

ДОЛЖИКОВА Ирина Николаевна

**ДИСТАНТНОЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ
ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЭРИТРОПОЭТИНА И ТАДАЛАФИЛА ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПОЧЕК**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Белгород – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель: **Покровский Михаил Владимирович,**
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты: **Артюшкова Елена Борисовна,**
доктор биологических наук,
ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор НИИ экологической медицины

Резников Константин Михайлович,
заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор,
ГБОУ ВПО "Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко" Министерства здравоохранения Российской Федерации, зав. кафедрой фармакологии

Ведущая организация: Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (ОАО «ВНЦ БАВ»)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2013 года в «___» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций на соискание
учёной степени кандидата наук, на соискание
учёной степени доктора наук,
доктор биологических наук

В.И. Кочкаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ишемические повреждения тканей и органов являются одним из основных патогенетических механизмов, первично или вторично лежащим в основе многих заболеваний и патологических процессов. Помимо этого, медико-биологические аспекты проблемы заключаются также в том, что сами лечебно-диагностические вмешательства могут быть связаны с временным выключением кровотока в органах. Это касается реконструктивной и трансплантационной хирургии, экономных удалений частей органов. К числу последних относятся почки, на которых также выполняются вмешательства, связанные с частичным или полным прекращением кровотока различной продолжительности.

При ишемии запускается сложный каскад биохимических изменений в клетках и тканях, заканчивающийся различной степенью гибели структур [Биленко М.В., 1989; Крыжановский Г.Н., 2001; Капелька В.И., 2005]. Поиски способов профилактики и коррекции ишемических повреждений, повышения резистентности биологических структур к ишемии привели к раскрытию целого ряда механизмов возможной клеточной и тканевой протекции. К их числу относится феномен прекондиционирования (ишемического прекондиционирования), имеющий уже 25-летнюю историю [Murphy S. E. и соавт., 1986]. Было установлено, что ишемия, создаваемая в других органах (дистантное ишемическое прекондиционирование) в определенных временных режимах, оказывает протективное действие на миокард, подвергающийся длительному действию циркуляторной гипоксии. По мере расшифровки механизмов дистантного ишемического прекондиционирования (ДИП), закономерно возникло направление исследований, связанное с управлением ими посредством фармакологических агентов, влияющих на различные звенья создания ДИП. С практической точки зрения данный подход является наиболее перспективным, так как основан на контролируемых воздействиях, позволяет влиять на различные звенья прекондиционирования с учетом особенностей отдельных тканей и органов [Бокерия Л.А., Чичерин И.Н., 2007; Колесник И.М., 2010; Dirnagl U. et al., 2009]. Ведущее значение в механизмах дистантного и фармакологического прекондиционирования отводится системе метаболизма оксида азота (NO), а также факторам, влияющим на неоангиогенез [Покровский В.И., 2005; Bolli R., 2001; Jugdutt B.I., 2003; Kunz A., 2007]. Однако до настоящего времени нуждаются в исследовании изменения внутриорганных метаболических систем, ответственных за прекондиционирующие эффекты дистантной ишемии и фармакологических агентов.

Почки занимают особое место, так как целый ряд внутрипочечных гуморальных механизмов (компоненты ренин-ангиотензиновой системы, простагландины, ион- и водно-зависимые механизмы) играет ведущую роль в регуляции локальной и системной гемодинамики и, в свою очередь, зависит от перфузии почечной паренхимы. Особый интерес представляет изучение связей системы эндотелиальной NO-синтазы с эндотелиопротективными и проангиогенными факторами, к числу которых относится эндоглин (CD105). Одним из ключевых факторов, участвующих в функционировании системы ренин-ангиотензин – простагландины в почках, является циклооксигеназа второго типа (COX-2), активность

которой интегрально отражает состояние механизмов регуляции внутрисочечного и системного кровотока.

Анализ литературы свидетельствует, что в исследованиях отечественных авторов акценты в изучении явления прекодиционирования в профилактике ишемических-реперфузионных поражений внутренних органов пока смещены в область кардиологии. Работы, посвященные изучению механизмов ишемического и фармакологического прекодиционирования для обеспечения протекции почечных структур, единичные. При этом имеющиеся литературные данные свидетельствуют о перспективности исследований фармакологических свойств ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила и эритропозтина как прекодиционирующих средств [Покровская Т.Г. и соавт., 2010]. В связи с указанными аспектами проблемы нами сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования. Провести оценку и определить возможные механизмы протективных эффектов ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила, эритропозтина, дистантного ишемического прекодиционирования и их комбинаций при ишемическом-реперфузионном повреждении почек в эксперименте.

Задачи исследования.

1. Изучить влияние дистантного ишемического прекодиционирования, фармакологического прекодиционирования тадалафилом и эритропозтином и их комбинаций на структурные изменения почек после ишемии-реперфузии в различные сроки.

2. Исследовать влияние дистантного ишемического прекодиционирования, фармакологического прекодиционирования тадалафилом и эритропозтином и их комбинаций на синтез эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтазы после ишемии-реперфузии в различные сроки.

3. Определить влияние дистантного ишемического прекодиционирования, фармакологического прекодиционирования тадалафилом и эритропозтином и их комбинаций на цитопротекторный эндотелиальный фактор CD105 (эндоглин) после ишемии-реперфузии в различные сроки.

4. Изучить влияние дистантного ишемического прекодиционирования, фармакологического прекодиционирования тадалафилом и эритропозтином и их комбинаций на синтез циклооксигеназы 2 типа (COX-2) в регуляторных структурах почек после ишемии-реперфузии в различные сроки.

Научная новизна исследования. В работе впервые проведено комплексное изучение локальной экспрессии ферментов метаболизма NO (эндотелиальной – eNOS, и индуцибельной – iNOS, синтазы), эндотелиальных маркеров (фактор VIII, VEGF, CD105) и циклооксигеназы второго типа (COX-2) при ишемии-реперфузии почек, взаимосвязей данных факторов с учетом характера структурных изменений паренхимы почек в раннем и отдаленном периодах после повреждения.

Впервые изучено изолированное и комбинированное влияние ДИП, ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила и эритропозтина (ЭПО) на структурные изменения почек и экспрессию указанных тканевых факторов в аспекте эффектов дистантного и фармакологического прекодиционирования. Показано, что краткосрочная дистантная ишемия скелетных мышц, ингибитор фосфодиэстеразы-5

тадалафил и ЭПО обладают прекодиционирующим действием на почки как в изолированном виде, так и в различных комбинациях.

Установлены взаимосвязи систем метаболизма eNOS и iNOS, COX-2 и эндотелиального фактора CD105 в реализации эффектов дистантного ишемического и фармакологического прекодиционирования с применением тадалафила и эритропоэтина.

Впервые установлены отличия эффективности действия сочетаний фармакологического и дистантного прекодиционирования на различные звенья, участвующие в развитии противоишемической протекции структур почек, и связь с периодами после ишемического-реперфузионного повреждения. Выявлены краткосрочные и отдаленные эффекты дистантного и фармакологического прекодиционирования.

