

Экспрессия маркеров неоангиогенеза и фибринолитической системы в динамике экспериментальной ишемии почки у крыс

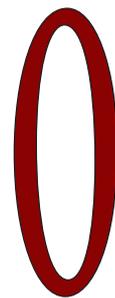
Neoangiogenesis and fibrinolytic system biomarkers expression in the dynamics of experimental kidney ischemia in rats

O.I. Kit, E.M. Franciyanc, S.N. Dimiriadi, I.V. Kaplieva, L.K. Trepitaki

In patients subjected to the kidney ischemia during the partial nephrectomy due to renal cancer it is important to study the pathogenesis of ischemic changes, which is necessary for selection of optimal ischemia time during the operation. The aim of the study was to study the expression of angiogenesis and fibrinolysis related biomarkers in cortical layer of the kidney in the acute ischemia setting in rats of different age and sex. The study model was «two kidneys – one clamp». The biomarkers selected for analysis using IFA were VEGF-A, VEGF-R, u-PA and plasmin. Among the different sub-groups of animals the young females were more resistant to ischemia with regard to development of pre-renal disturbances. Different results during the comparison of the animals in groups «old females – young males» and «young females – old males» let us suppose, that the sexual hormones could be playing some protector role in a setting of acute kidney ischemia, which warrants further investigation of estrogen-androgen balance in the development of the renal damage.

*О.И. Кит, Е.М. Франциянц, С.Н. Димитриади, А.Н. Шевченко
И.В. Каплиева, Л.К. Трпитакки*

*Ростовский научно-исследовательский онкологический институт
Минздрава России, Ростов-на-Дону*



пухологи почки составляют 2–3% всех злокачественных новообразований. В последнее время в лечении больных локализованным раком почки предпочтение отдают органосохраняющему подходу [1]. Основным преимуществом резекции почки является сохранение максимального объема функционирующей почечной паренхимы. Согласно последним данным, канцер-специфическая выживаемость после радикальной нефрэктомии и резекции почки примерно одинакова. Кроме того, у пациентов с сохраненным органом реже развивается почечная недостаточность, что, в свою очередь, снижает риск сердечно-сосудистых осложнений и увеличивает общую выживаемость. Выполнение резекции почки является существенным фактором, обеспечивающим психологический комфорт пациента и повышающим качество жизни. Обычно резекция почки выполняется в условиях тотальной тепловой ишемии органа с пережатием почечных сосудов [2]. На сегодняшний день время такой ишемии не превышает 30 минут, поскольку более длительная тепловая ишемия может быть связана с необратимыми изменениями проксимальных канальцев и ассоциирована с достоверным увеличением частоты развития почечной недостаточности в послеоперационном периоде с 1,7 до 10,2%

[3, 4]. Однако безопасный порог времени тепловой ишемии почки, а значит и развития ее острого повреждения, у разных людей может отличаться. Для выявления этих особенностей, возможно зависящих от пола, возраста и других причин, с целью оптимального использования времени для оперативного вмешательства, необходимо исследовать различные функциональные показатели повреждения почек на всех этапах их ишемии у разных категорий лиц.

Известно, что гипоксия является главным стимулом ангиогенеза в ишемизированном органе. Когда действие проангиогенных факторов превышает действие антиангиогенных, эндотелиальные клетки переходят из физиологического дремлющего в активное состояние, что приводит к включению процесса ангиогенеза [5]. Этот процесс регулируется факторами роста и цитокинами, а также системами протеолитических ферментов, среди которых ведущую роль играет фибринолитическая система, обеспечивающая локальный внеклеточный протеолиз [6].

