

ВЛИЯНИЕ ДИСТАНТНОГО И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ЭНДОГЛИНА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ПОЧКАХ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

И.Н. ДОЛЖИКОВА¹
М.В. ПОКРОВСКИЙ¹
Т.Г. ПОКРОВСКАЯ¹
А.А. ДОЛЖИКОВ¹
С.А. АЛЕХИН²
И.М. КОЛЕСНИК²
С.В. МЯГЧЕНКО²
В.А. ФИЛИМОНОВ²
О.И. БРАТЧИКОВ²

¹⁾ Белгородский государственный национальный исследовательский университет

²⁾ Курский государственный медицинский университет

e-mail: dolzhikov@bsu.edu.ru

В статье изложены результаты исследований влияния дистантного прекондиционирования путем создания кратковременной ишемии конечностей и фармакологического прекондиционирования ингибиторами фосфодиэстеразы-5 на экспрессию эндотелиального фактора CD105 (эндоглина) и эндотелиальной NO-синтазы в клубочковых капиллярах почек в отдаленном периоде после ишемии-реперфузии. Установлено сопоставимое протективное действие как дистантного, так и фармакологического прекондиционирования и их кумулятивный эффект. Обсуждаются возможные механизмы защитного действия прекондиционирования при ишемии-реперфузии почек.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия почек, прекондиционирование, ингибиторы фосфодиэстеразы-5, эндоглин, NO-синтаза.

Введение. Одной из самых острых проблем при патологии сердечно-сосудистой системы, нарушениях мозгового кровообращения, медицинских манипуляциях, связанных с временным выключением кровотока, является профилактика ишемических и реперфузионных повреждений органов. Одним из перспективных подходов к решению данной проблемы является разработка методов, основанных на феномене прекондиционирования – включении механизмов повышения резистентности структур органов к недостаточному кровоснабжению. Данное явление впервые открыто С. Е. Murry и соавт. [8] как повышение резистентности миокарда к повреждению путем коротких эпизодов коронарной ишемии. Спектр исследований в настоящее время вышел далеко за рамки ишемической болезни сердца. Сформировалось не менее перспективное направление фармакологического прекондиционирования, основанное на знаниях отдельных механизмов повышения резистентности органов к ишемии [1, 3, 4]. На разных моделях показано протективное действие ингибиторов фосфодиэстеразы-5 при ишемических [6, 12, 14] и токсических повреждениях миокарда [7], гипоксических повреждениях нейронов [5]. Одним из ключевых механизмов являются позитивные регуляторные эффекты в системе эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS). С этой системой тесным образом связан эндотелиальный представитель рецепторного комплекса трансформирующего фактора роста β -эндоглин (белок CD105), участвующий в нормальном эмбриогенезе сердечно-сосудистой системы, регуляции сосудистого тонуса, обладающий анти-апоптотическим действием при повреждении сосудистого эндотелия [9, 10, 11, 13, 15]. В связи с имеющимися неизученными аспектами проблемы нами была поставлена цель изучения эффектов дистантного и фармакологического прекондиционирования с применением ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила при ишемии-реперфузии почек.

Материал и методы исследования. Исследование выполнено на 60 белых лабораторных крысах-самцах массой 200-250 гр. Эксперименты проведены с соблюдением правил гуманного обращения с животными соответственно «Конвенции



по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и директивой совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран-участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях» с осуществлением хирургических вмешательств под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг массы внутрибрюшинно), выведением животных из эксперимента передозировкой хлоралгидрата внутрибрюшинным введением.

Животные распределены на 6 серий по 10 особей в каждой: контрольная (серия 1) и 5 экспериментальных. В серии 2 моделировали ишемическое-реперфузионное повреждение левой почки путем наложения лигатуры на почечную ножку с полным пережатием почечных артерии и вены на 30 минут. В серии 3 осуществляли дистантное прекондиционирование по ранее исследованной методике [2] путем наложения жгута на верхнюю треть правого бедра с пережатием до полного прекращения пульсации артерий конечности за 30 минут до моделирования ишемии-реперфузии левой почки. В серии 4 за 1 час до моделирования ишемии животным внутрибрюшинно вводили 1% раствор ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила (препарат «Сиалис» производства Eli-Lilly, Великобритания) на 10% диметилсульфоксиде (ДМСО) в дозе 1 мг/кг. В серии 5 осуществляли комбинированное дистантное и фармакологическое прекондиционирование: введение раствора сиалиса на ДМСО за 1 час и дистантное прекондиционирование за 30 минут до моделирования ишемии. В серии 6 за 30 минут до введения сиалиса животным внутрибрюшинно вводили блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкламид (5 мг/кг на ДМСО), который является доказанным ингибитором прекондиционирующих механизмов.

