца, значительно увеличивалась относительно группы контроля.

Перед анализом экспрессии генов-мишеней был проведен поиск референсного гена с применением алгоритмов GeNorm и NormFinder на тотальную панель генов, по результатам анализа референсным геном был выбран Nox4: B2M исключен из анализа.

Для интерпретации полученных данных и определения статистически значимых различий между группами был выполнен анализ с использованием метода 2^{-ddCt} , который включает нормализацию экспрессии исследуемого гена относительно референсного гена. В данном методе рассчитывается значение $ddCt$ по формуле: $ddCt = \Delta Ct$ (исследуемой группы) – ΔCt (контроля), где $\Delta Ct = Ct$ (ген интереса) – Ct (реф).

Для удобства визуализации результатов диапазон значений, полученных при расчете $ddCt$, был преобразован в обратный ($-ddCt$) для отражения высокой и низкой экспрессии относительно вектора ординаты графика.

Курсовое введение этмабена в дозе 60 мг/кг/сутки в течение 30 дней оказало выраженное и разнонаправленное влияние на экспрессию генов в ткани почек, которое принципиально различалось между здоровыми животными и животными с моделью ХСН.

Влияние на экспрессию генов

Глутатионпероксидаза-1 (GPx1). Глутатионпероксидаза-1 (GPx1) повсеместно экспрессируется во всех тканях и обнаруживается в цитозоле и митохондриях. GPx1 является одним из многих клеточных антиоксидантных ферментов наряду с другими GPx, пероксиредоксинами и каталазами, которые восстанавливают перекись водорода. На клеточном уровне, благодаря окислению клеточного глутатиона (GSH) и восстановлению клеточной перекиси водорода, GPx1 влияет на тиоловое окислительно-восстановительное состояние и поддерживает баланс между необходимыми и вредными уровнями клеточных оксидантов [10]. Избыток GPx1 может изменять клеточную функцию, ограничивая основные уровни перекиси водорода для создания восстановительного стресса, состояния с измененным окислительно-восстановительным балансом.

В рамках проведенного исследования было установлено, что моделирование хронической сердечной недостаточности (ХСН) не вызывало статистически значимых изменений в уровне экспрессии гена Gpx1 в почечной ткани (группа 2) по сравнению с группой интактных животных. Важно отметить, что последующее введение этмабена также не оказало какого-либо модулирующего воздействия на экспрессию дан-

ного гена у крыс 3-й группы. Эти данные убедительно свидетельствуют об отсутствии влияния изучаемого соединения на данный конкретный компонент антиоксидантной системы в условиях экспериментальной патологии.

Ядерный фактор эритроида 2 – родственного фактора 2 (Nfe2l2, или Nrf2). Центральным регулятором клеточного антиоксидантного ответа выступает ядерный фактор эритроида 2 – родственного фактора 2. В условиях окислительного стресса активация Nrf2 инициирует изменение метаболизма и экспрессии генов, направленное на восстановление окислительно-восстановительного гомеостаза. Данный транскрипционный фактор координирует активацию широкого спектра генов, кодирующих белки антиоксидантной защиты, играя роль главного координатора адаптационного ответа [11]. В отличие от стабильной экспрессии Gpx1 уровень экспрессии Nrf2 продемонстрировал достоверное увеличение в группе животных с ХСН относительно контрольной группы. Ключевым результатом является отсутствие статистически значимой разницы в экспрессии Nrf2 между группами 2 и 3. Это наблюдение позволяет заключить, что применение препарата не потенцирует экспрессию данного транскрипционного фактора сверх уровня, индуцированного патологическим процессом.