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования явилось изучение уровней фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A), экспрессии рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-R), урокиназного активатора плазминогена (u-PA) и плазмينا в корковом веществе на разных сроках ишемии одной из почек у крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы 130 белых беспородных крыс обоего пола массой 180-200 г (молодые животные) и 300-350 г (старые животные). При работе придерживались «Общих этических принципов проведения экспериментов на животных», которые согласованы с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Исследование проводилось на модели «две почки, один зажим». Наркотизированные животные размещались в положении «на спине». Шерсть на животе удаляли, операционное поле обрабатывали 70° этиловым спиртом. Разрез проводили вдоль белой линии живота от мечевидного отростка грудины до лонного сочленения, рассекали кожу и

соединительную ткань. Выделяли сосудистую ножку правой почки, которую затем клипировали зажимом Холстеда. Рану на протяжении периода ишемии прикрывали салфеткой, смоченной стерильным физиологическим раствором. Через определенные промежутки времени животных забивали декапитацией, не выводя из наркоза. Для исследования забирали правую (ишемизированную) почку, выделяли корковый слой; 100 мг ткани промывали 1х фосфатно-солевым буфером (PBS), гомогенизировали в 1 мл 1х PBS и оставляли на ночь при температуре минус 20°C. Для полного разрушения клеточных мембран проводили два цикла замораживания-оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при 5000 g (2-8°C). Супернатант отбিরали, делили на аликвоты и хранили при температуре минус 20°C или минус 80°C. Перед измерением раз-

мороженные образцы центрифугировали. Исследование ткани коркового вещества ишемизированной почки проводили методом ИФА с применением стандартных тест-систем; изучали уровень u-PA и плазмина (Technoclone, Австрия), VEGF-A и VEGF-R1 (BenderMedSystems, США).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета Statistica 6,0 (Stat-Soft, 2001). Оценка достоверности произведена с использованием t-критерия Стьюдента. Уровень $p < 0,05$ принимали как значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения уровня VEGF-A и VEGF-R в корковом слое почки, подвергнутой острой ишемии, представлены в таблицах 1, 2. Прежде всего, был обнаружен различный уровень VEGF-A и VEGF-R в корковом веществе крыс в зависимости от пола, но не от возраста: содержание маркера не-оангиогенеза у самцов превосходило показатель у самок в среднем в 1,4 раза, а его рецептора – в 1,6 раза (табл. 1, 2).

Было обнаружено увеличение содержания VEGF-A в подвергнутой ишемии почке трех групп крыс (старых самок, старых и молодых самцов) в 1,6, 1,7 и 1,7 раза, соответственно, относительно показателей в интактной ткани, начиная с 15 мин ишемии (табл. 1). В сроки 20 мин и 25 мин уровень маркера оставался практически на этом же уровне. Параллельно повышению содержания VEGF-A происходило снижение относительно показателя в интактной ткани уровня VEGF-R в корковом веществе ишемизированной почки старых самок, старых и молодых самцов в 2,8 раза, 2,4 раза и 1,5 раза соответственно (табл. 2).

В этой связи значительно возросла величина коэффициента VEGF-A/VEGF-R в указанных образцах во все исследуемые сроки ишемии, характеризующая эффективность процесса ангиогенеза (табл. 3). ■

Таблица 1. Содержание VEGF-A (пг/г ткани) в корковом веществе ишемизированной почки крыс разного пола и возраста

группы крыс		самки		самцы	
		старые	молодые	старые	молодые
интактные		792,4 ± 68,3	825,8 ± 81,3	1150,6 ± 94,8	1102,4 ± 93,6
ишемия почки	15 мин	1230,8 ± 91,5*	428,8 ± 43,7*	2004,6 ± 152,7*	1857,6 ± 142,8*
	20 мин	1419,4 ± 118,3*	480,3 ± 51,6*	1752,7 ± 127,9*	1750,1 ± 112,6*
	25 мин	1190,6 ± 124,1*	556,5 ± 53,4*	2120,2 ± 186,3*	1370,5 ± 141,3*

*достоверно по отношению к интактной ткани

Таблица 2. Содержание VEGF-R (нг/г ткани) в корковом веществе ишемизированной почки крыс разного пола и возраста

