

EXPRESSION OF ENDOGLIN AND ENDOTHELIAL NO-SYNTHASE IN THE KIDNEYS WITH DISTANT AND PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING

M.V. Pokrovsky, V.I. Kochkarov, T.G. Pokrovskaya, O.I. Bratchikov, I.N. Dolzhikova, S.V. Myagchenko, V.A. Filimonov

Abstract. The paper sets forth the results of investigations of the influence of distant preconditioning via creating short-term ischemia of extremities and pharmacological preconditioning by means of the inhibitor of phosphodiesterase-5 on the expression of endothelial factor CD105 (endoglin) and endothelial NO-synthase in glomerular capillaries of the kidneys during a remote period following ischemia-reperfusion. A comparable protective action of both distant and pharmacological preconditioning and their cumulative effect have been established. Possible mechanisms of a protective action of preconditioning in renal ischemia-reperfusion are discussed.

Key words: renal ischemia-reperfusion, endoglin, NO synthase.

State National Research University (Belgorod, Russian Federation)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 2. – P. 185-188

Надійшла до редакції 10.09.2012 року

© М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская, О.И. Братчиков, И.Н. Должикова, С.В. Мягченко, В.А. Филимонов, 2012

УДК 615.254-08-039.71

М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская, О.И. Братчиков, И.Н. Должикова, С.В. Мягченко, В.А. Филимонов

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ-2 В ПОЧКАХ ПОСЛЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ И НА ФОНЕ ДИСТАНТНОГО И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Резюме. В статье изложены результаты исследований влияния дистантного и фармакологического preconditionирования ингибитором фосфодиэстеразы-5 салисом на экспрессию циклооксигеназы-2 (СОХ-2) в почках при ишемии-реперфузии. Установлено выраженное влияние фармакологического preconditionирования на экспрессию СОХ-2 в почках, превышающее

эффект дистантного preconditionирования. Обсуждены возможные эффекты preconditionирующих влияний и роль СОХ-2.

Ключевые слова: ишемия почек, preconditionирование, фосфодиэстераза-5, циклооксигеназа-2.

Введение. Явление preconditionирования, открытое и впервые изученное С. Е. Murry и соавт. [7] как повышение резистентности миокарда к повреждению путем коротких эпизодов коронарной ишемии, в настоящее время является одним из перспективных в теоретическом и прикладном отношении направлений исследований в фармакологии. В результате изучения на различных моделях ишемического повреждения и влияния на него дистантного и фармакологического preconditionирования [1, 2, 3] выявлены многие механизмы preconditionирующих влияний. Одним из доказанных в ряде моделей preconditionирующим фармакологическим агентом являются ингибиторы фосфодиэстеразы-5 (ФДЭ-5). Их эффективность продемонстрирована при ишемических [5, 8, 9] и токсических повреждениях миокарда [6], гипоксических повреждениях нейронов [7]. Основной эффект ингибиторов ФДЭ-5

связан с увеличением накопления циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ).

Цель исследования. Изучить влияние дистантного и фармакологического preconditionирования с применением ингибитора ФДЭ-5 на экспрессию СОХ-2 в структурах почек в раннем и позднем периодах после моделирования ишемии-реперфузии.

Материал и методы. Исследование выполнено на 90 белых лабораторных крысах-самцах массой 200-250 г. Животные распределены на девять серий по десять особей в каждой: контрольная (серия 1) и восемь экспериментальных.

Животных выводили из эксперимента через 21 сутки после моделирования ишемии. Для иммуногистохимического исследования изготавливали мультиблоки по типу технологии «TissueMicroarray» по 15 кусочков размером 3x3 мм из участков сохраненной почечной ткани.

© М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская, О.И. Братчиков, И.Н. Должикова, С.В. Мягченко, В.А. Филимонов, 2012

Использованы кроличьи моноклональные антитела к СОХ-2 (клон SP-21; CellMarque, США; «Микротесты»), реагирующие с антигенами тканей крыс, в рекомендованном разведении 1:500.