Полученные результаты дают основания предполагать, что к моменту начала терапевтического вмешательства (30-е сутки после моделирования ХСН) в почечной ткани уже сформировалось нарушение сигнального пути Nrf2-GPx1. Повышение уровня Nrf2 на фоне ХСН представляет собой компенсаторную реакцию в ответ на развивающийся окислительный стресс (рисунок 2) [11]. Однако, несмотря на активацию этого главного регулятора, транскрипция его гена-мишени Gpx1 не усиливалась. Объяснением этого феномена может служить двойственное действие самого этмабена, связанное с его способностью ингибировать сукцинатдегидрогеназу (СДГ) и вызывать накопление сукцината. Важно отметить, что сукцинат способен выступать в роли конкурентного ингибитора α -кетоглутарат-зависимых диоксигеназ, что потенциально ведет к подавлению транскрипции генов-мишеней Nrf2, включая Gpx1 [12, 13]. Таким образом, этмабен, с одной стороны, создает мощный стимул для активации Nrf2 через генерацию АФК, но с другой – может опосредовать блокаду транскрипции его генов-мишеней.

Влияние на экспрессию генов метаболизма

Анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые метаболические ферменты, выявил выраженное влияние этмабена на энергетический обмен.

Ген глутаматдегидрогеназы-1 (Glud1). При моделировании ХСН наблюдалась тенденция к повы-

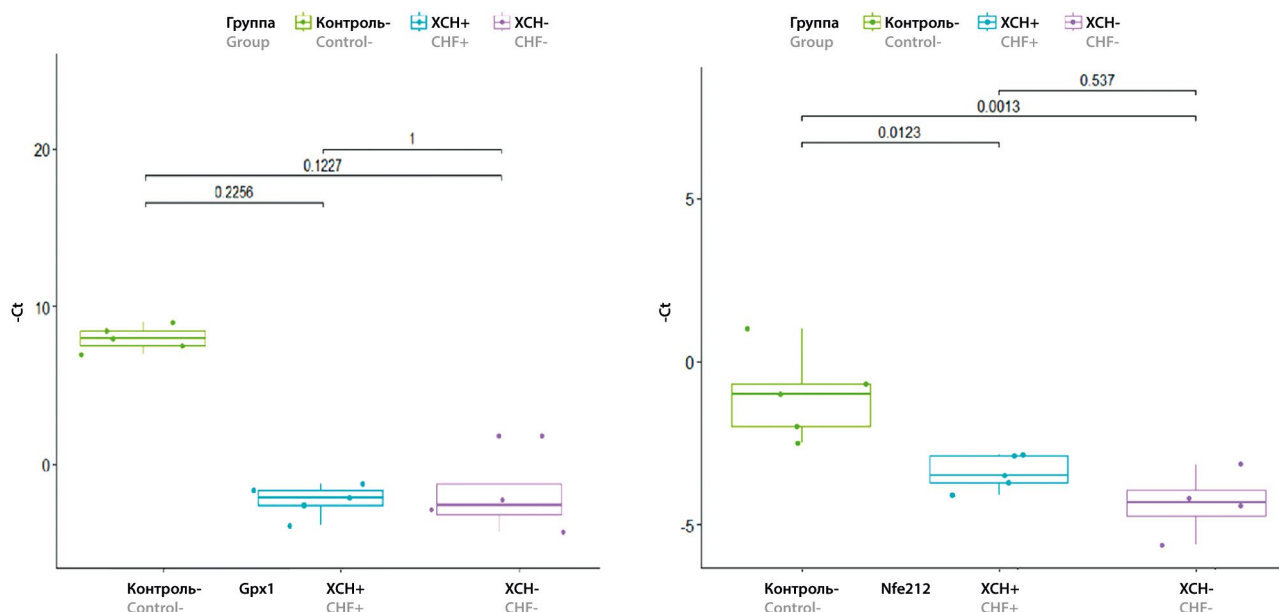


Рисунок 2. Гены, ассоциированные с окислительным стрессом (Gpx1, Nfe2l2)

Figure 2. Genes associated with oxidative stress (Gpx1, Nfe2l2)

шению экспрессии гена Glud1. Отмечено отсутствие различий между группой нелеченых животных с ХСН и группой, получавшей терапию, что свидетельствует о том, что этмабен не оказывает дополнительного воздействия на экспрессию Glud1 к уже существующей адаптации к ХСН. Повышение экспрессии Glud1 рассматривается как реакция клеточного метаболизма, направленная на пополнение пула метаболитов цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса), в частности α -кетоглутарата, в условиях блокады комплекса II [10].