Научно-практическое значение. Полученные данные раскрывают новые прикладные аспекты применения прекодиционирующих факторов для профилактики и коррекции ишемических повреждений органов, в частности почек. Доказанная эффективность применения ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила и ЭПО в качестве самостоятельных агентов, а также в сочетании с ДИП дает основания для разработки практически применимых подходов к профилактике и коррекции ишемических повреждений почек, проведению клинически направленных исследований. Материалы диссертации внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедры биохимии и фармакологии медицинского факультета и кафедры клинической фармакологии и фармацевтических дисциплин института последипломного медицинского образования ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Апробация работы

Материалы работы были представлены на IX Международной научно-практической телеконференции «Актуальные проблемы современной науки» (<http://tele-conf.ru/sektsiya-7.-problemyi-meditsinyi-i-psihologii/3.html>, Томск, 2012), IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), X научно-практической конференции студентов, интернов, ординаторов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 10-летию ИПМО НИУ «БелГУ» (Белгород, 2012), совместном заседании кафедр медицинского и фармацевтического факультетов ФГАОУ ВПО НИУ «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (Белгород, 2012), I Международной конференции «Морфо-клинические аспекты безопасности жизнедеятельности» (Воронеж, 2012), итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Черноземного научного центра РАМН и отделения РАЕН (Курск, 2013).

Личный вклад автора. Автором лично определены цель и задачи исследования, разработаны методические подходы для их решения, проведено экспериментальное исследование на лабораторных животных, выполнен сбор и анализ полученных данных. Автор лично принимал участие в выполнении экспериментов, иммуноморфологических исследований, проводил обработку и анализ полученных данных, подготовку основных публикаций, апробацию результатов исследования, выполнил написание и оформление рукописи.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 в журналах из перечня ВАК.

Положения, выносимые на защиту.

1. Ингибитор фосфодиэстеразы-5 тадалафил, рекомбинантный эритропоэтин, дистантное ишемическое прекондиционирование и их сочетания оказывают протективное действие на структуры почек при ишемии-реперфузии в эксперименте, которое реализуется через NO-зависимые механизмы, эндотелиопротективный фактор CD105 (эндоглин) и COX-2 зависимые регуляторные механизмы.

2. Степень эффективности прекондиционирующих влияний и определяющие ее ведущие механизмы, отличаются в раннем и позднем периодах после ишемии-реперфузии почек. NO-зависимые механизмы реализуются как в раннем, так и отдаленном периодах после ишемии-реперфузии, тогда как CD105 и COX-2 зависимые протективные эффекты преобладают в отдаленном периоде.

3. На синтез eNOS в эндотелии капилляров почечных клубочков в раннем периоде в наибольшей степени влияет сочетание эритропоэтина с тадалафилом. В отдаленном периоде более эффективен тадалафил и его сочетание с дистантным ишемическим прекондиционированием, коррелируя с положительным влиянием на экспрессию CD105 и COX-2 зависимые механизмы. Сочетание эритропоэтина и тадалафила с дистантным ишемическим прекондиционированием оказывает протективное влияние на синтез iNOS вне зависимости от срока после ишемии-реперфузии.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов, рекомендаций по использованию научных выводов и указателя литературы, включающего 152 источника, из которых 34 отечественных и 118 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 36 рисунков, включающих 15 графиков и схем, 73 макро- и микрофотографии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования и методы эксперимента

Экспериментальное исследование выполнено на 185 особях белых крыс-самцов линии Wistar массой 180 – 250 гр. Все исследования выполнены в одно и то же время суток (с 15 до 19 часов) с соблюдением правил гуманного обращения с животными с осуществлением хирургических вмешательств под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг массы внутривентрально), выведением животных из эксперимента передозировкой хлоралгидрата внутривентральным введением. Эксперименты выполнены в лабораториях центра «Фармация» и «Центра доклинических и клинических исследований» НИУ БелГУ. Распределение особей по группам эксперимента представлено в таблице 1.

Экспериментальное исследование выполнено на двух сроках: 1 сутки и 21 сутки после воздействий с учетом результатов предварительных исследований на промежуточных сроках. Дистантное ишемическое прекондиционирование создавали по ранее апробированной и обоснованной методике наложением эластично-

го жгута на верхнюю треть контрлатерального (правого) бедра на 10 минут с последующей 30 минутной реперфузией непосредственно перед моделированием ишемии почек. Продолжительность эпизода ишемии выбрана с учетом данных литературы [Колесник И.М., 2010]. Контролем эффективности пережатия служило исчезновение пульсации на артериях стопы и появление цианоза ее кожи в первые секунды после наложения жгута. После снятия жгута двигательных расстройств, которые могли бы быть связаны с механическим повреждением мышц бедра и крупных нервов, мы не наблюдали.

Ингибитор фосфодиэстеразы-5 тадалафил (препарат «Сиалис» производства Eli-Lilly, Великобритания) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг массы животного на 10% диметилсульфоксиде за 1 час до моделирования ишемии-реперфузии почек. Выбранная доза соответствует средней терапевтической дозе для человека 10 мг/кг, пересчитанной по формуле межвидового переноса доз [Покровская Т.Г. и соавт., 2010]. Рекомбинантный эритропоэтин (ЕРО) («Эпокрин» эпоэтин альфа; ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых препаратов» Федерального медико-биологического агентства г. Санкт-Петербург, Россия) вводили подкожно в дозе 50 МЕ/кг за 12 часов до основной части эксперимента.

Для фармакологического контроля использовали блокатор АТФ зависимых калиевых каналов глибенкламид (Sigma), который вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг веса на 10% диметилсульфоксиде за 30 минут до проведения дистантного ишемического прекондиционирования и/или введения изученных препаратов.

Таблица 1

Экспериментальные группы и распределение животных

Экспериментальные группы		Количество животных и сроки эксперимента		
		1 сутки	21 сутки	Всего
Контрольная				11
Экспериментальные				
1	Ишемия-реперфузия	10	12	25
2	ДИП - ишемия	10	12	25
3	Тадалафил – ишемия	10	10	20
4	Тадалафил – ДИП – ишемия	10	10	20
5	Глибенкламид – тадалафил – ишемия		10	10
6	Эритропоэтин – ишемия	10	10	20
7	Эритропоэтин – ДИП – ишемия	10	10	20
8	Эритропоэтин – тадалафил – ишемия	10	10	20
9	Эритропоэтин – тадалафил – ДИП - ишемия	10	10	20
Итого				185

ДИП – дистантное ишемическое прекондиционирование

Моделирование ишемического-реперфузионного повреждения проводили на левой почке. У наркотизированных животных после выделения почечной «ножки» под нее подводили шелковую лигатуру, которую затягивали одним простым узлом с полным пережатием почечной артерии и вены. Почку погружали в

рану, которую на протяжении периода ишемии прикрывали салфеткой, смоченной антисептиками. Концы лигатуры оставляли снаружи. Через 30 минут почку вновь выводили в рану и снимали лигатуру. Почку вновь погружали в рану после визуально различимого появления реперфузионного кровотока по сосудам. Рану послойно зашивали шелковыми нитями и обрабатывали антисептиками. В послеоперационном периоде производили наблюдение за животными и повторную обработку антисептиками послеоперационной раны. Осложнений, связанных с операциями и гибели животных от технических дефектов выполняемых манипуляций, не было.

Методы исследования

Методическую основу выполненного исследования составило морфологическое изучение изменений почек с применением как общегистологических и специальных методов, так и иммуногистохимических методов прямой детекции изучаемых продуктов клеточной экспрессии. Исследование выполнено в лаборатории научно-образовательного центра «Прикладной иммуноморфологии и цитогенетики» НИУ БелГУ.