группы крыс		самки		самцы	
		старые	молодые	старые	молодые
интактные		8,1 ± 0,6	7,2 ± 0,7	14,6 ± 1,2	10,2 ± 0,3
ишемия почки	15 мин	2,9 ± 0,3*	6,9 ± 0,7	6,2 ± 0,6*	6,7 ± 0,7*
	20 мин	5,5 ± 0,5*	6,9 ± 0,6	5,7 ± 0,4*	9,4 ± 0,3*
	25 мин	5,4 ± 0,5*	6,2 ± 0,5	6,5 ± 0,6*	7,1 ± 0,7*

*достоверно по отношению к интактной ткани

Таблица 3. Коэффициент VEGF-A/VEGF-R в корковом веществе ишемизированной почки крыс разного пола и возраста

группы крыс		самки		самцы	
		старые	молодые	старые	молодые
интактные		97,8 ± 8,6	114,7 ± 10,3	78,8 ± 7,4	108,1 ± 7,4
ишемия почки	15 мин	424,4 ± 31,9*	62,1 ± 5,8*	323,3 ± 29,6*	277,3 ± 21,6*
	20 мин	258,1 ± 19,3*	69,6 ± 7,2*	307,5 ± 33,2*	186,2 ± 20,8*
	25 мин	220,5 ± 24,1*	89,8 ± 9,4*	326,2 ± 30,9*	193,0 ± 17,2*

*достоверно по отношению к интактной ткани

При анализе результатов изучения уровня VEGF-A, VEGF-R и их соотношения было обнаружено, что ни в один из сроков эксперимента не зарегистрировано увеличения исследуемых показателей в ткани коркового вещества ишемизированной почки молодых самок.

Учитывая, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A) – это стресс-индуцированный белок [7], увеличение уровня маркера и его соотношения с рецептором на фоне снижения последнего, можно рассматривать как адаптационный ответ на дефицит кислорода, выражающийся в активации ростового ангиогенеза в ишемизированной почке.

Одной из функциональных систем, участвующей в изменении морфоструктуры тканей при различных повреждающих воздействиях, является тканевая система активации плазминогена. Установлено, что при гисто-

логическом исследовании почечных сосудов после ишемического острого повреждения почки (ОПП) обнаруживаются изменения активности тканевого активатора плазминогена и ингибитора активатора плазминогена типа 1 в почках [8]. Результаты изучения уровня плазмина в корковом слое почки, подвергнутой острой ишемии, представлены в таблице 4.

Установлено, что через 20 мин после начала ишемии увеличение уровня плазмина в ишемизированной почке регистрируется в корковом веществе старых самок и молодых самцов в 1,4 раза и 1,6 раза, соответственно, относительно величин аналогичных показателей в интактной ткани. В корковом веществе изучаемой почки молодых самок в этот срок исследования содержание плазмина, напротив, снижалось в 1,3 раза, а в соответствующем образце старых самцов оставалось без изменений. Через

25 мин после начала ишемии уровень плазмина в корковом веществе старых самок и молодых самцов резко возрастал и становился выше уровня, регистрируемого в интактной ткани, в 2,5 раза и 2 раза соответственно. В этот срок обнаружено увеличение уровня этого показателя в корковом веществе правой почки старых самцов в 1,3 раза. В корковом веществе ишемизированной почки молодых самок в этот период отмечалось дальнейшее снижение уровня плазмина в среднем в 2,1 раза (табл. 4).

Сопоставляя сроки активации в корковом веществе почек VEGF и плазмина можно предположить, что не плазмин при ишемии является индуктором фактора роста эндотелия сосудов, а гидролитический фермент урокиназа (u-PA), синтезируемая почечным эпителием.

Результаты изучения содержания и активности u-PA в корковом слое почки, подвергнутой острой ишемии, представлены в таблицах 5, 6. Обнаружено, что содержание u-PA в корковом веществе интактных почек у старых животных было выше, чем у молодых. Так у старых самок уровень фермента был в среднем в 4,6 раза выше, чем у молодых, а у старых самцов – в 2,8 раза. При этом содержание u-PA в корковом веществе самцов было выше, чем у самок соответствующего возраста: у старых самцов относительно старых самок – в 1,3 раза, у молодых самцов относительно молодых самок – в 2,1 раза (табл. 5).