Ген карнитинпальмитоилтрансфераза-1B (Cpt1b).

Экспрессия гена Cpt1b, катализирующего начальный этап β -окисления жирных кислот, продемонстрировала значительные изменения. Введение этмабена животным с ХСН способствовало статистически значимому ($p < 0,01$) повышению экспрессии Cpt1b по сравнению с контрольной группой (группа 1). При этом разница между здоровыми и больными животными отсутствовала.

Блокада цикла Кребса создает энергетический кризис, на который клетка отвечает переключением на более эффективный путь получения АТФ – β -окисление жирных кислот (рисунок 3). Это переключение является компенсаторным механизмом при митохондриальной дисфункции [14] и свидетельствует о том, что этмабен приводит к перестройке метаболизма клетки в условиях метаболического стресса.

Применение этмабена привело к дальнейшему метаболическому репрограммированию, которое, однако, не смогло превысить уже существующий уровень адаптации.

Влияние на экспрессию генов регуляции клеточных процессов

Терапия этмабеном оказала избирательное влияние на сигнальные пути, регулирующие клеточный гомеостаз.

Ген Hairy and Enhancer of Split 1 (Hes1). Один из главных эффекторных генов сигнального пути Notch. Данный путь играет большую роль в поддержании клеток-предшественников и подавлении их дифференцировки, регуляции процессов пролиферации, апоптоза и регенерации в ответ на повреждение. ХСН как хронический стрессовый фактор может умеренно активировать сигнальные пути выживания и репарации, к которым относится и Notch [15]. Самый низкий уровень экспрессии наблюдался в группе контроля (группа 1). Достоверное повышение экспрессии Hes1 было зафиксировано в группе животных с ХСН, получавших терапию (группа 3; $p = 0,03$ по сравнению с группой 1).

Мишень рапамицина млекопитающих (ген mTOR).

Ген mTOR является центральным регулятором клеточного роста, синтеза белка, аутофагии и метаболизма. Анализ экспрессии гена mTOR не выявил статистически значимых изменений ни в одной из экспериментальных групп. Отмечена тенденция к активации mTOR на фоне применения этмабена при ХСН, однако для подтверждения этого эффекта требуются дальнейшие исследования на большей выборке. Можно предположить, что этмабен запускает метаболическое ремоделирование (активация Cpt1b, Glud1) и меняет профиль пролиферации (активация Hes1) в обход канонического mTOR-сигнального пути (рисунок 4) [16].