После выведения животных из эксперимента производили макроскопическое исследование почек, взвешивание (в мг) с вычислением относительной массы (мг/гр массы тела животного). Подготовка образцов для гистологического исследования и изготовление микропрепаратов проведены с применением сертифицированного автоматизированного оборудования фирмы Leica (Германия). После фиксации обе половины почек отдельно полностью заливали в стандартном режиме в парафин. Срезы для стандартного гистологического исследования окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Ван Гизон и Маллори с использованием стандартных наборов.

После обзорного гистологического исследования в каждом блоке выбирали стандартные репрезентативные участки площадью 5x5 мм, которые вырезали и перезаливали в тканевые мультиблоки по 10-15 кусочков из разных групп эксперимента. С полученных стандартных мультиблоков изготавливали срезы толщиной 4 мкм для иммуногистохимического исследования. Таким образом, на одном стекле одновременно выполняли иммуногистохимические реакции на 10-15 образцах в идентичных условиях. Демаскировку антигенов выполняли по стандартному протоколу высокотемпературной демаскировки в цитратном буфере с pH=7,0 или трис-ЭДТА буфере с pH=9,0 в зависимости от протокола исследования (таблица 2). Для выявления реакции применены полимерные системы детекции Ultra Vision (ThermoScientific, Великобритания) и Histofine (Nichirei Biosciences, Япония) с хромогеном – диаминобензидином. Характеристики использованных антител в соответствии с задачами исследования и особенности протоколов представлены в таблице 2.

Основная часть морфологического исследования выполнена после создания электронной галереи изображений с помощью полуавтоматического сканера микропрепаратов Mirax Desk (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия), что позволило полностью стандартизировать режимы морфометрии исследования. На компьютерных изображениях микропрепаратов определяли характер распределения иммуногистохимических реакций и удельную площадь иммунореактивного

вещества, подсчитывали количество почечных клубочков с позитивными реакциями на изученные маркеры, количество отдельных иммунопозитивных клеток. С помощью программы для просмотра сканированных изображений «PanoramicViewer 1.15» производили линейные измерения. Определение площадей иммунореактивного вещества проведено с использованием программы для анализа изображений WCIF ImageJ (США) после преобразования изображений с выделением зон реакций по типу «компьютерного скелетирования».

Количественные данные регистрировали в электронных таблицах MS Excel, средствами которой, а также с помощью программы Statistica 6.0 проведена статистическая обработка после определения характера распределения признаков с применением параметрических (критерий t Стьюдента) и непараметрических (критерий Пирсона – χ^2 и Фишера), критериев сравнения средних, методов корреляционного анализа.

Таблица 2

Протоколы иммуногистохимических исследований

Антитела	Клон	Фирма	Демаasking*	Разведение
eNOS/Nitric Oxide Synthase-Endothelial	Polyclonal	Spring Bioscience	Citra	1:70
iNOS/ Nitric Oxide Synthase-Inducible	Polyclonal	Spring Bioscience	Citra	1:100
CD105/Endoglin/TGF- β Receptor	Polyclonal	Spring Bioscience	Citra	1:50
VEGF	Polyclonal	Spring Bioscience	Tris-EDTA	1:100
Factor VIII	Polyclonal	CellMarque	Citra	1:500
COX-2	SP21	CellMarque	Tris-EDTA	1:500

Citra – цитратный буфер, pH=6,0;

Tris- EDTA – трис-ЭДТА буфер, pH=9,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам макроскопических и общегистологических исследований в изученных группах установлены различия в зависимости от комбинации прекондиционирующих агентов и сроков эксперимента. Особенностью прекондиционирующих агентов, примененных в выполненных экспериментальных сериях, является развитие большей степени кровенаполнения сохранившихся внутрипочечных сосудов при ДИП и применении ЭПО в изолированном виде и в сочетании с ДИП. Меньшая степень структурных повреждений через сутки после ишемии-реперфузии на фоне прекондиционирующих влияний закономерно отразилась в отдаленном периоде (через 21 сутки после повреждения) в виде меньшей выраженности постишемических склеротических изменений почек. Однако на уровне светомикроскопических характеристик почечных структур различия между эффектами прекондиционирующих агентов достоверно не выявляются, что определяет необходимость оценки более тонких изменений на уровне биохимических и функциональных показателей, характеризующих эндотелий-ассоциированные и другие цитопротективные механизмы.

Изменения экспрессии эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтаз в структурах почек при их ишемии и на фоне дистантного и фармакологического прекондиционирования

У интактных животных eNOS экспрессируется в эндотелии всех типов сосудов. Площадь иммунореактивного (eNOS+) вещества составила в среднем $24,3 \pm 0,6\%$. Через 24 часа после ишемии в сохранившихся клубочках экспрессия eNOS достоверно ($p < 0,05$) снижена почти в 8 раз – до $3,63 \pm 0,25\%$. Через 21 сутки в оставшихся вне зон склероза участках почечной паренхимы экспрессия eNOS составила $5,73 \pm 0,33\%$ по площади иммунореактивного вещества, оставаясь достоверно ниже контрольных значений.

Дистантное ишемическое прекондиционирование (ДИП) проявило по результатам иммуногистохимического исследования экспрессии eNOS частичный позитивный эффект. Через 24 часа после ишемии на фоне ДИП площадь eNOS+ участков в клубочках составила $10,93 \pm 0,27\%$. На 21-е сутки этот эффект был еще более выраженным, но площадь eNOS+ участков оставалась достоверно ниже интактных контрольных значений, составив $15,80 \pm 0,35\%$. Эффект фармакологического прекондиционирования препаратом тадалафил превосходил таковой у ДИП уже через сутки после ишемии. Уровень экспрессии eNOS по площади иммунореактивного вещества в клубочках не достигал контрольных значений, но был достоверно выше в сравнении с ДИП, составив в среднем $14,17 \pm 0,38\%$ ($p < 0,05$). На 21-е сутки был получен полный эффект достижения экспрессии eNOS в эндотелии клубочковых капилляров интактного уровня, даже в участках перигломерулярного склероза. Площадь eNOS+ вещества в клубочках составила в среднем $25,63 \pm 0,56\%$. Применение эритропоэтина (ЭПО) в использованном нами в эксперименте режиме на раннем сроке (24 часа) не влияло на экспрессию eNOS в эндотелии клубочковых капилляров. Однако при всех сочетаниях с ДИП и тадалафилом был достигнут достоверный эффект, который был наибольшим при сочетании ЭПО+Тадалафил ($17,60 \pm 0,25\%$). На 21-е сутки выявлены значимые влияния введения ЭПО на экспрессию eNOS. Площади иммунореактивного вещества достоверно не отличались в сериях ЭПО, ЭПО+Тадалафил и ЭПО+ДИП+Тадалафил, составив соответственно $22,01 \pm 0,45\%$, $21,0 \pm 0,40\%$ и $20,63 \pm 0,33\%$. Роль прекондиционирующих влияний/агентов во влиянии на экспрессию eNOS в раннем и отдаленном периодах оказалась различной. Сочетание ЭПО+Тадалафил оказалось наиболее эффективным в раннем периоде, но не значимым на 21-е сутки эксперимента. Напротив, сочетание Тадалафил+ДИП оказалось эффективнее в отдаленном периоде. ЭПО в чистом виде и особенно в комбинации с двумя другими прекондиционирующими агентами продемонстрировал наименьшую эффективность. Результаты морфометрии представлены на рис. 1, 2.

