

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 615.03

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-1-167-172

**ИЗУЧЕНИЕ РЕНОПРОТЕКТИВНОГО ВЛИЯНИЯ КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДА,
ИМИТИРУЮЩЕГО α -СПИРАЛЬ В ЭРИТРОПОЭТИНА, И ИНФЛИКСИМАБА
В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРОГО ИШЕМИЧЕСКИ-
РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

***А.С. Нетребенко¹, В.В. Гуреев¹, М.В. Покровский¹, В.И. Якушев¹,
Е.В. Авдеева², А.В. Гуреева², М.А. Затолокина²***

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород Россия

² Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Владимир Владимирович Гуреев, produmen@yandex.ru

Резюме. Введение. Поиск лекарственных средств, способных предотвратить развитие острого почечного повреждения (ОПП), является одной из основных задач современной фармакологии. Материалы и методы. Эксперимент проводился на 50 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 г. Животным вводили пептид, имитирующий α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), и инфликсимаб. Результаты. Комбинированное применение пептида, имитирующего α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), и инфликсимаба при ишемически-реперфузионном повреждении почек превосходит по эффективности нефропротективные свойства вышеуказанных веществ при их селективном введении. Выводы. Согласно результатам проведенного исследования можно говорить о перспективности комбинированного применения пептида, имитирующего α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), и инфликсимаба с целью коррекции ишемически-реперфузионных повреждений почек.

Ключевые слова: пептид, имитирующий α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), инфликсимаб, ишемически-реперфузионное повреждение почек, крысы, микроциркуляция

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

**RESEARCH OF THE RENOPROTECTIVE EFFECT OF A COMBINATION
OF THE PEPTIDE MIMICKING THE SPATIAL STRUCTURE
OF THE B ERYTHROPOIETIN CHAIN AND INFlixIMAB
IN A RENAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY MODEL**

***A.S. Netrebenko¹, V.V. Gureev¹, M.V. Pokrovskii¹, V.I. Yakushev¹,
E.V. Avdeeva², A.V. Gureeva², M.A. Zatulokina²***

¹ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

² Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Corresponding author: Vladimir V. Gureev, produmen@yandex.ru

Resume. Purpose. The search for drugs that can prevent the development of acute renal injury (ARI) is one of the main tasks of modern pharmacology. Methods. The experiment was carried out in 50 white Wistar male laboratory rats weighing 280–320 g. The animals were injected with a peptide mimicking the spatial structure of the B erythropoietin chain (pHBSP) and infliximab. Results. The combined use of a peptide mimicking the spatial structure of the B erythropoietin chain (pHBSP) and infliximab before renal ischemia-reperfusion injury is more effective than the nephroprotective properties of the above substances when it is selectively used. Conclusion. According to the results of the study, we can talk about the prospects

of the combined use of the peptide mimicking the spatial structure of the B erythropoietin chain (pHBSP) and infliximab in order to correct renal ischemia-reperfusion injury.

Keywords: pHBSP, infliximab, renal ischemia-reperfusion injury, rat, microcirculation

Поиск новых лекарственных препаратов, обладающих цитопротективной и противоишемической активностью, является актуальной задачей современной фармакологии. Эти свойства необходимы для защиты почечной паренхимы при органосохранных операциях на почке, наиболее часто проводимых с пережатием почечных сосудов. Только совместное использование современных высокоэффективных препаратов и опыт оперирующего хирурга могут предотвратить развитие острого почечного повреждения (ОПП), обусловленного тепловой ишемией.

Одним из наиболее перспективных методов нефропротекции при развитии ишемически-реперфузионной травмы почки является фармакологическое preconditionирование, обусловленное действием эритропоэтина и его производных. Согласно клиническим исследованиям, лечение высокими дозами эритропоэтина привело к увеличению риска тромботических событий в первый год после трансплантации (эритропоэтин 24,4 % по сравнению с плацебо 6,4 %). В современной фармакологии разработаны производные эритропоэтина, которые активируют только цитопротективное действие и не влияют на эритропоэз. Пептид, имитирующий α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), – это синтетический пептид, который селективно связывается с гетеродимерным рецептором. Не менее важную роль в патофизиологии повреждения при ишемии-реперфузии почек играют провоспалительные цитокины, включая фактор некроза опухоли альфа (TNF- α). Накопление свободных радикалов в тканях приводит к бурному высвобождению и активации тканевых ферментов, таких как миелопероксидаза, что, в свою очередь, запускает каскад патологических реакций. В фармакологии известны препараты, снижающие активность фактора некроза опухоли-альфа. Одним из них является инфликсимаб. Он обладает высокой аффинностью к TNF- α , а также блокирует ряд провоспалительных интерлейкинов: интерлейкин-1, интерлейкин-6, интерлейкин-8, моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, а также другие активные факторы, участвующие в процессах воспаления и деструкции в тканях. Таким образом, данное исследование было предпринято, чтобы выяснить, превосходит ли комбинированное применение пептида, имитирующего α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), и инфликсимаба при ишемически-реперфузионном повреждении почек по эффективности

нефропротективных свойств вышеуказанных веществ при их селективном введении.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать ренопротективные эффекты комбинации пептида, имитирующего α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), и инфликсимаба при ишемически-реперфузионном повреждении почек.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе Центра доклинических и клинических исследований ФГАОУ ВО НИУ БелГУ в строгом соответствии с нормативно-правовыми актами и руководствами, регламентирующими проведение экспериментальных исследований в Российской Федерации. Этические нормы обращения с лабораторными животными соответствовали «Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22Sep2010 on the protection of animals used for scientific purposes».

Эксперимент проводился на 50 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 г. Животные были разделены на 5 групп, по 10 особей в каждой.

1. Ложнооперированные животные.
2. Ишемия/реперфузия [I/R(контроль)].
3. Ишемия/реперфузия + пептид, имитирующий α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), 25 мкг/кг внутривентриально за 30 минут до моделирования ишемии.
4. Ишемия/реперфузия + инфликсимаб [Remicade®, MSDIreland (Brinney)] 10 мг/кг внутривентриально за 1 час до ишемии.
5. Ишемия/реперфузия + пептид, имитирующий α -спираль В эритропоэтина (pHBSP), 25 мкг/кг внутривентриально за 30 минут до ишемии + инфликсимаб [Remicade®, MSDIreland (Brinney)] 10 мг/кг внутривентриально за 1 час до ишемии.

Под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг внутривентриально) производилось наложение атравматичных сосудистых зажимов на левую почечную ножку на 40 минут. Нефрэктомия справа.

С помощью аппаратно-программного комплекса MP100 (Biopac System, Inc., США) с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и поверхностного датчика TSD143 производили измерение микроциркуляции до ишемии, через 5 мин после реперфузии и через 24 ч после реперфузии.

Регистрация и обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения AscKnowledge версии 3.8.1.

Клиренс эндогенного креатинина (скорость клубочковой фильтрации) рассчитывался по следующей формуле:

$$GFR = \frac{\text{Urine creatinine}(\mu\text{mol/l}) \times \text{Urine volume}(\text{ml})}{\text{Serum creatinine}(\mu\text{mol/l}) \times \text{Collection time}(\text{min})}$$

Фракционная экскреция натрия (FEna) рассчитывалась следующим способом:

$$F_{\text{Ena}} = \frac{\text{Urine sodium} \times \text{Serum creatinine} \times 100\%}{\text{Serum sodium} \times \text{Urine creatinine}}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Профилактическое введение рНВСП и инфликсимаба в монорежиме до ишемии приводило к повышению скорости клубочковой фильтрации до $(0,29 \pm 0,01)$ и $(0,22 \pm 0,01)$ мл/мин соответственно. Более выраженное влияние на уровень скорости клубочковой фильтрации (СКФ) отмечено при совместном применении рНВСП и инфликсимаба; СКФ составила $(0,42 \pm 0,02)$ мл/мин (рис. 1).

Оценивая функциональное состояние почечных канальцев, введение рНВСП в дозе 25 мкг/кг и инфликсимаба в дозе 10 мг/кг до ишемии оказало протективный эффект на состояние почечных канальцев. Фракционная экскреция натрия составила $(1,25 \pm 0,05)$ и $(1,15 \pm 0,05)$ % соответственно.

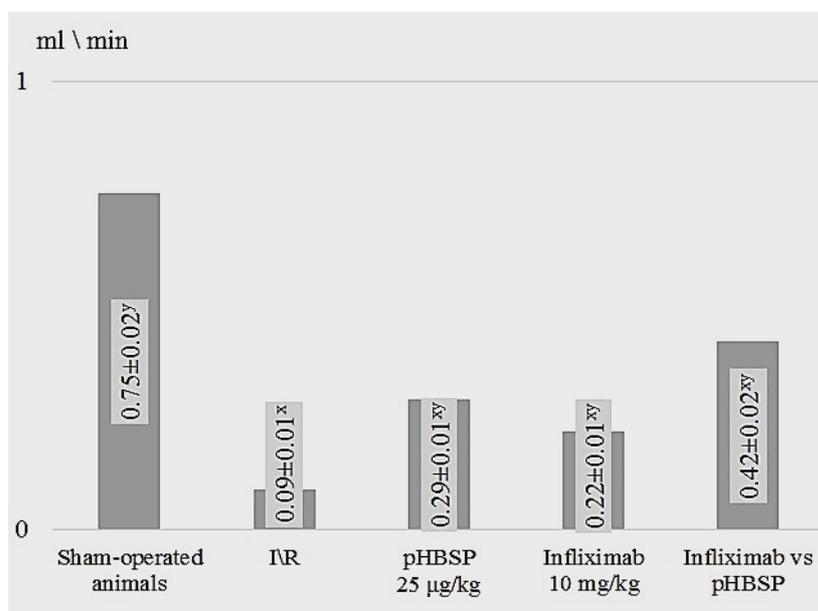


Рис. 1. Значения скорости клубочковой фильтрации через 24 часа реперфузии при моделировании ишемии-реперфузии почек

На фоне комбинированного применения рНВСП и инфликсимаба также отмечено значительное снижение фракционной экскреции натрия, превосходящее эффект от их применения в монорежиме. Фракционная экскреция натрия в этой группе составила $(0,62 \pm 0,05)$ % (рис. 2).

При измерении уровня микроциркуляции было установлено, что применение рНВСП в дозе 25 мкг/кг, (771 ± 27) PU, и инфликсимаба в дозе 10 мг/кг, (743 ± 34) PU, оказывало положительный эффект на уровень микроциркуляции в почках у оперированных животных через 24 часа после реперфузии.

Применение комбинации рНВСП + инфликсимаб наиболее эффективно способствовало восстановле-

нию уровня микроциркуляции при ишемии/реперфузии, (802 ± 100) PU, что по результатам наиболее приближено к показателю микроциркуляции в группе ложнооперированных животных, (881 ± 38) PU.

Способность рНВСП селективно связываться с гетеродимерным рецептором эритропоетина обуславливает активацию плейотропных эффектов: противоишемического, антиапоптотического, противовоспалительного [1, 2, 3, 4].

Это способствует цитопротективным эффектам в паренхиме почки, снижению образованию гуморальных факторов, приводящих к клубочковой и канальцевой дисфункции и активации eNOS [5, 6].

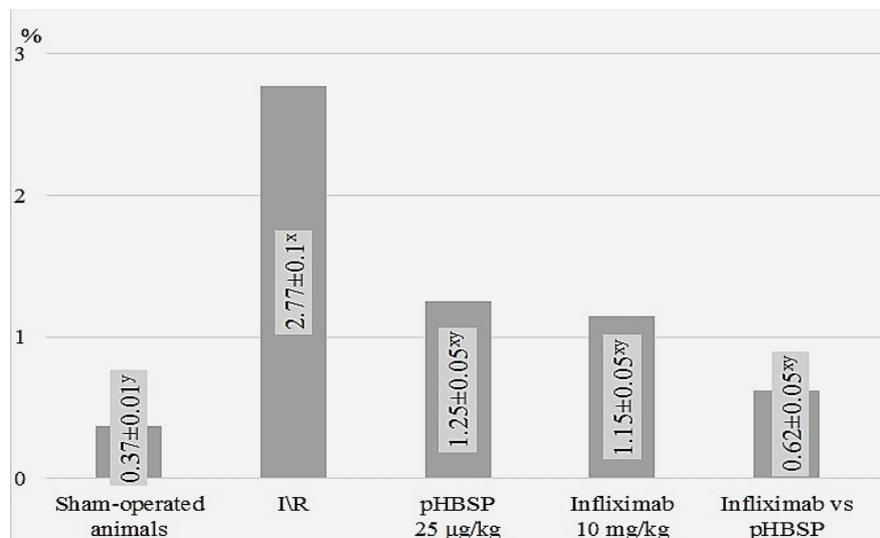


Рис. 2. Значения фракционной экскреции натрия через 24 ч реперфузии при моделировании ишемии-реперфузии почек

Нефропротективные эффекты инфликсимаба можно объяснить его высокой аффинностью к фактору некроза опухоли альфа, а также его способностью снижать концентрацию (связывает и ингибирует синтез) IL-1, IL-6, IL-8, моноцитарного хемоаттрактантного белка-1, оксида азота, металлопротеиназ (коллагеназа, стромелизин) и других индукторов воспаления и тканевой деструкции [7]. Это, в свою очередь, приводит к нормализации функциональной активности почек при ишемически-реперфузионной травме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Профилактика ишемических и реперфузионных повреждений почек комбинацией пептида, имитирующего α -спираль В эритропоэтина, в дозе 25 мкг/кг и инфликсимаба в дозе 10 мг/кг статистически достоверно превосходит по эффективности режимы монотерапии данным препаратами, что подтверждается улучшением фильтрационной способности почек и восстановлением уровня микроциркуляции в почечной паренхиме. Высокая эффективность сочетанного применения указанных веществ может быть объяснена воздействием их на разные патогенетические звенья ишемических и реперфузионных повреждений почек с активацией механизмов фармакологического preconditionирования и нивелированием каскада патологических реакций, обусловленных воспалением и тканевой деструкцией.

Таким образом, комбинированная терапия пептидом, имитирующим α -спираль В эритропоэтина,

и инфликсимабом является наиболее перспективной в плане нефропротекции при моделировании острого ишемически-реперфузионного повреждения почек в эксперименте.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Применение негематопэтических пептидов производных эритропоэтина при атеропротекции и лечении сердечно-сосудистых заболеваний / В.С. Беляева, Ю.В. Степенко, И.И. Любимов [и др.] // Результаты исследований в области фармакологии. 2020. № 6 (3). С. 75–86.
2. Доклиническое исследование инновационных пептидов, имитирующих третичную структуру α -спирали В эритропоэтина / И.В. Голубев, В.В. Гуреев, М.В. Корокин [и др.] // Результаты исследований в области фармакологии. 2020. № 6 (2). С. 85–96.
3. Фармакологическая коррекция морфофункционального повреждения сетчатки с использованием 11-аминокислотного фрагмента дарбэпоэтина в эксперименте / В.О. Губарева, А.Л. Пажинский, С.С. Луговской [и др.] // Результаты исследований в области фармакологии. 2019. № 5 (3). С. 43–55.
4. Пептид из 11 аминокислот, имитирующий структуру α -спирали В эритропоэтина, улучшает функцию эндотелия, но стимулирует тромбоз у крыс / М.В. Корокин, В.О. Солдатов, А.А. Титце [и др.] // Фармация и фармакология. 2019. № 7 (6). С. 312–320.
5. Костина Д.А., Покровская Т.Г., Полтев В.Ю. Ренопротекторное действие карбамилированного дарбэпоэтина и уденафила при ишемии-реперфузии почек крыс за счет эффекта preconditionирования и ингибирования ядерного фактора карра В // Результаты исследований в области фармакологии. 2021. № 7 (1). С. 1–19.

6. Комплексная оценка эндотелиопротекторной активности инновационного пептида, моделирующего альфа-спираль В-эритропоэтина при L-NAME-индуцированном дефиците оксида азота на позднем сроке беременности / М.В. Покровский, А.В. Юракова, В.В. Гуреев [и др.] // Журнал критических обзоров. 2019. № 6 (6). С. 180–184.

7. Сертезер М., Кокен Т., Кахраман А. Изменения уровней TNF-альфа в печени, антиоксидантного статуса и продуктов окисления после ишемии/реперфузии почек у мышей // J Surg Res. 2002. № 107 (2). С. 234–240.

REFERENCES

1. Belyaeva V.S., Stepenko Y.V., Lyubimov I.I. et al. Non-hematopoietic erythropoietin-derived peptides for atheroprotection and treatment of cardiovascular diseases. *Rezultaty issledovaniy v oblasti farmakologii = Research Results in Pharmacology*. 2020;6(3):75–86. (In Russ.).

2. Golubev I.V., Gureev V.V., Korokin M.V. et al. Preclinical study of innovative peptides mimicking the tertiary structure of the α -helix B of erythropoietin. *Rezultaty issledovaniy v oblasti farmakologii = Research Results in Pharmacology*. 2020;6(2):85–96. (In Russ.).

3. Gubareva V.O., Pazhinsky A.L., Lugovskoy S.S. et al. Pharmacological correction of morphofunctional retinal injury

using 11-amino acid fragment of darbepoetin in the experiment. *Rezultaty issledovaniy v oblasti farmakologii = Research Results in Pharmacology*. 2019;5(3):43–55. (In Russ.).

4. Korokin M.V., Soldatov V.O., Tietze A.A. et al. 11-amino acid peptide imitating the structure of erythropoietin α -helix b improves endothelial function, but stimulates thrombosis in rats. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(6):312–320. (In Russ.).

5. Kostina D.A., Pokrovskaya T.G., Poltev V.Y. Renoprotective effect of carbamylated darbepoetin and udenafil in ischemia-reperfusion of rat kidney due to the effect of preconditioning and inhibition of nuclear factor kappa B. *Rezultaty issledovaniy v oblasti farmakologii = Research Results in Pharmacology*. 2021;7(1):1–19. (In Russ.).

6. Pokrovskii M.V., Yurakova A.V., Gureev V.V. et al. Integrated evaluation of the endothelioprotective activity of an innovative peptide simulating the alpha-helix of B-erythropoethin in L-NAME-induced nitrogen oxide deficiency at the late gestation period. *Zhurnal kriticheskikh obzоров = Journal of Critical Reviews*. 2019;6(6):180–184. (In Russ.).

7. Serteser M., Koken T., Kahraman A. Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res*. 2002;107(2):234–240. (In Russ.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Александр Сергеевич Нетребенко – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, AlexNetrebenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2212-0508>

Владимир Владимирович Гуреев – доктор медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1433-1225>

Михаил Владимирович Покровский – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ Фармакологии живых систем, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, mpokrovsky@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2761-6249>

Владимир Иванович Якушев – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, vladiyakush@yandex.ru

Елена Владимировна Авдеева – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры нормальной физиологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, avdeyeva_ev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7152-5483>

Анастасия Владимировна Гуреева – студентка 3-го курса медицинского факультета, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, nastasyi.207@gmail.com

Мария Алексеевна Затолокина – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

Статья поступила в редакцию 30.11.2021; одобрена после рецензирования 29.12.2021; принята к публикации 23.02.2022.

The authors declare no conflicts of interests.

Information about the authors

Alexander S. Netrobenko – Postgraduate Student of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, AlexNetrebenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2212-0508>

Vladimir V. Gureev – Doctor of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1433-1225>

Mikhail V. Pokrovsky – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Head of the Research Institute of Pharmacology of Living Systems, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, mpokrovsky@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2761-6249>

Vladimir I. Yakushev – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, vldiyakush@yandex.ru

Elena V. Avdeeva – Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Normal Physiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, avdeyeva_ev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7152-5483>

Anastasia V. Gureeva – 3rd year student of the Faculty of Medicine, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, nastasyi.207@gmail.com

Maria A. Zatolokina – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

The article was submitted 30.11.2021; approved after reviewing 29.12.2021; accepted for publication 23.02.2022.