Животных выводили из эксперимента через 21 сутки после моделирования ишемии. Почки взвешивали с определением относительной массы (гр/гр), после чего рассекали в продольном направлении через латеральный край и фиксировали в 10% забуференном (рН=7,0) формалине иммерсионным способом в течение 24 часов. Для гистологического исследования заливали половину продольно рассеченных почек в парафин и изготавливали срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизон и по Маллори. Для иммуногистохимического исследования изготавливали мультиблоки по типу технологии «TissueMicroarray» по 15 кусочков размером 3x3 мм из участков сохраненной почечной ткани, выбранных после изучения обзорных препаратов. Иммуногистохимическое исследование выполнено с применением стандартного протокола высокотемпературной демаскировки антигенов при рН=6,0. Используются поликлональные антитела к CD105 (SpringBioscience, USA; «Биовитрум») и эндотелиальной (eNOS) NO-синтазе (CellMarque, США; «Микротесты») в рекомендованных разведениях. Для выявления реакции применена полимерная система детекции HistoFine (Япония; «Микротесты») с хромогеном диаминобензидином. Микропрепараты для последующего анализа сканировали с применением системы сканирования и архивирования изображений (MiraxDesk, Германия; «Оптэк»). Последующее изучение и морфометрию с определением относительной площади иммунореактивного вещества осуществляли на компьютерных изображениях. Зону иммунореактивности в почечных клубочках выделяли по методу «компьютерного скелетирования» с определением отношения пикселей в зоне иммунореактивности к общей площади клубочков (в пикс.). В каждой серии производили морфометрию 30 клубочков во всех зонах коркового вещества. Морфологическое исследование выполнено в лаборатории научно-образовательного центра прикладной иммуноморфологии и цитогенетики НИУ БелГУ (руководитель – проф. А.А. Должиков). Статистическую обработку выполняли с применением статистического пакета Statistica 6.0 с предварительной оценкой типа распределения признаков и уровнем статистической значимости при $p < 0,05$.

Результаты исследования. На 21-е сутки после моделирования ишемии-реперфузии в почках завершаются процессы организации очагов некрозов с развитием

нефросклероза различной степени выраженности. У интактных животных средняя относительная масса левой почки составляет 0,0049 гр/гр. На 21-е сутки во всех экспериментальных сериях масса левых почек снижена практически в равной степени: в серии 2 – 0,0035, серии 3 – 0,0031, серии 4 – 0,0032, серии 5 – 0,0030, серии 6 – 0,0032. Однако гравиметрические показатели не отражают структурные изменения, произошедшие в подвергнутых ишемии-реперфузии почках и в контрлатеральных почках. Через 3 недели после повреждения паренхима левых почек на 50-75% по результатам обзорного патогистологического исследования замещена склеротической фиброзной тканью, тогда как в сериях с различными вариантами прекоондиционирования нефросклеротические изменения имели сегментарный характер с поражением не более 50% почечной ткани. Закономерных изменений относительной массы правых почек, которая могла бы отражать компенсаторную гипертрофию, мы не выявили, но в группе 2 она была наибольшей (0,0042).

Результаты количественной оценки экспрессии CD105 и eNOS представлены в таблице. В норме оба маркера относительно равномерно экспрессируются в эндотелии клубочковых капилляров, в несколько меньшей степени в перитубулярных капиллярах. Определяется яркая экспрессия в эндотелии мелких артерий (рис. 1, 2). На 21-е сутки после ишемии-реперфузии почек как визуально, так и при количественном анализе определяется достоверное снижение экспрессии обоих маркеров в клубочковых капиллярах (рис. 1Б, 2Б) вне зависимости от топографии и диаметров почечных телец. При корреляционном анализе не выявлено достоверной зависимости между экспрессией CD105 и eNOS во всех сериях, кроме 6-й (с введением глибенкламида). В этой серии коэффициент линейной корреляции составил 0,92, коэффициент корреляции Спирмена 0,88 ($p < 0,05$). При различных вариантах прекоондиционирования выявлены в целом положительные, но отличающиеся по степени выраженности эффекты. В серии 3 с дистантным прекоондиционированием экспрессия CD105 приблизилась к значениям у интактных контрольных животных, экспрессия eNOS осталась достоверно ниже. Напротив, при фармакологическом прекоондиционировании ингибитором фосфодиэстеразы-5 сиалисом (серия 4) уровень экспрессии CD105 оказался ниже контрольных значений, а экспрессия eNOS вернулась к показателям у контрольных животных. При комбинированном прекоондиционировании (серия 5) показатели экспрессии обоих маркеров не отличались от контрольных, уровень CD105 был даже несколько выше (таблица). Введение глибенкламида, как показывают количественный анализ и визуально наблюдавшиеся изменения, в равной степени блокирует эффект комбинированного прекоондиционирования в отношении как CD105, так и eNOS.