При исследовании влияния изученных прекондиционирующих агентов на экспрессию iNOS выявлена иная динамика как в эффектах, выявляемых по уровню экспрессии фермента, так и по срокам. Иммунореактивность на iNOS у интактных животных выявляется в мезангиальных клетках почечных клубочков, клетках внутреннего листка капсул почечных телец – подоцитах, интерстициальных клетках в корковом и мозговом веществе, в стенках мелких артериол.

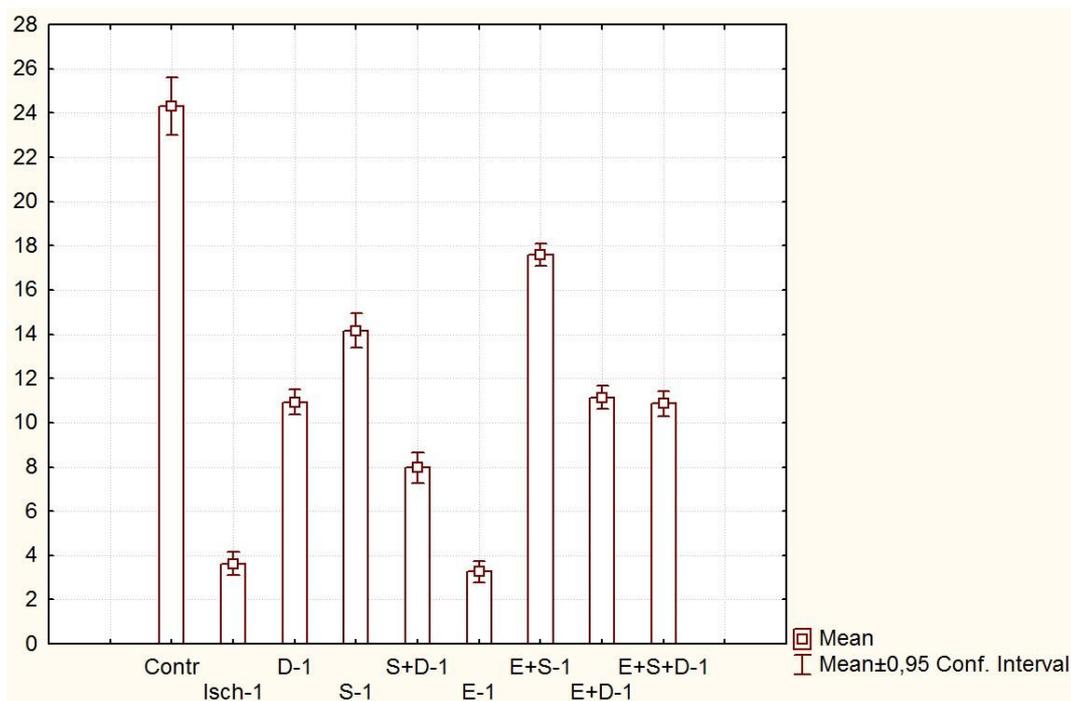


Рис. 1.

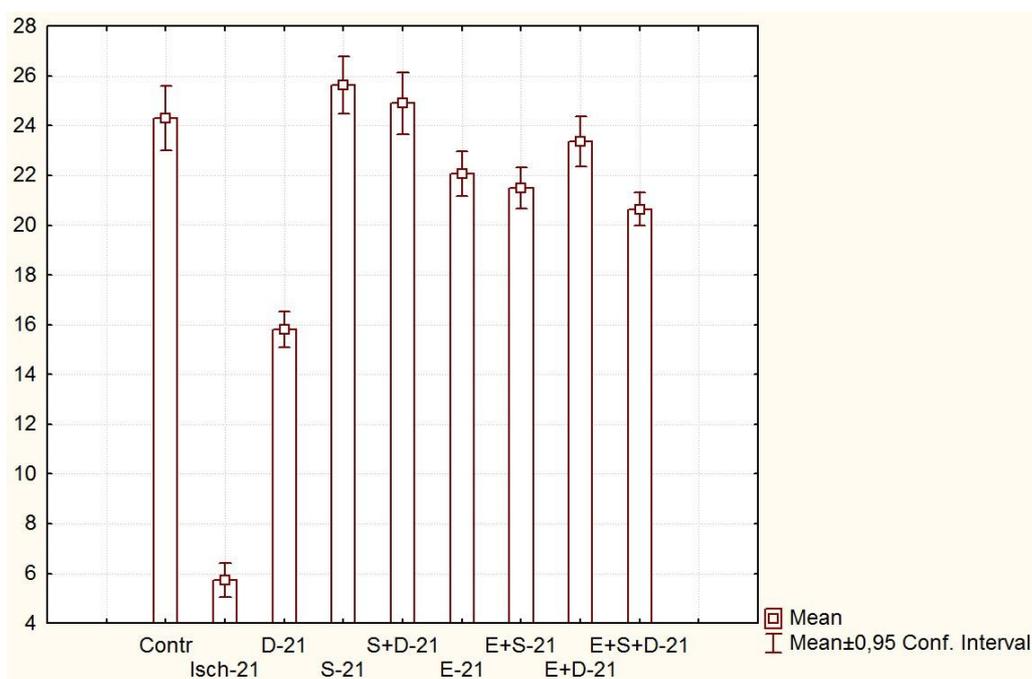


Рис. 2. Удельные площади положительной иммуногистохимической реакции (площадь иммунореактивного eNOS+ вещества) на eNOS в эндотелии клубочковых капилляров почек у интактных животных (Contr), после ишемии (I) и при прекондиционировании: S – тадалафил, D – ДИП, E – эритропоэтин, и их сочетания. Срок эксперимента 1 сутки (рис. 1), 21 сутки (рис. 2).

По истечении первых суток после ишемии площадь iNOS+ участков в клубочках составила в среднем $2,97 \pm 0,25\%$ - в 7 раз меньше в сравнении с интактным контролем и была меньше, чем площадь eNOS+ участков в этой же серии эксперимента. Последнее отличие закономерно, поскольку площадь потенциальной экспрессии iNOS в почечных тельцах меньше (мезангиальные клетки, подо-

циты), чем площадь eNOS экспрессирующего эндотелия. Значимой особенностью явилась экспрессии iNOS в многочисленных клетках реактивного инфильтрата в некротической и перинекротической зонах. Через 3 недели после ишемии экспрессия iNOS повышалась, но оставалась более чем в 3 раза меньшей в сравнении с интактным контролем ($4,63 \pm 0,26\%$).

Исследованные прекондиционирующие влияния в различной степени оказывали позитивный эффект на экспрессию iNOS, кроме введения эритропоэтина. В последнем случае через 24 часа после ишемии площадь iNOS+ структур составила всего $3,03 \pm 0,25\%$. Во всех остальных случаях экспрессия iNOS, оцениваемая по площади иммунопозитивных структур, возрастала в диапазоне от 6,87% (при ДИП) до 11.23% (при сочетании ЭПО+ДИП+Тадалафил). На 21-е сутки эксперимента все исследованные прекондиционирующие влияния обуславливали повышение экспрессии iNOS до величин, не отличающихся, или минимально отличающихся от интактного уровня, практически в равной степени, в отличие от eNOS. Это свидетельствует о более значимой роли iNOS на позднем сроке эксперимента (рис. 3).