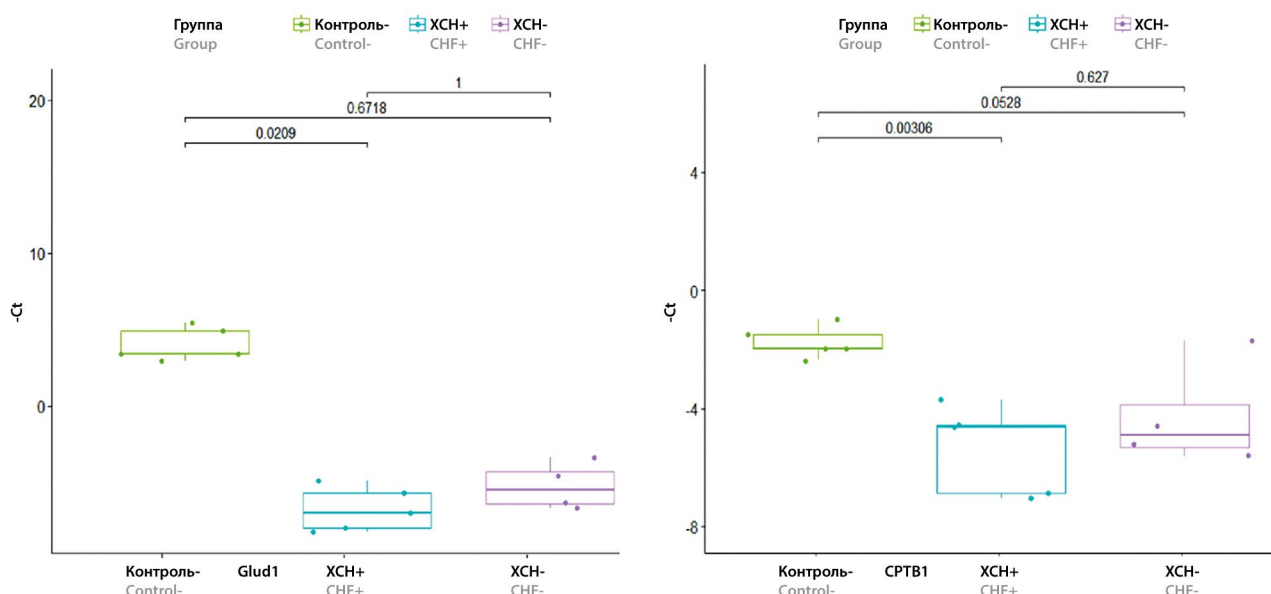


Рисунок 3. Гены, ассоциированные с энергетическими процессами (Glud1, CPTB1)

Figure 3. Genes associated with energy processes (Glud1, CPTB1)

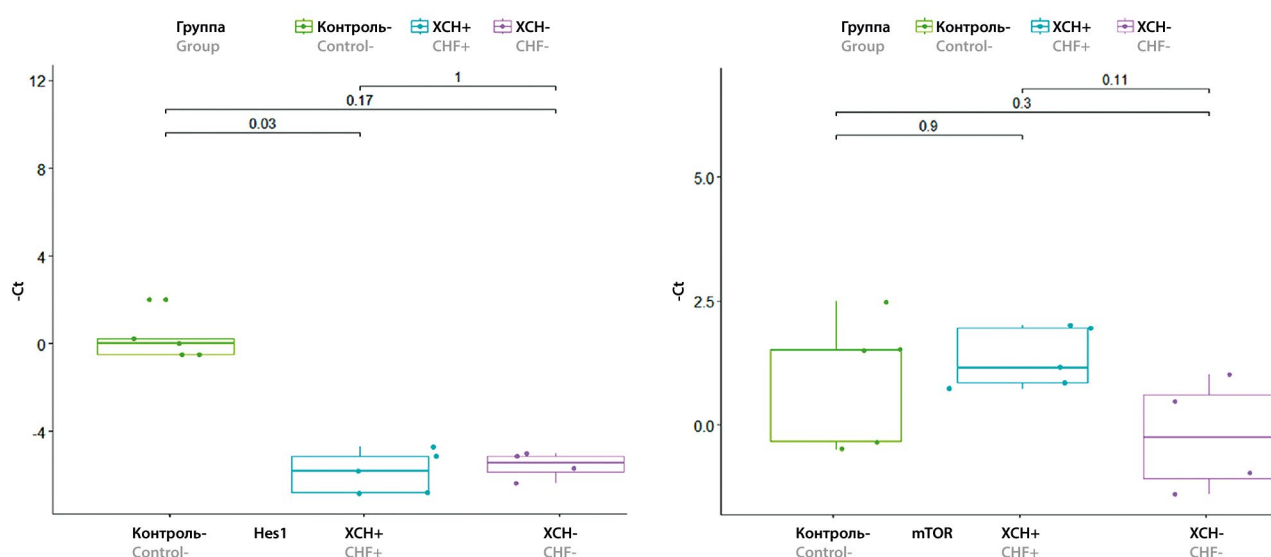


Рисунок 4. Гены, ассоциированные с метаболизмом и пролиферацией (Hes1, mTOR)

Figure 4. Genes associated with metabolism and proliferation (Hes1, mTOR)

Влияние на другие гены

Фактор, индуцируемый гипоксией, 1-альфа (ген HIF1a). HIF1a активирует гены, связанные с ангиогенезом, гликолизом и выживанием в условиях гипоксии. Анализ экспрессии гена HIF1a не выявил статистически значимых изменений ни в одной из экспериментальных групп. Не было достигнуто статистической значимости при сравнении группы контроля (1) и группы животных с ХСН без лечения (2), что

указывает на отсутствие достоверного влияния самого заболевания на экспрессию данного гена.