Таблица

Количественные показатели экспрессии CD105 и eNOS в почечных клубочках

№ серии	Вид эксперимента	Удельная площадь иммунореактивного вещества (%) среднее значение ± σ	
		CD105	eNOS
1	Контрольная	15,67±1,65	24,30±3,48
2	Ишемия-реперфузия левой почки	7,23±1,73*	5,73±1,82*
3	Дистантное прекоондиционирование, ишемия-реперфузия почки	14,47±1,55	15,80±1,94*
4	Фармакологическое прекоондиционирование – ишемия-реперфузия почки	12,27±1,72*	25,63±3,09
5	Фармакологическое+дистантное прекоондиционирование – ишемия-реперфузия почки	17,8±1,47*	24,90±3,29
6	Фармакологическое+дистантное прекоондиционирование на фоне введения глибенкламида – ишемия-реперфузия почки	6,80±1,61*	7,03±1,77*

Примечание: * – $p < 0,05$ по критерию t Стьюдента.

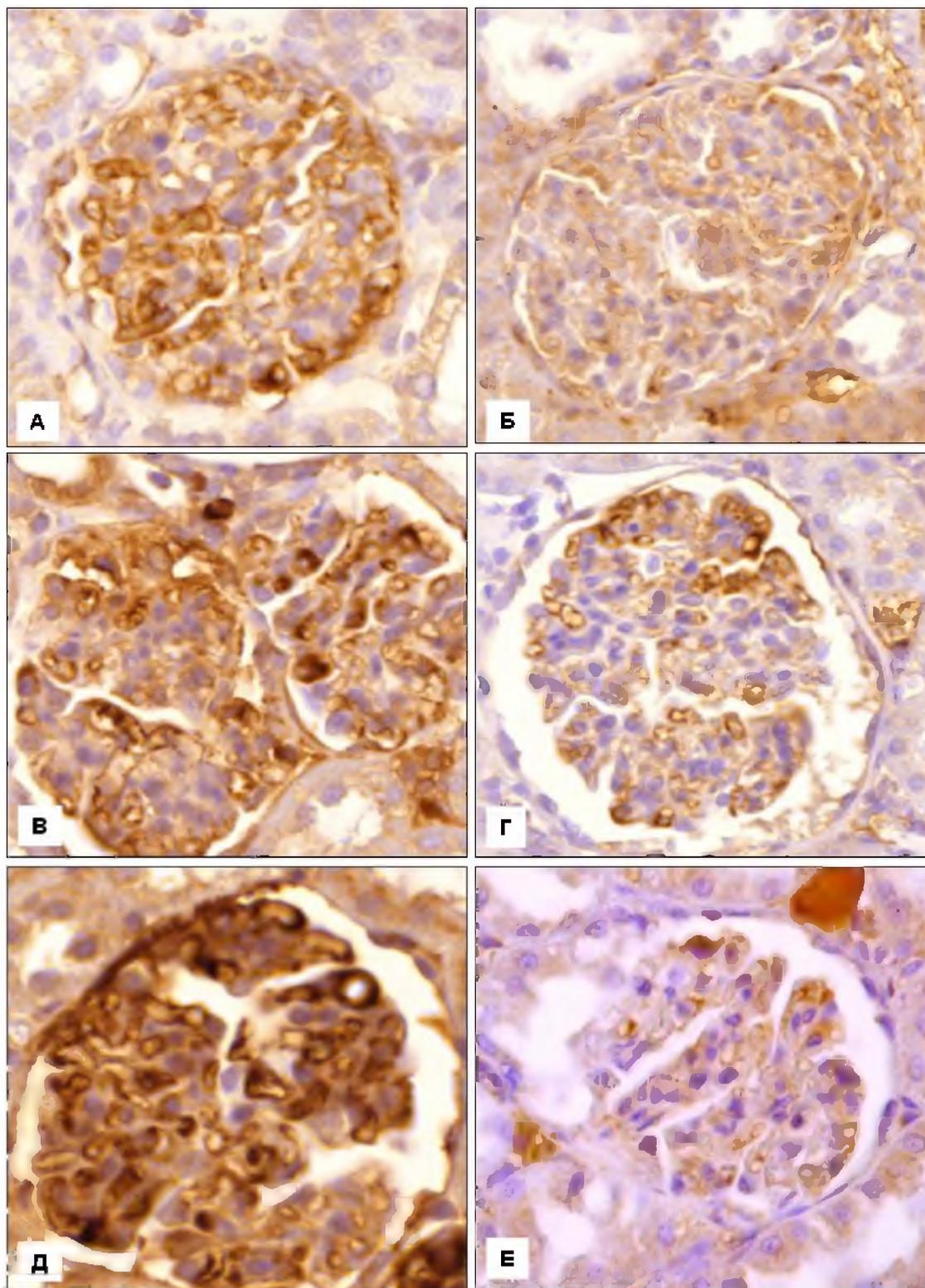


Рис. 1. Различия в экспрессии CD105 в контроле (А), на 21-е сутки после ишемии-реперфузии левой почки (Б), при дистантном прекоондиционировании (В), фармакологическом прекоондиционировании (Г), при комбинированном прекоондиционировании (Д) и на фоне введения глибенкламида (Е): равномерная экспрессия гликопротеина CD105 в эндотелии клубочковых капилляров в контроле, ее различная степень восстановления при прекоондиционировании с минимальной выраженностью в серии с фармакологическим прекоондиционированием (Г), резкое снижение экспрессии после ишемии в отдаленном периоде (Б) и на фоне введения глибенкламида (Е). Иммуногистохимические реакции. Микрофото. х 400