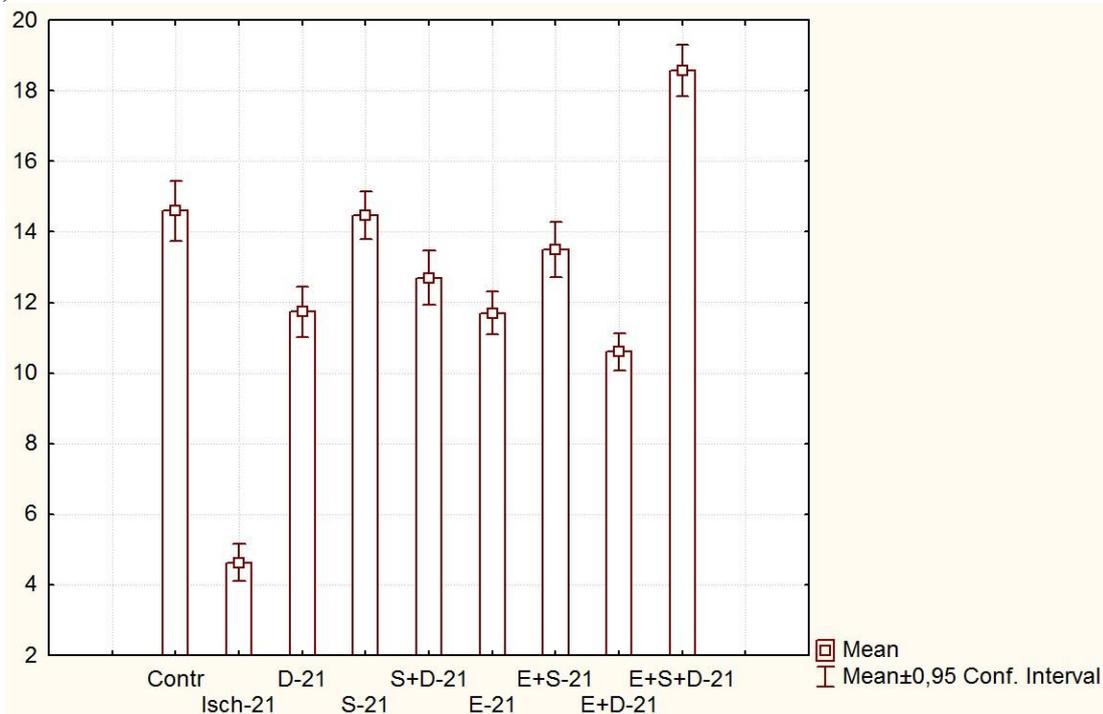


Рис. 3. Удельные площади положительной иммуногистохимической реакции (площадь иммунореактивного iNOS+ вещества) на iNOS в структурах клубочков почек. Срок эксперимента 21 сутки.

При прекондиционирующих влияниях в перинекротической зоне существенно ниже была концентрация iNOS-экспрессирующих реактивных клеток (лейкоцитов и макрофагов), что может быть положительным фактором в уменьшении распространенности некроза за счет снижения активности iNOS в реактивных элементах с уменьшением потенциальной цитотоксичности повышенной продуцируемой NO.

Изменения экспрессии эндотелиальных маркеров: рецепторного комплекса трансформирующего фактора роста- β эндоглина (CD105), VEGF и фактора VIII в структурах почек при их ишемии и на фоне дистантного и фармакологического прекондиционирования

Через сутки после ишемии уровень экспрессии (по удельной площади иммунореактивного вещества) CD105 в эндотелии в эндотелии клубочковых капилляров снижен более чем в 2 раза. Исследованные фармакологические агенты (ЭПО и тадалафил) как самостоятельно, так и в сочетании с ДИП оказывали достоверный цитопротекторный эффект на эндотелий клубочковых капилляров. При изолированном ДИП эффекта не выявлено. В остальных сериях экспрессия CD105 повышена практически до контрольных величин в равной степени (рис. 4).

При корреляционном анализе экспрессии NOS и CD105 в эндотелии клубочковых капилляров высокая степень связи между экспрессией eNOS и iNOS (коэффициент корреляции Спирмена = 0,914) выявлена только в серии с применением эритропоэтина, с CD105 экспрессия NOS не коррелировала. На 21-е сутки после ишемии-реперфузии почек как визуально, так и при количественном анализе определяется достоверное снижение экспрессии CD105 в клубочковых капиллярах вне зависимости от топографии и диаметров почечных телец. При корреляционном анализе не выявлено достоверной зависимости между экспрессией CD105 и eNOS во всех сериях, кроме серии с введением глибенкламида. В этой серии коэффициент линейной корреляции составил 0,92, коэффициент корреляции Спирмена 0,88 ($p < 0,05$). При различных вариантах прекондиционирования выявлены в целом положительные, но отличающиеся по степени выраженности эффекты. В серии с ДИП экспрессия CD105 приблизилась к значениям у интактных контрольных животных. При фармакологическом прекондиционировании ингибитором фосфодиэстеразы-5 тадалафилом уровень экспрессии CD105 оказался недостоверно ниже контрольных значений. При сочетании Тадалафил+ДИП показатель экспрессии CD105 не отличался от контрольных значений. Введение глибенкламида, как показывают количественный анализ и визуально наблюдавшиеся изменения, в равной степени блокирует эффект комбинированного прекондиционирования в отношении как CD105, так и eNOS. В сериях с применением ЭПО на 21-е сутки эксперимента также выявлена нормализация показателей экспрессии CD105. В целом эффективность влияния прекондиционирования на экспрессию CD105 через 24 часа после ишемии оказалась равной для фармакологических агентов и их сочетаний друг с другом и с ДИП, но не выявлена для ДИП.

Исследование экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и фактора VIII выполнено с учетом этих веществ как маркеров жизнеспособного эндотелия. Однако во всех сериях реакция на них была однотипно на низком уровне, особенно фактора VIII, в связи с чем количественный анализ проведен не был. Однако при визуальной оценке было выявлено, что реакции на эти маркеры находятся в прямой связи с уровнем экспрессии CD105, выражая цитопротекторный эффект последнего.