Через 15 мин после начала ишемии регистрируется равнозначное снижение уровня урокиназы в корковом веществе ишемизированной почки старых самок и молодых самцов в 1,3 раза, сопровождаемое повышением ее активности в 2 раза и 1,5 раза соответственно. Практически такое же соотношение содержания и активности урокиназы сохранялось и через 20 мин от начала ишемии. Через 25 мин содержание u-PA в корковом веществе ишемизированной почки старых самок и молодых самцов было в среднем в 1,7 раза ниже, чем в соответствующей интактной

Таблица 4. Содержание плазмина (нг/г ткани) в корковом веществе ишемизированной почки крыс разного пола и возраста

группы крыс		самки		самцы	
		старые	молодые	старые	молодые
интактные		61,8 ± 5,3	92,8 ± 8,3	104,8 ± 9,3	59,8 ± 5,2
ишемия почки	15 мин	71,5 ± 6,8	85,3 ± 7,1	99,7 ± 7,1	64,5 ± 5,8
	20 мин	84,6 ± 6,2*	71,8 ± 5,8*	57,9 ± 5,9*	94,8 ± 7,3*
	25 мин	154,5 ± 13,7*	43,9 ± 3,6*	48,9 ± 4,6*	120,7 ± 11,6*

*достоверно по отношению к интактной ткани

Таблица 5. Содержание u-PA (ед/г ткани) в корковом веществе ишемизированной почки крыс разного пола и возраста

группы крыс		самки		самцы	
		старые	молодые	старые	молодые
интактные		19,2 ± 2,0	3,9 ± 0,4	25,4 ± 1,9	8,0 ± 0,6
ишемия почки	15 мин	15,2 ± 1,3*	4,0 ± 0,4	24,8 ± 2,3	6,1 ± 0,4*
	20 мин	12,5 ± 10,4*	4,2 ± 0,4*	24,9 ± 2,6	5,3 ± 0,4*
	25 мин	11,1 ± 9,6*	6,8 ± 0,7*	19,6 ± 1,4*	4,8 ± 0,5*

*достоверно по отношению к интактной ткани

Таблица 6. Активность u-PA (ед/г ткани) в корковом веществе ишемизированной почки крыс разного пола и возраста

группы крыс		самки		самцы	
		старые	молодые	старые	молодые
интактные		0,11 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,1 ± 0,01
ишемия почки	15 мин	0,22 ± 0,02*	0,11 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,01*
	20 мин	0,24 ± 0,02*	0,07 ± 0,01*	0,22 ± 0,03	0,14 ± 0,02*
	25 мин	0,32 ± 0,03*	0,07 ± 0,01*	0,28 ± 0,02*	0,31 ± 0,03*

*достоверно по отношению к интактной ткани

ткани, а активность, напротив, в 2,9 раза и 3,1 раза выше.

В корковом веществе изучаемой почки старых самцов достоверные изменения содержания и активности u-PA зарегистрированы только через 25 мин ишемии: уровень фермента был снижен в 1,3 раза, а активность повышена в 1,6 раза относительно показателей в соответствующей интактной ткани (табл. 5, 6). В корковом веществе ишемизированной почки молодых самок изменение содержания u-PA обнаружено только через 25 мин ишемии и заключалось в его увеличении в 1,7 раза, тогда как активность u-PA снижалась, начиная с 20 мин, в 1,4 раза относительно показателя в интактной ткани и оставалась

на этом уровне через 25 мин (табл. 5, 6).

Совпадение временных характеристик активации урокиназы и повышения уровня VEGF-A, позволяет предположить, что именно u-PA в корковом веществе ишемизированной почки старых самок и молодых самцов уже через 15 мин ишемии, а позже и старых самцов запускает каскад VEGF-A – зависимого ангиогенеза, как приспособительной реакции ткани на ишемию. В этой связи интересной остается реакция ткани коркового вещества ишемизированной почки молодых самок, компенсаторные возможности которой, похоже, значительно превосходят аналогичные образцы животных других обследованных групп.