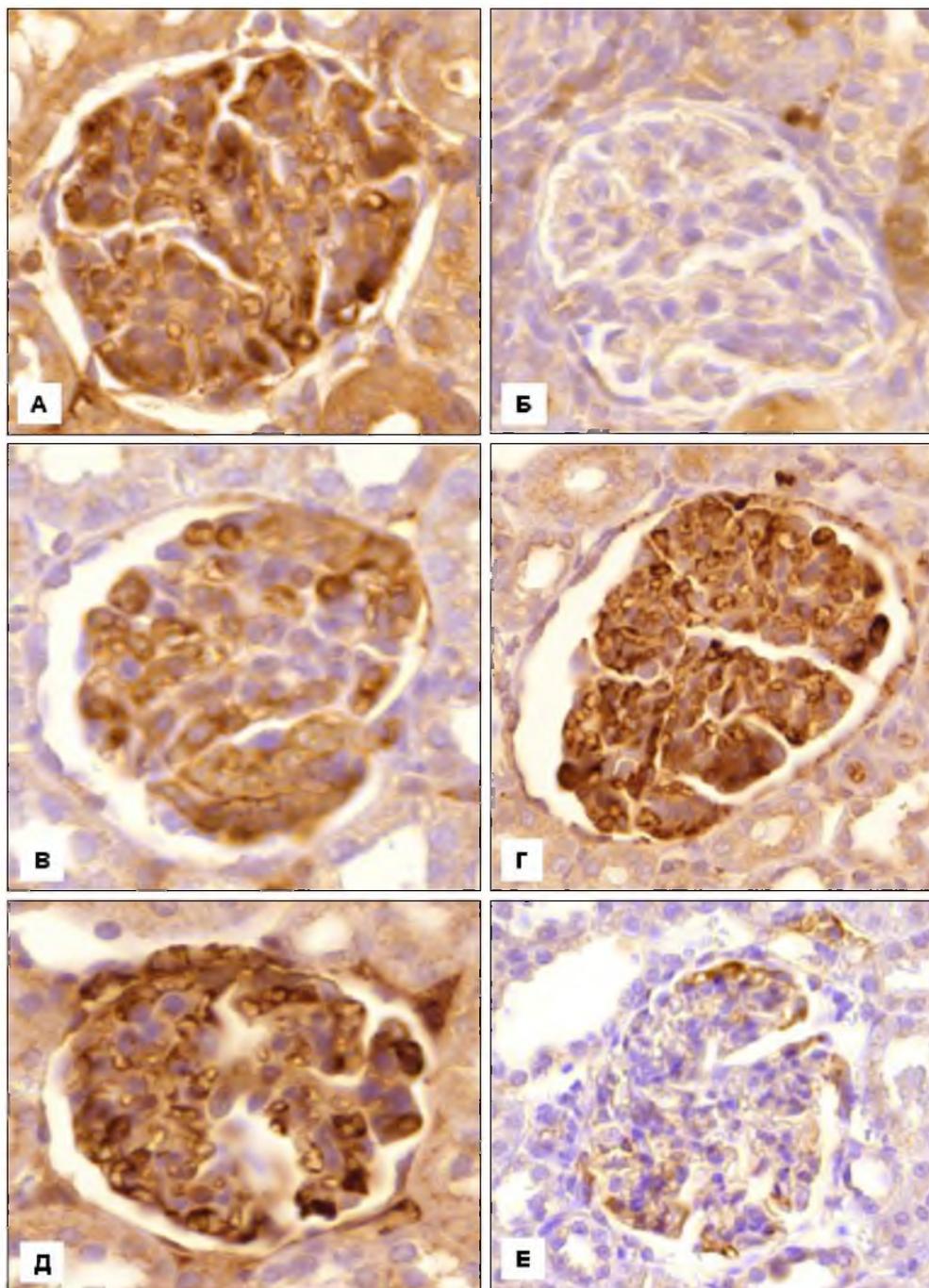


Рис. 2. Различия в экспрессии eNOS в контроле (А), на 21-е сутки после ишемии-реперфузии левой почки (Б), при дистантном прекондиционировании (В), фармакологическом прекондиционировании (Г), при комбинированном прекондиционировании (Д) и на фоне введения глибенкламида (Е): равномерная экспрессия фермента в эндотелии клубочковых капилляров в контроле, ее различная степень восстановления при прекондиционировании с минимальной выраженностью в серии с дистантным прекондиционированием (В), резкое снижение экспрессии после ишемии в отдаленном периоде (Б) и на фоне введения глибенкламида (Е). Иммуногистохимические реакции. Микрофото. х 400

Обсуждение результатов исследования. В результате проведенного исследования выявлены положительные эффекты как дистантного, так и фармакологического прекондиционирования с применением ингибитора фосфодиэстеразы-5 сиалиса при ишемии почек в эксперименте, эффект их комбинированного действия. При этом количественные показатели свидетельствуют о некоторых отличиях в эффектах дистантного и фармакологического



прекондиционирования. Прекодиционирующий эффект в целом объясняется, прежде всего, известным механизмом накопления циклического гуанозин-монофосфата (ц-ГМФ) при блокаде фосфодиэстеразы-5, с повышением уровня протеинкиназы-G, снижением содержания свободного