К 60-му дню модель ХСН, по-видимому, не сопровождается выраженной тканевой гипоксией в почках, достаточной для активации HIF1a. Альтернативным объяснением может служить полная адаптация организма к хронической гипоксии с формированием нового устойчивого гомеостатического состояния [17]. Совокупность результатов (активация Nrf2 при стабильном HIF1a) позволяет утверждать, что

при ХСН в почках развивается состояние, при котором нарушена утилизация кислорода и энергетических субстратов на фоне его адекватного поступления. Полученные данные позволяют предположить, что фармакологическое действие этмабена может быть направлено именно на коррекцию указанного метаболического дефекта, а не на улучшение оксигенации тканей.

Ген НАДФН-оксидаза-1 (Nox1). NADPH-оксидаза-1, являющаяся одним из ключевых ферментов, генерирующих АФК в качестве сигнальных молекул, при хронической гиперэкспрессии превращается в значительный источник оксидативного стресса [18]. Проведенный анализ экспрессии гена Nox1 выявил статистически значимое снижение его уровня в группе животных с ХСН (группа 2) по сравнению с интактным контролем (группа 1; $p = 0,028$). Наиболее высокая экспрессия гена отмечалась в контрольной группе.

Полученные данные могут свидетельствовать о развитии компенсаторных адаптационных механизмов в условиях длительно существующей патологии. К 60-му дню эксперимента первоначальная активация NOX-системы, характерная для ранних стадий ХСН, сменилась ее супрессией, что может быть обусловлено снижением метаболической и сигнальной активности клеток в условиях хронического патологического процесса.

Ген тиоредоксинредуктаза-1 (Txnrd1). Тиоредоксинредуктаза-1 (TXNRD1) – ключевой фермент тиоредоксиновой системы, которая наряду с глутатионовой системой составляет основу клеточной антиоксидантной защиты [19]. Фермент катализирует восстановление окисленной формы тиоредоксина, который участвует в нейтрализации АФК и восстановлении окисленных белков. Проведенное исследование

выявило статистически значимое повышение уровня экспрессии гена TXNRD1 в группе животных с ХСН (группа 2) по сравнению с интактным контролем (группа 1; $p = 0,042$). Терапия этмабеном способствовала повышению уровня экспрессии TXNRD1 по сравнению с контрольной группой. Наименьшие показатели экспрессии отмечались в контрольной группе. Полученные данные свидетельствуют о развитии компенсаторных механизмов антиоксидантной защиты в условиях хронического окислительного стресса. На фоне дисфункции глутатионовой системы (о чем свидетельствует отсутствие активации GPx1 при повышенном уровне Nrf2) происходит активация альтернативного пути детоксикации – тиоредоксиновой системы (рисунок 5) [20].

Таким образом, основной механизм действия этмабена реализуется за счет его способности ингибировать сукцинатдегидрогеназу. Однако в отличие от классических антиоксидантов этмабен реализует стратегию непрямого контроля окислительного стресса через метаболическое репрограммирование [21].

Ключевой механизм подавления АФК заключается в комбинированном воздействии на их генерацию: ингибировании митохондриального источника (через блокаду СДГ) и снижении экспрессии внемитохондриального (Nox1).

Таким образом, этмабен снижает окислительную нагрузку, не напрямую стимулируя антиоксидантную систему, а уменьшая ее функциональную необходимость. Это инициирует каскад адаптивных реакций: активацию транскрипционного фактора Nrf2/Nrf2, репрограммирование метаболических путей (индукция Cpt1b, Glud1), усиление синтеза ферментов антиоксидантной защиты (Txnrd1) и модуляцию сигнальных каскадов пролиферации (Hes1).