Таким образом, среди изученных групп животных особо выделялись молодые самки, у которых изменения изучаемых регуляторных факторов наступали позже, чем во всех остальных группах. Обнаруженная динамика реагирования на ишемию в ряду «старые самки – молодые самцы и молодые самки – старые самцы» наводит на мысль о вовлеченности половых гормонов в процессы, развивающиеся при остром прекращении кровообращения в почке, и о потенциально защитной роли этих веществ. Достаточно перспективным представляется изучение влияния эстроген-андрогенного баланса на развитие вызываемых ишемией изменений. ■

Резюме:

Изучение патогенеза изменений, развивающихся в почечной ткани при острой ишемии почки, может оказаться полезным с точки зрения определения оптимальной продолжительности ишемии для различных групп больных почечно-клеточным раком, являющихся кандидатами для выполнения резекции почки. Целью работы явилось изучение уровня маркеров ангиогенеза и фибринолитической системы в корковом веществе клипированной почки крыс разного возраста и пола в динамике острой ишемии. Исследование проводилось на модели «две почки – один зажим». Методом ИФА в корковом веществе ишемизированной почки исследовали содержание VEGF-A, VEGF-R, u-PA и плазмина. Установлено, что среди изученных групп животных особо выделялись молодые самки, у которых преренальные нарушения наступали позже, чем во всех остальных группах. Обнаруженная динамика реагирования на ишемию в ряду «старые самки – молодые самцы и молодые самки – старые самцы» наводит на мысль о вовлеченности половых гормонов в процессы, развивающиеся при остром прекращении кровообращения в почке, и о потенциально защитной роли этих веществ. Достаточно перспективным представляется изучение влияния эстроген-андрогенного баланса на развитие вызываемых ишемией изменений.

Ключевые слова: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-R), урокиназный активатор плазминогена (u-PA), плазмин, иммуноферментный анализ, экспериментальная тепловая ишемия почки.

Key words: vascular endothelial growth factor human (VEGF-A), vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R), urokinase-type plasminogen activator (u-PA), plasmin, acute renal ischemia, warm ischemia.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Б.Я., Калпинский А.С., Поляков В.А., Андрианов А.Н. Лапароскопическая резекция почки с применением радиочастотной термоабляции. // Онкоурология. 2012. N 2. С. 21-28.
2. Димитриади С.Н., Кит О.И., Медведев В.Л. Технические особенности выполнения лапароскопической резекции почки при почечно-клеточном раке. // Онкоурология 2014. N 2. С. 16-21.
3. Матвеев В.Б., Матвеев Б.П., Волкова М.И., Перлин Д.В., Фигурин К.М. Роль органосохраняющего хирургического лечения рака почки на современном этапе. // Онкоурология. 2007. N 2. С. 5-11.
4. K. Gaitonde. Robot – assisted partial nephrectomy. Эксп. и клин. урология. 2011. N 2. С. 106-108.
5. Махачев С. М., Османов А. О., Рамазанов М. Р. 2003. Механическое стимулирование ангиогенеза. Изд-во «Медицина». 160 с.
6. Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Ткачук В. А. Система активаторов плазминогена в ремоделировании сосудов и ангиогенезе. Биохимия. 2002. № 67. – С. 139-156.
7. Петрова Л.В., Кушлинский Н.Е., Ильина Л.В. Фактор роста эндотелия сосудов как показатель гипоксии тканей, его возможная роль в патогенезе плоского лишая слизистой оболочки рта. // Вестник дерматологии и венерологии. 2004. N 5. С. 7-8.
8. Roelofs JJ, Rouschop KM, Leemans JC. Tissue type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemic reperfusion injury. // J Am Soc Nephrol. 2006. Vol. 17. P. 131- 140.