цитоплазматического кальция и расслаблением гладких миоцитов сосудов с увеличением кровотока. С непосредственным действием ингибитора фосфодиэстеразы-5 синалиса на NO-зависимую систему активации гуанилат-циклазы и накопления ц-ГМФ можно связать выявленный нами факт, что при фармакологическом прекодиционировании восстановление экспрессии eNOS происходит в большей степени, чем экспрессии CD105. Эффекты действия CD105 на систему eNOS реализуются более сложными путями 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. Таким образом, кумулятивный эффект действия дистантного и ишемического прекодиционирования может быть объяснен генетическими и эпигенетическими эффектами дистантного прекодиционирования за счет активизации систем антигипоксической защиты, в которые входят CD105 и белки теплового шока, дополняемые кальций-зависимой активизацией комплекса CD105-eNOS. Известно также, что ц-ГМФ является ингибитором белка p38, за счет чего увеличивается экспрессия антиапоптотического белка bcl-2 [5].

Выводы:

1. Дистантное прекодиционирование путем кратковременной ишемии конечности и фармакологическое прекодиционирование ингибитором фосфодиэстеразы-5 синалисом обладает протективным эффектом на эндотелий сосудов клубочков почек, уменьшая степень повреждения в отдаленном периоде после ишемии-реперфузии, что реализуется по CD105 и eNOS зависимым путям.