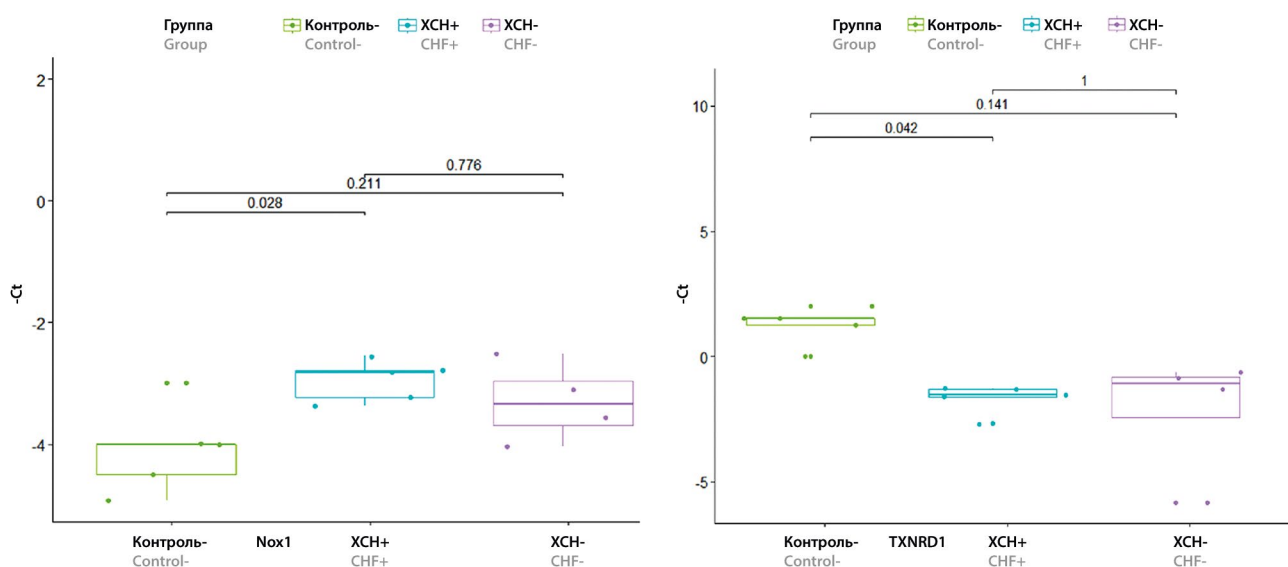


Рисунок 5. Гены, ассоциированные с окислительным стрессом (Nox1, TXNRD1)