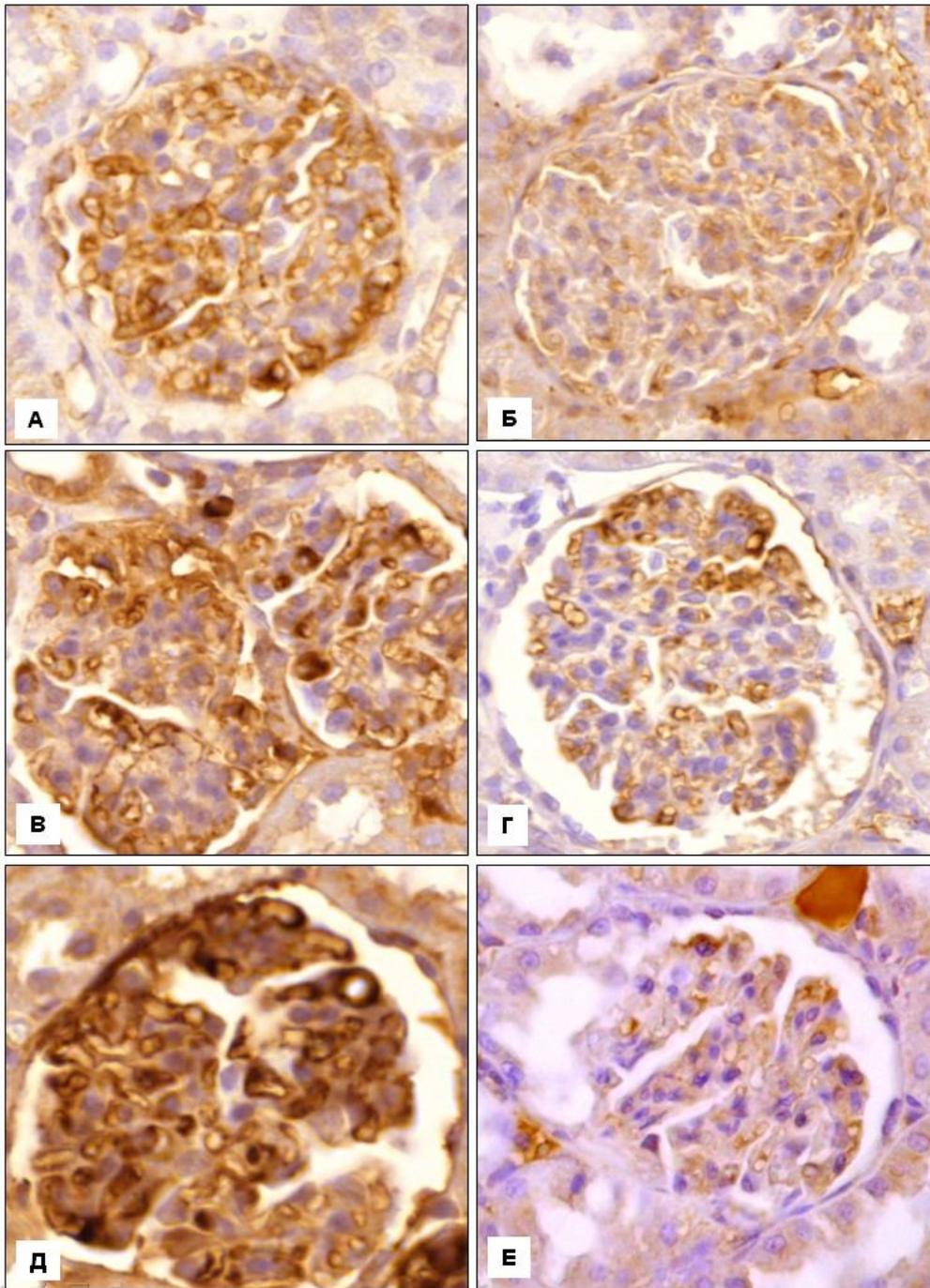


Рис. 4. Различия в экспрессии CD105 в контроле (А), на 21-е сутки после ишемии-реперфузии левой почки (Б), при ДИП (В), фармакологическом preconditionировании тадалафилом (Г), при preconditionировании Тадалафил+ДИП (Д) и на фоне введения глибенкламида (Е): равномерная экспрессия гликопротеина CD105 в эндотелии клубочковых капилляров в контроле, ее различная степень восстановления при preconditionировании, резкое снижение экспрессии после ишемии в отдаленном периоде (Б) и на фоне введения глибенкламида (Е). Иммуногистохимические реакции. Микрофото. х 400.

Схема возможных механизмов фармакологического preconditionирования с участием системы CD105/NO представлена на рис. 5. Эндоглин (CD105) является одним из важнейших регуляторов развития структур сердечно-сосудистой системы как в пренатальном онтогенезе, так и при различных состояниях в постнатальном периоде. CD105 – гомодимерный трансмембранный гликопротеин, который в ассоциации с рецепторами трансформирующего фактора ро-

ста β (TGF- β) связывает TGF- β 1, TGF- β 3, активин. Он конституитивно экспрессируется эндотелиальными клетками различных кровеносных сосудов, сосудистыми гладкими миоцитами, мезангиальными клетками. Роль CD105 в регуляции выработки эндотелием других вазоактивных факторов, в том числе NO, высока вероятна в силу полипотентности TGF- β 1, что показано в имеющихся экспериментальных исследованиях. Между системой эндоглин/TGF- β 1 и eNOS имеется непосредственная связь, которая реализуется, в том числе и на генетическом уровне, так как в промоторной части гена eNOS потенциально имеются участки, чувствительные к действию TGF- β 1. Эффекты действия CD105 на систему eNOS реализуются как на уровне увеличения синтеза матричной РНК eNOS, так и на посттрансляционных этапах, в частности, за счет увеличения периода полураспада eNOS. Кроме этого, активизация мембран-связанной системы CD105-eNOS, в комплексе с которой находятся кальмодулин, белок теплового шока 90 (HSP90) и кавеолин, требует связывания со свободным кальцием.

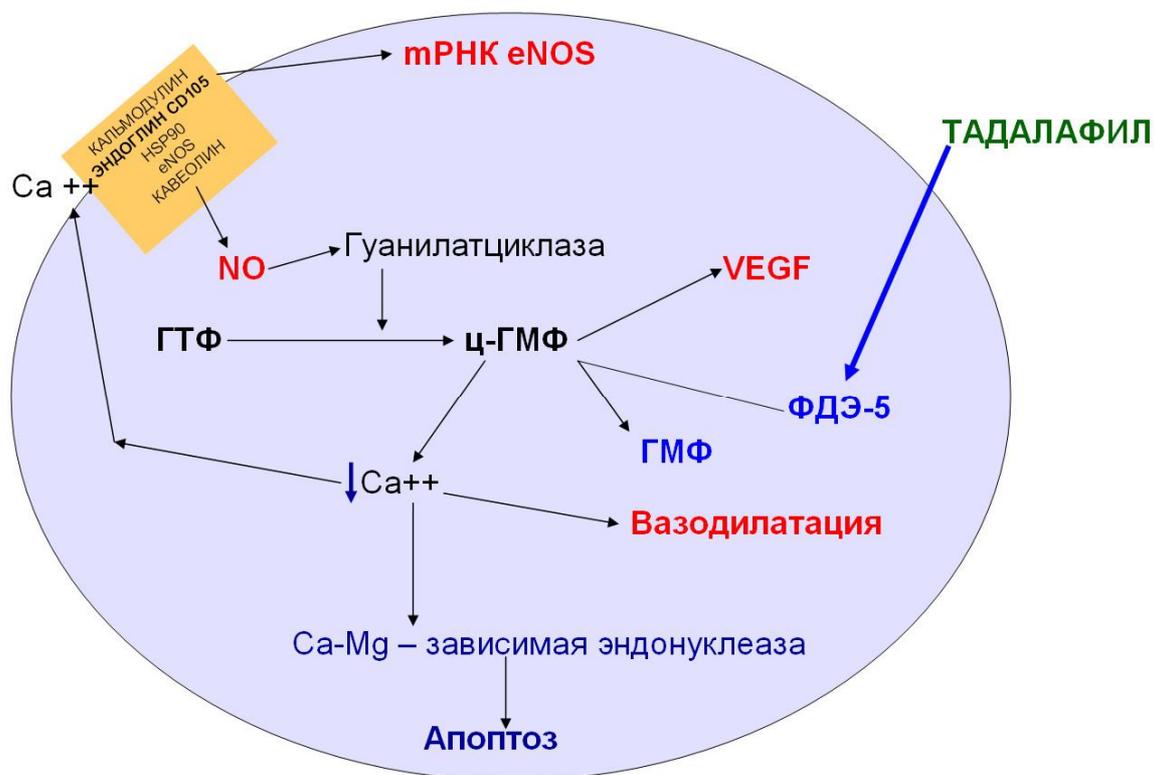


Рис. 5. Схема возможных механизмов фармакологического preconditioning с участием системы CD105/NO