2. При дистантном прекодиционировании восстановление экспрессии CD105 происходит раньше, чем eNOS; при фармакологическом прекодиционировании наблюдается обратная зависимость.

3. Дистантное и фармакологическое прекодиционирование обладают кумулятивным защитным эффектом при ишемии-реперфузии почек.

Исследование выполнено в рамках государственного задания на НИОКР (госконтракт №4.913.2011).

Литература

1. Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте / Е.Б. Артюшкова, Д.В. Пашков, М.В. Покровский и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71. – № 3. – С. 23-25.

2. Дистантное и фармакологическое прекодиционирование – новые возможности стимуляции неоваскулогенеза / И.М. Колесник, М.В. Покровский, О.С. Гудырев и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – № 6(120). – С. 56-58.

3. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 10(91). – С. 72-77.

4. Фармакологическая коррекция L-аргинином «ADMA-ENOS-ассоциированных мишеней» при экспериментальной преэклампсии / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.В. Гуреев и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – № 1. – С. 85-92.

5. Phosphodiesterase-5 inhibition abolishes neuron apoptosis induced by chronic hypoxia independently of hypoxia-inducible factor-1 α signaling / A. Caretti, P. Bianciardi, R. Ronchi et al. // J. of Experimental Biology and Medicine. – 2012. – Vol. 233. – P. 1222-1230.

6. Das, A. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis / A. Das, L. Xi, C. Kukreja // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280, № 13. – P. 12944-12955.

7. Phosphodiesterase 5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity / P.W. Fisher, F.N. Salloum, A. Das et al. // Circulation. – 2005. – Vol. 111. – P. 1601-1610.



8. Murry, C.E. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium / C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer // *Circulation*. – 1986. – Vol. 14. – P. 1124-1136.
9. TGF- β receptor function in the endothelium / F. Lebrin, M. Deckers, P. Bertolino, P. Dijke // *Cardiovasc. Research*. – 2005. – Vol. 65. – P. 599-608.
10. CD 105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells / C. Li, P. Issa, P. Kumar et al. // *Journal of Cell Science*. – 2003. – Vol. 116. – P. 2677-2685.
11. Lopez-Novoa, J. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system / J. Lopez-Novoa, C. Bernabeu // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 299. – P. 959-974.
12. Reffelmann, T. Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? / T. Reffelmann, R. Kloner // *Cardiovasc. Research*. – 2009. – Vol. 83. – P. 204-212.
13. Endoglin Expression is Regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- β pathways / T. Sanchez-Elser, L. Botella, B. Velasco et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – P. 43799-43808.
14. Phosphodiesterase-5 inhibitor, Tadalafil, protects against myocardial ischemia/reperfusion through protein-kinase G dependent generation of hydrogen sulfide / F.N. Salloum, V.Q. Chau, N.N. Hoke et al. // *Circulation*. – 2009. – Vol. 120. – P. 31-36.
15. Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells / Y. Zhu, Y. Sun, L. Xie et al. // *Journal of the American Heart Association*. – 2003. – Vol. 34. – P. 2483-2488.

INFLUENCE OF DISTANT AND PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING ON EXPRESSION OF ENDOGLIN AND ENDOTHELIAL NO-SYNTASE IN KIDNEYS IN THE LATE PERIOD AFTER ISCHEMIA-REPERFUSION

**I.N. DOLZHIKOVA¹, M.V. POKROVSKY¹
T.G. POKROVSKAYA¹, A.A. DOLZHIKOV¹
S.A. ALEHIN², I.M. KOLESNIK²
S.V. MYAGCHENKO²
V.A. FILIMONOV²
O.I. BRATCHIKOV²**

¹⁾ *Belgorod National Research University*

²⁾ *Kursk State Medical University*

e-mail: dolzhikov@bsu.edu.ru

In the paper the data about influence of the distant and pharmacological preconditioning by phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil on the expression of endothelial factor CD105 (endoglin) and endothelial NO-synthase in glomerular capillaries of the kidneys in the late period after ischemia-reperfusion have been presented. As distant as pharmacological preconditioning protect kidneys from the ischemic injury, and cumulative effect is stronger. The possible mechanisms of defensive effects in ischemia-reperfusion of the kidneys are discussed.

Key words: ischemia-reperfusion of kidneys, preconditioning, phosphodiesterase-5 inhibitor, endoglin, NO-synthase.