Результаты исследования и их обсуждение. У контрольных животных экспрессия СОХ-2 выявлена в клетках плотных пятен (рис. 1А), структурах почечных клубочков, по топографии и морфологическим признакам соответствующим подоцитам и мезангиальным клеткам, эпителиоцитах толстых сегментов петель нефронов и интерстициальных клетках мозгового вещества (рис. 1Б). 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-реперфузии (серия 2) в зонах сохранившейся почечной паренхимы произошло достоверное 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 . В мозговом веществе выявлена явная гиперплазия иммунореактивных на СОХ-2 интерстициальных клеток, которые определялись в виде крупных скоплений между канальцами (рис. 1Д). В корковом веществе выражены диффузные склеротические изменения, дилатация канальцев и обильное количество белковых цилиндров, которые давали неспецифическую реакцию в иммуногистохимических препаратах (рис. 1Г).

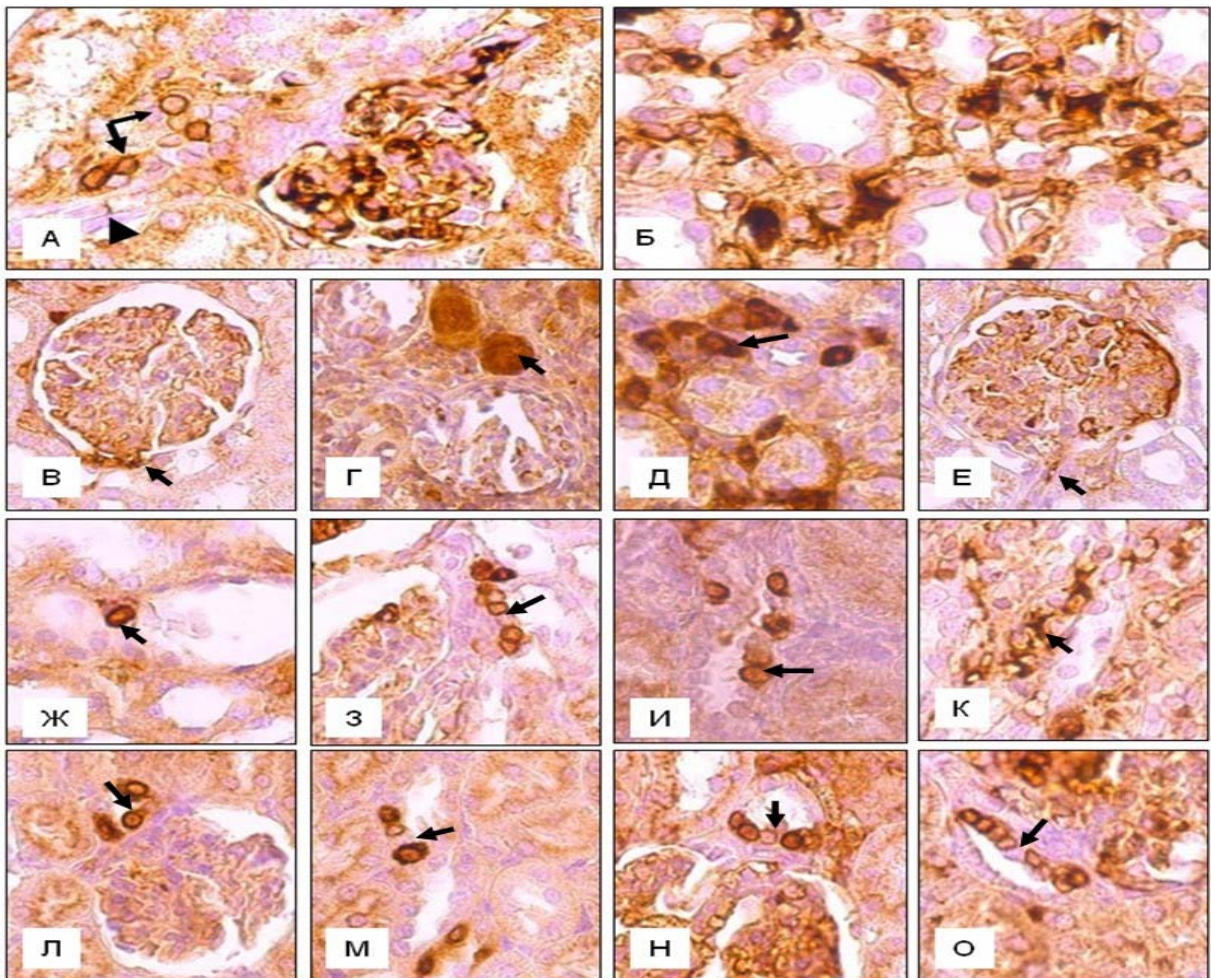


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование экспрессии СОХ-2 в контроле (А, Б), через 1 сутки (В), 21 сутки (Г, Д) после ишемии-реперфузии, через 1 (Е, Ж), 21 сутки (З, И, К) на фоне введения сиалиса, через 21 сутки (Л, М) на фоне дистантного прекоондиционирования, 21 сутки (Н, О) после комбинированного прекоондиционирования. А – экспрессия СОХ-2 в небольшом количестве клеток плотного пятна (двойная стрелка), мезангии и подоцитах почечного клубочка, кончиком стрелки указана приносящая артериола; Б – выраженная равномерная экспрессия СОХ-2 в интерстициальных клетках мозгового вещества; В, Г, Е – резкое снижение экспрессии СОХ-2 в плотных пятнах; Д – очаг гиперплазии интерстициальных клеток на 21-е сутки после ишемии-реперфузии; З, И, К – повышение количества СОХ-2 позитивных эпителиоцитов в плотных пятнах (З), тубулярном эпителии (И), высокое содержание фермента в интерстициальных клетках (К) на 21-е сутки на фоне фармакологического прекоондиционирования; Л, М – идентичный контрольному уровень экспрессии СОХ-2 при дистантном прекоондиционировании; Н, О – картина экспрессии СОХ-2 при комбинированном прекоондиционировании идентична таковой при введении сиалиса

Выводы

1. Введение ингибитора фосфодиэстеразы-5 сиалиса в эксперименте оказывает preconditionирующий защитный эффект на систему синтеза циклооксигеназы-2 в плотных пятнах и эпителии толстых сегментов петель нефронов в отдаленном сроке после ишемии-реперфузии в почках.

2. При дистантном preconditionировании в отдаленном сроке также наблюдается эффект нормализации экспрессии циклооксигеназы-2, которая становится идентичной интактным контрольным животным.

3. Действие ингибирования фосфодиэстеразы-5 достоверно более выражено, чем дистантного preconditionирования; комбинированное preconditionирование оказывает эффект, эквивалентный изолированному фармакологическому preconditionированию введением ингибитора фосфодиэстеразы-5 сиалиса.

Литература

1. Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте / Е.Б. Артюшкова, Д.В. Пашков, М.В. Покровский [и др.] // Эксперим. и клин. фармакол. – 2008. – Т. 71, № 3. – С. 23-25.
2. 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.] // Кубан. науч. мед. вестник. – 2006. – № 10 (91). – С. 72-77.
3. Фармакологическая коррекция L-аргинином «ADMA-ENOS-ассоциированных мишеней» при экспериментальной преэклампсии /

М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.В. Гуреев [и др.] // Кубан. науч. мед. вестник. – 2010. – № 1. – С. 85-92.

4. 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.
5. Das A. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis / A. Das, L. Xi, C. Kukreja // The J. of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280, №13. – P. 12944-12955.
6. 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.
7. 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.
8. Reffelmann, T. Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? / T. Reffelmann, R. Kloner // Cardiovasc. Research. – 2009. – Vol. 83. – P. 204-212.
9. 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.

РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ-2 У НИРКАХ ПІСЛЯ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ І НА ТЛІ ДИСТАНТНОГО І ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ПРЕКОНДИЦІОНУВАННЯ

*М.В. Покровський, В.І. Кочкаров, Т.Г. Покровська, О.І. Братчиков,
І.М. Должикова, С.В. Мязченко, В.А. Філімонов*

Резюме. У статті викладені результати досліджень впливу дистантного і фармакологічного preconditionування інгібітором фосфодіестерази-5 сіалісом на експресію циклооксигенази-2 (COX-2) у нирках при ішемії-реперфузії. Встановлено виражений вплив фармакологічного preconditionування на експресію COX-2 у нирках, що перевищує ефект дистантного preconditionування. Обговорено можливі ефекти preconditionувальних впливів і роль COX-2.

Ключові слова: ішемія нирок, preconditionування, фосфодіестераза-5, циклооксигеназа-2.

THE LEVEL OF EXPRESSION OF CYCLOOXYGENASE-2 IN THE KIDNEYS AFTER ISCHEMIA-REPERFUSION AND AGAINST A BACKGROUND OF DISTANT AND PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING

*M.V. Pokrovsky, V.I. Kochkarov, T.G. Pokrovskaya, O.I. Bratchikov,
I.N. Dolzhikova, S.V. Myagchenko, V.A. Filimonov*

Abstract. The paper states the results of investigating the influence of distant pharmacological preconditioning by means of the inhibitor – phosphodiesterase-5 tadalafil on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the kidneys in

ischemia-reperfusion. A marked influence of pharmacological preconditioning on the COX-2 expression in the kidneys, exceeding the effect of distant preconditioning has been established. Possible effects of preconditioning effects and the role of COX-2 have been discussed.

Key words: renal ischemia, preconditioning, phosphodiesterase-5, cyclooxygenase-2.

State National Research University (Belgorod, Russian Federation)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 2. – P. 188-191

Надійшла до редакції 10.09.2012 року

© М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская, О.И. Братчиков,

УДК 616.61-092:616-008.92-019

Ю.Є. Роговий, О.В. Колеснік

ВПЛИВ ВОДИ ВІД'ЄМНОГО ОКИСНО-ВІДНОВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ НА ФУНКЦІЮ НИРОК У ІНТАКТНИХ ЩУРІВ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна

Резюме. У досліджах на 40 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях за умов навантаження водою від'ємного окисно-відновного потенціалу ($-232,0 \pm 25,12$ мВ) порівняно з індукованим діурезом звичайною водогінною водою (окисно-відновний потенціал $88,7 \pm 18,35$ мВ) встановлено гальмування клубочкової фільтрації, фільтраційної фракції, абсолютної і прокси-

мальної реабсорбції іонів натрію, рН сечі. Дані зміни пояснюються підвищенням активності механізму базального тону судин нирок та покращанням виділення кислот канальцями нефрону.

Ключові слова: водний діурез, функція нирок, вода від'ємного окисно-відновного потенціалу.

Вступ. Відомо, що зниження окисно-відновного потенціалу води на кожні 59 мВ призводить до збільшення кількості електронів у 10 разів. При зниженні окисно-відновного потенціалу води на 118 мВ, кількість електронів зростає у 100 разів, а на 177 мВ – у 1000 разів [4] і т.д. Зростання кількості електронів може сприяти покращанню синтезу макроергів АТФ і, відповідно, позитивно впливати на функцію нирок [1]. Закономірно постає питання про те, що навантаження організму водою від'ємного окисно-відновного потенціалу повинно бути енергетично вигідним для клітин, у тому числі для нефроцитів, головним енергозалежним процесом яких є реабсорбція іонів натрію [2]. Водночас до сьогоднішнього дня не з'ясовано питання щодо впливу води від'ємного окисно-відновного потенціалу на функцію нирок в інтактних тварин.

Мета дослідження. З'ясувати вплив навантаження водою від'ємного окисно-відновного потенціалу на показники функції нирок порівняно до індукованого діурезу звичайною водогінною водою.

Матеріал і методи. В експериментах на 40 самцях білих-нелінійних щурів масою 0,16-0,18 кг досліджували вплив навантаження водою від'ємного окисно-відновного потенціалу, яку отримували шляхом обробки водогінної води препаратом мікрогідрин. Функцію нирок вивчали за умов водного індукованого діурезу та навантаження водою від'ємного окисно-відновного поте-

нціалу, для чого досліджували рідини в кількості 5 % від маси тіла за допомогою металевого зонда вводили щурам у шлунок із подальшим збором сечі впродовж 2 годин. У сечі визначали концентрації креатиніну за реакцією з пікриновою кислотою. Концентрації іонів натрію досліджували методом фотометрії полум'я на ФПЛ-1. Концентрацію білка в сечі оцінювали за методом із сульфосаліциловою кислотою, визначали рН сечі. Розраховували: екскрецію іонів натрію, білка, клубочкову фільтрацію, фільтраційну фракцію іонів натрію, його абсолютну, відносну, проксимальну та дистальну реабсорбцію [1, 2]. Окисно-відновний потенціал води та сечі визначали відомим методом [4].

Статистичну обробку отриманих даних проводили на комп'ютері за допомогою програм "Statgrafics", "Statistica" та "Excel 2003". Всі експерименти проведені з дотриманням правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин (1977 р.) та положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях (від 18 березня 1986 року).

Результати досліджень та їх обговорення. Величина окисно-відновного потенціалу сечі за умов індукованого діурезу, проведеного звичайною водогінною водою характеризувалася тільки тенденцією до росту, а за умов досліду окисно-відновний потенціал сечі набував позитивних значень, на відміну від негативних цифр води,