Таким образом, кумулятивный эффект действия дистантного и ишемического preconditioning может быть объяснен генетическими и эпигенетическими эффектами дистантного preconditioning за счет активизации систем антигипоксической защиты, в которые входят CD105 и белки теплового шока, дополняемыми кальций-зависимой активизацией комплекса CD105-eNOS. Известно также, что ц-ГМФ является ингибитором белка p38, за счет чего увеличивается экспрессия антиапоптотического белка bcl-2 [Caretta A. et al., 2012].

Изменения экспрессии циклооксигеназы-2 (СОХ-2) в структурах почек при их ишемии и на фоне дистантного и фармакологического прекондиционирования

СОХ-2 является, в основном, индуцибельным ферментом. Однако в почках она конституционально присутствует в клетках толстого сегмента восходящей части петли Генле и в эпителиоцитах плотного пятна, в мозговом веществе СОХ-2 присутствует в интерстициальных клетках. Основной функцией фермента является обеспечение синтеза PgE₂, но конечные эффекты активности СОХ-2 в корковом и мозговом веществе почек имеют некоторые отличия (рис. 6). В мозговом веществе синтез и секреция PgE₂ обеспечивает вазодилатирующий эффект на прямые сосуды и блокирует реабсорбцию натрия [Harris R., 2000]. В корковом веществе PgE₂, синтезируемые при участии СОХ-2, также оказывают дилатирующий эффект на артериолы. Кроме этого, доказанной функцией СОХ-2 в плотных пятнах является стимуляция секреции ренина юктагломерулярными клетками артериол.

У контрольных животных экспрессия СОХ-2 выявлена в клетках плотных пятен, структурах почечных клубочков, по топографии и морфологическим признакам соответствующим подоцитам и мезангиальным клеткам, эпителиоцитах толстых сегментов петель нефронов и интерстициальных клетках мозгового вещества. В наибольшей степени реакция была выражена в интерстициальных клетках. Среднее количество почечных телец, в области которых выявлены плотные пятна с позитивной реакцией на СОХ-2 составило $9,1 \pm 1,0$ %, количество иммунопозитивных клеток в плотном пятне варьировало от 1 до 4 (в среднем $2,3 \pm 0,8$). Количество иммунопозитивных клеток в составе эпителия толстых сегментов петель нефронов на 1 мм^2 составило в среднем $10,3 \pm 1,3$.

Через сутки после моделирования ишемии в зонах сохранившейся почечной паренхимы произошло достоверное ($p < 0,05$) снижение количества почечных телец с экспрессией СОХ-2 до $2,9 \pm 1,0$ %, среднего количества иммунореактивных клеток в толстых сегментах до $1,3 \pm 1,1$ на 1 мм^2 ($p < 0,05$). Среднее количество клеток в плотных пятнах не изменилось. На 21-е сутки ишемии изменения в корковом и мозговом веществе имели различный характер. Экспрессия СОХ-2 в плотных пятнах не изменилась, оставаясь на низком уровне, среднее количество клеток от контроля. При этом количество клеток в тубулярном эпителии достоверно увеличилось в сравнении со сроком 1 сутки после моделирования ишемии-реперфузии, но не достигло контрольных значений. В мозговом веществе выявлена явная гиперплазия иммунореактивных на СОХ-2 интерстициальных клеток, которые определялись в виде крупных скоплений между канальцами. На фоне дистантного, фармакологического прекондиционирования и их комбинации через сутки эксперимента достоверных количественных изменений в экспрессии СОХ-2 в сравнении с серией ишемии-реперфузии не выявлено. Количество почечных телец с иммунореактивными плотными пятнами, среднее количество СОХ-2 позитивных эпителиоцитов и интерстициальных клеток не отлича-

лось от серии без прекоondicionирования и было достоверно ниже контрольных значений.

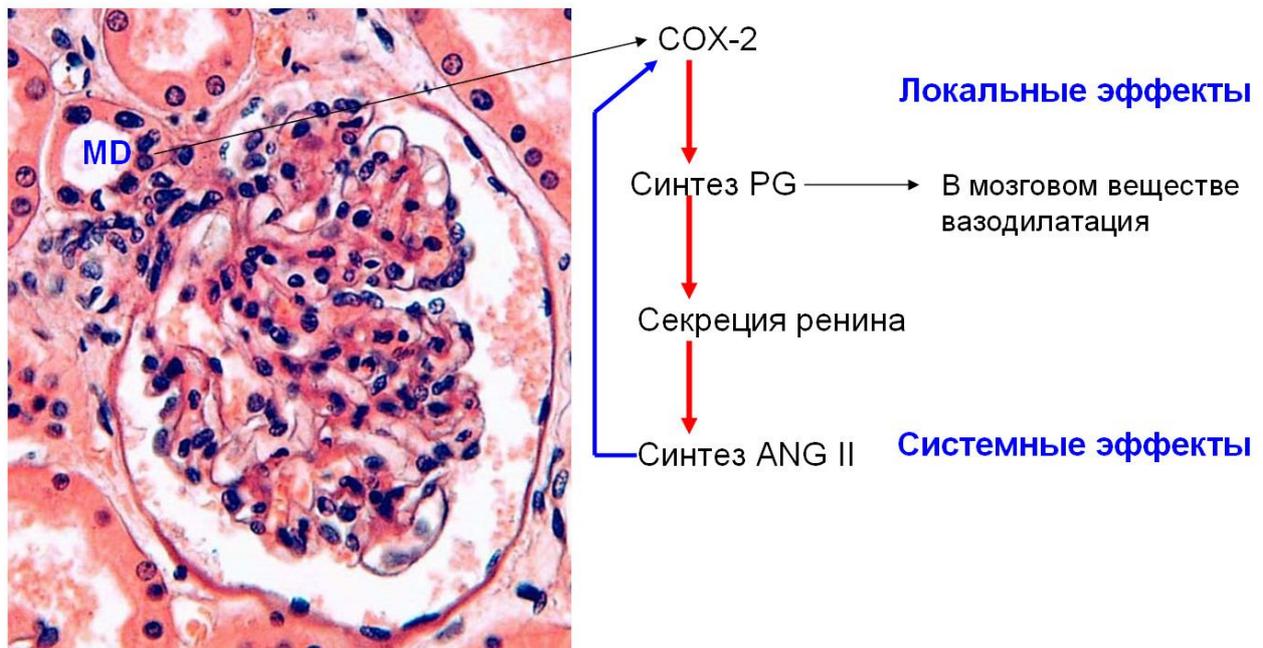


Рис. 6. Основные механизмы регуляции почечного и системного кровотока, связанные с COX-2 (MD- macula densa; плотное пятно).