Figure 5. Genes associated with oxidative stress (Nox1, TXNRD1)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В контексте кардиоренальных взаимоотношений при ХСН 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойную кислоту можно охарактеризовать как многофакторный метаболический и редокс-регулятор. Полученные данные обосновывают дальнейшее изучение соединения как потенциального средства для терапии заболеваний, ассоциированных с нарушением энергетического обмена и оксидативным стрессом. С учетом полученных результатов возникает обоснованная гипотеза о том, что эффекты этмабена, проявляющиеся в виде метаболического перепрограммирования, активации β -окисления жирных кислот и стимуляции альтернативных антиоксидантных систем, могут быть экстраполированы и на другие производные малоновой кислоты, в частности на малобен.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Zoccali C., Mallamaci F., Halimi J.-M., Rossignol P., Sarafidis P., De Caterina R., Giugliano R., Zannad F. From Cardioresenal Syndrome to Chronic Cardiovascular and Kidney Disorder: A Conceptual Transition. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2024;19(6):813–820. DOI: 10.2215/CJN.0000000000000361.
2. Maisons V., Hamzaoui M., Hanoy M., Pezel T., Guerrot D., Nezam D. Syndrome cardio-rénal : quoi de neuf en 2023? *Néphrologie & Thérapeutique*. 2023;19(2):121–138. DOI: 10.1684/ndt.2023.15.
3. Mullens W., Abrahams Z., Francis G.S., Sokos G., Taylor D.O., Starling R.C., Young J.B., Tang W.H.W. Importance of venous congestion for worsening of renal function in advanced decompensated heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(7):589–596. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.05.068.
4. Bhargava P., Schnellmann R.G. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nature Reviews Nephrology*. 2017;13(10):629–646. DOI: 10.1038/nrneph.2017.107.
5. Emma F., Montini G., Parikh S.M., Salviati L. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2016;12(5):267–280. DOI: 10.1038/nrneph.2015.214.
6. Zhan M., Brooks C., Liu F., Sun L., Dong Z. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney International*. 2013;83(4):568–581. DOI: 10.1038/ki.2012.441.
7. Huang H., Li G., He Y., Chen J., Yan J., Zhang Q., Li L., Cai X. Cellular succinate metabolism and signaling in inflammation: implications for therapeutic intervention. *Frontiers in Immunology*. 2024;15:1404441. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1404441.
8. Abe J., Vujic A., Prag H.A., Murphy M.P., Krieg T. Malonate given at reperfusion prevents post-myocardial infarction heart failure by decreasing ischemia/reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119(4):691–697. DOI: 10.1007/s00395-024-01063-z.
9. Ивкин Д.Ю., Зеленцова А.Б., Краснова М.В., Карпов А.А., Пажельцев В.В., Напалкова С.М., Тернинко И.И., Титович И.А., Оковитый С.В. Сравнительная эффективность фармакотерапии хронической сердечной недостаточности в эксперименте. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):349–357. DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998. [Ivkin D.Yu., Zelentsova A.B., Krasnova M.V., Karpov A.A., Pzheltsev V.V., Napalkova S.M., Terninko I.I., Titovich I.A., Okovitiy S.V. Comparative efficacy study of experimental chronic heart failure. *Drug development & registration*. 2025;14(1):349–357. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1998.]
10. Handy D.E., Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022;188:146–161. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004.
11. Kasai S., Shimizu S., Tataru Y., Mimura J., Itoh K. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*. 2020;10(2):320. DOI: 10.3390/biom10020320.
12. Mills E.L., Pierce K.A., Jedrychowski M.P., Garrity R., Winther S., Vidoni S., Yoneshiro T., Spinelli J.B., Lu G.Z., Kazak L., Banks A.S., Haigis M.C., Kajimura S., Murphy M.P., Gygi S.P., Clish C.B., Chouchani E.T. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature*. 2018;560(7716):102–106. DOI: 10.1038/s41586-018-0353-2.
13. Xiao M., Yang H., Xu W., Ma S., Lin H., Zhu H., Liu L., Liu Y., Yang C., Xu Y., Zhao S., Ye D., Xiong Y., Guan K.-L. Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & Development*. 2012;26(12):1326–1338. DOI: 10.1101/gad.191056.112.
14. Panov A.V., Mayorov V.I., Dikalov S.I. Role of Fatty Acids β -Oxidation in the Metabolic Interactions Between Organs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(23):12740. DOI: 10.3390/ijms252312740.
15. Rusanescu G., Weissleder R., Aikawa E. Notch signaling in cardiovascular disease and calcification. *Current Cardiology Reviews*. 2008;4(3):148–156. DOI: 10.2174/157340308785160552.
16. Liu G.Y., Sabatini D.M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(4):183–203. DOI: 10.1038/s41580-019-0199-y.
17. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual Review of Physiology*. 2014;76:39–56. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021113-170322.
18. Cipriano A., Viviano M., Feoli A., Milite C., Sarno G., Castellano S., Sbardella G. NADPH Oxidases: From Molecular Mechanisms to Current Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2023;66(17):11632–11655. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c00770.
19. Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;66:75–87. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
20. Tonelli C., Chio I.I.C., Tuveson D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018;29(17):1727–1745. DOI: 10.1089/ars.2017.7342.
21. Chouchani E.T., Pell V.R., James A.M., Work L.M., Saeb-Parsy K., Frezza C., Krieg T., Murphy M.P. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metabolism*. 2016;23(2):254–263. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.12.009.