Принципиально иная динамика выявлена на 21-е сутки эксперимента со значимыми отличиями фармакологического прекоondicionирования, дистантного прекоondicionирования и их комбинированного действия. Количество почечных телец с иммунореактивными плотными пятнами в серии с введением тадалафила было достоверно ($p < 0,05$) выше контрольных значений, превышая их почти в 3 раза ($28,1 \pm 1,9\%$), что было заметно и на качественном уровне при обзорном изучении микропрепаратов, достоверно ($p < 0,05$) выше было количество COX-2 позитивных клеток в тубулярном эпителии ($14,8 \pm 1,9$ на 1 мм^2), сходной с контролем была насыщенность мозгового вещества COX-2 позитивными клетками. При дистантном прекоondicionировании отдаленные эффекты проявлялись выравниванием показателей содержания COX-2 в плотных пятнах с контрольными значениями. Идентичным контролю было как количество почечных телец с иммунореактивными плотными пятнами, так и среднее количество COX-2 позитивных эпителиоцитов в них. Однако количество COX-2 позитивных клеток в тубулярном эпителии было достоверно ($p < 0,05$) выше контрольных значений ($13,3 \pm 1,8$ на 1 мм^2) и приближалось к таковому в серии с введением тадалафила. При комбинированном фармакологическом и дистантном прекоondicionировании отличий от фармакологического прекоondicionирования не выявлено по количеству почечных телец с COX-2 позитивными плотными пятнами и среднему количеству иммунореактивных клеток в них. Выше оказалось количество COX-2 позитивных клеток в тубулярном эпителии ($16,7 \pm 2,4$ на 1 мм^2), но оно достоверно не отличалось от серии с фармакологическим прекоondicionированием тадалафилом. В сериях с применением ЭПО максимальный эффект при оценке относительного количества почечных телец с

СОХ-2 позитивными плотными пятнами достигнут при сочетании ЭПО+ДИП+Тадалафил. Сочетание ЭПО+ДИП оказалось наименее эффективным.

Полученные результаты и их анализ в сопоставлении с данными литературы позволяют сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. Тадалафил в дозе 1 мг/кг, рекомбинантный эритропоэтин в дозе 50 МЕ/кг, дистантное ишемическое прекондиционирование и их сочетания оказывают протективное действие на структуры почек при ишемии-реперфузии в эксперименте.

2. Защитное действие фармакологического и дистантного прекондиционирования реализуется через NO-зависимые механизмы, эндотелиопротективный фактор CD105 (эндоглин) и СОХ-2 зависимые регуляторные механизмы, отличающиеся в раннем и позднем периодах после ишемии-реперфузии почек.

3. В первые сутки после ишемии-реперфузии почек наибольшим влиянием на синтез eNOS в эндотелии капилляров почечных клубочков обладает сочетание эритропоэтина с тадалафилом, близкий эффект имеет изолированное применение тадалафила. В отдаленном периоде (21-е сутки) более эффективен тадалафил и его сочетание с дистантным ишемическим прекондиционированием.

4. На синтез iNOS в структурах почек наибольшее протективное воздействие оказывает сочетание эритропоэтина и тадалафила с дистантным ишемическим прекондиционированием вне зависимости от срока после ишемии-реперфузии.

5. На экспрессию CD105 (эндоглина) в эндотелии капилляров почечных клубочков в отдаленном периоде в наибольшей степени влияет комбинация тадалафила с дистантным ишемическим прекондиционированием. Данный эффект коррелирует с влиянием на синтез eNOS.

6. СОХ-2 зависимые механизмы фармакологического и дистантного ишемического прекондиционирования в почках после ишемии-реперфузии реализуются в отдаленном периоде и в наибольшей степени выражены при применении тадалафила или его сочетания с дистантным ишемическим прекондиционированием.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Ингибитор фосфодиэстеразы-5 тадалафил и эритропоэтин обладают протективным действием при ишемии-реперфузии почек как при монотерапии, так и в комбинации, что определяет перспективность их клинического исследования как возможных средств профилактики и коррекции гемодинамических повреждений почечной паренхимы.

2. В раннем периоде после ишемического-реперфузионного повреждения почек большую эффективность проявляет комбинация эритропоэтина с тадалафилом, в отдаленном периоде более эффективен тадалафил или его сочетание с дистантным ишемическим прекондиционированием.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фармакологическое прекондиционирование эритропоезином при ишемии конечности / И.М. Колесник, М.В. Покровский, **И.Н. Должикова** и др. // Биомедицина. – 2011. - № 4. - 90-92.
2. Влияние дистантного и ишемического прекондиционирования на экспрессию эндоглина и эндотелиальной NO-синтазы в почках в отдаленном периоде после ишемии-реперфузии / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, **И.Н. Должикова** и др. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. – 2012. - №4 (123). – Вып. 17/1. – С. 135 – 141.
3. Экспрессия циклооксигеназы-2 (СОХ-2) в почках после ишемии-реперфузии на фоне дистантного и фармакологического прекондиционирования / М.В. Покровский, А.А. Должиков, **И.Н. Должикова** и др. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. – 2012. - №4 (123). – Вып. 17/1. – С. 142 – 150.
4. Экспрессия эндоглина и эндотелиальной NO-синтазы в почках при дистантном и фармакологическом прекондиционировании / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, **И.Н. Должикова** и др. //Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16. - №3 (63), ч. 2. – С. 185 – 188.
5. Уровень экспрессии циклооксигеназы-2 в почках после ишемии-реперфузии и на фоне дистантного и фармакологического прекондиционирования / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, **И.Н. Должикова** и др. //Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16. - №3 (63), ч. 2. – С. 188 – 191.
6. Изучение участия циклооксигеназы-2 в механизмах дистантного и фармакологического прекондиционирования почек при ишемии-реперфузии / М.В. Покровский, А.А. Должиков, **И.Н. Должикова**, К.В. Коломыцев // Матер. Международной научно-практической телеконференции «Актуальные проблемы современной науки» / Альманах научных открытий. – Томск, 2012. – Т. 1. - №3. - С. 58 – 63.
7. Фармакологический анализ влияния прямого и дистантного прекондиционирования на микроциркуляцию в печеночной паренхиме в условиях ее ишемии и реперфузии / С.А. Алехин, М.В. Покровский, **И.Н. Должикова** и др. // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – Казань, 2012. – С. 9.
8. **Должикова, И.Н.** Экспрессия NO-синтаз в структурах почек при ишемии и на фоне дистантного и фармакологического прекондиционирования / И.Н. Должикова // Матер. I Международной конференции «Морфо-клинические аспекты безопасности жизнедеятельности». - Воронеж, 2012.
9. **Должикова, И.Н.** Эндотелиальная NO-синтаза в структурах почек при ишемии и на фоне прекондиционирования / И.Н. Должикова // Материалы итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Чернозёмного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвящённой 78-летию Курского государственного медицинского университета. Курск, 2013. – С. 193-197.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДИП – дистантное ишемическое прекондиционирование

ИПК – ишемическое прекондиционирование

ФДЭ-5 – фосфодиэстераза-5

ЭПО – эритропоэтин

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

PgE2 – простагландин E2

TGF- β – трансформирующий фактор роста β

VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия