

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 615.225.3:616.13.002.2-004.6

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-3-121-127

НЕФРОПРОТЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДА, ИМИТИРУЮЩЕГО АЛЬФА-СПИРАЛЬ ЭРИТРОПОЭТИНА-БЕТА, И ИНФЛИКСИМАБА ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРFUЗИОННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧЕК

**А.С. Нетребенко¹, В.В. Елагин², Д.А. Костина¹, В.В. Гуреев¹, М.В. Покровский¹,
В.И. Якушев¹, Е.Г. Сапрыкина¹, М.А. Затолокина^{2,3}, Т.В. Орлова²**

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

²Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

³Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

Автор, ответственный за переписку: Александр Сергеевич Нетребенко, AlexNetrebenko@mail.ru

Резюме. Поиск новых лекарственных препаратов, обладающих цитопротективной и противоишемической активностью, является актуальной задачей современной фармакологии. Данные свойства необходимы для комплексной протекции почечной паренхимы при органосохранных операциях (резекции почки), наиболее часто проводимых в условиях тепловой ишемии. Только сочетанное применение современных высокоэффективных препаратов и мастерство оперирующего хирурга могут предотвратить развитие острого почечного повреждения (ОПП), обусловленного пережатием почечных сосудов.

Цель – исследование нефропротективных эффектов комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), и инфликсимаба при ишемически-реперфузионном повреждении почек.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на 50 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 г. Животным вводили пептид, имитирующий альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), и инфликсимаб. Под наркозом производилось наложение атравматичных сосудистых зажимов на левую почечную ножку на 40 мин, нефрэктомия справа. Через 5 мин и 72 ч после реперфузии проводили функциональные пробы и лабораторные исследования.

Результаты. В результате исследования установлено, что использование комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), и инфликсимаба при ишемически-реперфузионной травме почек показало значительно более выраженные нефропротективные эффекты, чем введение пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), или инфликсимаба в монорегиме.

Выводы. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о перспективности совместного применения пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), и инфликсимаба с целью коррекции ишемически-реперфузионных повреждений почек.

Ключевые слова: альфа-спираль эритропоэтина-бета, инфликсимаб, ишемически-реперфузионное повреждение почек, микроциркуляция

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

NEPHROPROTECTIVE EFFECT OF A COMBINATION OF THE PEPTIDE MIMICKING THE α -SPATIAL STRUCTURE OF THE β ERYTHROPOIETIN CHAIN AND INFlixIMAB IN RENAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

**A.S. Netrebenko¹, V.V. Elagin², D.A. Kostina¹, V.V. Gureev¹, M.V. Pokrovsky¹,
V.I. Yakushev¹, E.G. Saprykina¹, M.A. Zatolokina^{2,3}, T.V. Orlova²**

¹Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

²Kursk State Medical University, Kursk, Russia

³I.S. Turgenev Orel State University, Orel, Russia

© Нетребенко А.С., Елагин В.В., Костина Д.А., Гуреев В.В.,
Покровский М.В., Якушев В.И., Сапрыкина Е.Г.,
Затолокина М.А., Орлова Т.В., 2022

Corresponding author: Alexander S. Netrobenko, AlexNetrebenko@mail.ru

Resume. The search for new drugs with cytoprotective and anti-ischemic activity is an urgent task of modern pharmacology. These properties are necessary for the complex protection of renal parenchyma during organ preservation operations (renal resection), most often carried out in conditions of thermal ischemia. Only the combined use of modern highly effective drugs and the skill of an operating surgeon can prevent the development of acute renal injury (AKI) due to pinching of renal vessels.

The aim of this study was to investigate the nephroprotective effects of a combination of a peptide mimicking the α -helix B of erythropoietin (pHBSP) and infliximab in ischemic reperfusion damage to the kidneys.

Methods. The experiment was conducted on 50 white laboratory male Wistar rats weighing 280–320 g. Animals were injected with a peptide mimicking the α -helix B of erythropoietin (pHBSP) and infliximab. Under anesthesia, atraumatic vascular clamps were applied to the left renal pedicle for 40 minutes, nephrectomy on the right. Functional samples and laboratory tests were performed 5 minutes and 72 hours after reperfusion.

Results. As a result of the study, it was shown that using a combination of the peptide simulating α -helix B erythropoietin (pHBSP) and infliximab in ischemic-reperfusion kidney injury showed significantly more pronounced nephroprotective effects than using the peptide mimicking α -helix B erythropoietin or infliximab in the mono mode.

Conclusion. The results of the study show the promise of combined use of peptide simulating α -helix B erythropoietin (pHBSP) and infliximab in order to correct ischemic-reperfusion kidney injuries.

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

Одними из наиболее перспективных препаратов для коррекции ишемически-реперфузионной травмы почек являются эритропоэтин и его производные [1, 2]. Активация гетеродимерного рецептора обуславливает развитие цитопротективных эффектов [3, 4].

В практике лечение высокими дозами эритропоэтина привело к увеличению риска тромботических событий в первый год после трансплантации (эритропоэтин 24,4 % по сравнению с плацебо 6,4 %). С целью предотвращения этих нежелательных явлений были разработаны производные эритропоэтина, которые активируют только цитопротективное действие и не влияют на эритропоэз [5].

pHBSP – это синтетический пептид, который селективно связывается с гетеродимерным рецептором. Уже было показано, что pHBSP не является эритропоэтическим.

Значимую роль в патофизиологии повреждения при ишемии/реперфузии почек играют провоспалительные цитокины, включая фактор некроза опухоли- α (TNF- α) [6]. В фармакологии известны препараты, снижающие активность фактора некроза опухоли-альфа. Одним из них является инфликсимаб [7].

Он обладает высокой аффинностью к фактору некроза опухоли- α , а также блокирует ряд провоспалительных интерлейкинов: интерлейкин-1, интерлейкин-6, интерлейкин-8, моноцитарный хемоатрактантный белок-1 и другие активные факторы, участвующие в процессах воспаления и деструкции в тканях.

Таким образом, это исследование было предпринято, чтобы выяснить, превосходят ли ренопротективные эффекты комбинации пептида, имитирующий

альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), и инфликсимаба при ишемии-реперфузии почек от использования этих веществ в монорежиме.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать нефропротективные эффекты комбинации пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), и инфликсимаба в условиях моделирования ишемически-реперфузионной травмы почек.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе Центра доклинических и клинических исследований ФГАОУ ВО НИУ БелГУ. 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 альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), 25 мкг/кг внутривенно за 30 мин до моделирования ишемии.
4. Ишемия/реперфузия + Инфликсимаб (Remicade®, MSD Ireland (Brinney) 10 мг/кг внутривенно за 1 час до моделирования ишемии.
5. Ишемия/реперфузия + пептид, имитирующий альфа-спираль эритропоэтина-бета (pHBSP), 25 мкг/кг

внутрибрюшинно за 30 минут до моделирования ишемии + Инфликсимаб (Remicade®, MSD Ireland (Brinney) 10 мг/кг внутрибрюшинно за 1 ч до моделирования ишемии.

Под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг внутрибрюшинно) после предварительной обработки операционного поля выполнялась срединная лапаротомия. Путем мобилизации петель кишечника, вскрытия забрюшинного пространства выделялись почки с элементами почечной ножки. Производилось наложение атравматичных сосудистых зажимов на левую почечную ножку на 40 мин. Эффективность наступления ишемии оценивалась по изменению цвета почки. Нефрэктомия справа.

Используя аппаратно-программный комплекс MP100 (Biopac System, Inc., США) с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и поверхностный датчик TSD143, измеряли уровень микроциркуляции паренхиме почки. Измерение микроциркуляции производили до ишемии, через 5 мин после реперфузии. Регистрация и обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения AcqKnowledge версии 3.8.1. Значения показателей выражались в перфузионных единицах (PU). Далее в брюшную полость вводили 4–5 мл теплого 0,9%-го раствора натрия хлорида, затем рану послойно ушивали.

В послеоперационном периоде животные находились в специальных метаболических клетках для сбора мочи в течение 72 часов с обеспечением свободного доступа к воде.

Через 72 часа после реперфузии крыс повторно наркотизировали описанным ранее методом, производили релапаротомию, измеряли показатели микроциркуляции, производили забор крови из правого желудочка для биохимических исследований.

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

$$СКФ = \frac{\text{Креатинин мочи (мкмоль / л)} \times \text{объем мочи (мл)}}{\text{Креатинин сыворотки крови (мкмоль / л)} \times \text{время (мин)}}$$

Фракционная экскреция натрия (ФЭН) рассчитывалась следующим способом:

$$ФЭН = \frac{\text{натрий мочи (ммоль / л)} \times \text{креатинин крови (мкмоль / л)}}{\text{натрий сыворотки крови (ммоль / л)} \times \text{креатинин мочи (мкмоль / л)}} \times 100\%$$

Статистическую обработку проводили с использованием программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка

и критерия Шпигельхальтера (библиотека normtest), оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене (библиотека lawstat).

В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела – Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве post-hoc анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный t-критерий Стьюдента или критерий Манна – Уитни соответственно, с поправкой Бенджамини – Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спустя 72 ч после снятия зажимов с почечных сосудов у животных в группе rHBSP скорость клубочковой фильтрации составила $(0,38 \pm 0,02)$ мл/мин. Введение инфликсимаба оказало менее значимый эффект, сохранив СКФ на уровне $(0,33 \pm 0,02)$ мл/мин. Применение комбинации rHBSP + инфликсимаб для профилактики ишемически-реперфузионных повреждений по эффективности достоверно превосходило раздельное использование вышеуказанных веществ, зарегистрирован уровень СКФ $(0,59 \pm 0,05)$ мл/мин (рис. 1).

В монорегиме введение rHBSP и инфликсимаба до ишемии оказало положительный эффект на состояние почечных канальцев: фракционная экскреция натрия составила $(2,1 \pm 0,16)$ и $(1,5 \pm 0,14)$ % соответственно, по сравнению с группой ишемии/реперфузии ($p < 0,05$).

На фоне совместного введения пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина-бета, и инфликсимаба устранялось нарушение функции почечных канальцев, что подтверждалось уменьшением фракционной экскреции натрия до уровня $(0,84 \pm 0,12)$ %. Эффект от комбинированного применения данных препаратов достоверно отличался от показателей при коррекции инфликсимабом или rHBSP в монорегиме (рис. 2).

Введение комбинации rHBSP + инфликсимаб оказало наибольшее положительное влияние на показатель микроциркуляции, который был максимально приближен к показателю ложнопериорированных животных. Раздельное применение rHBSP и инфликсимаба менее эффективно сохраняло уровень микроциркуляции при ишемии/реперфузии (табл.).

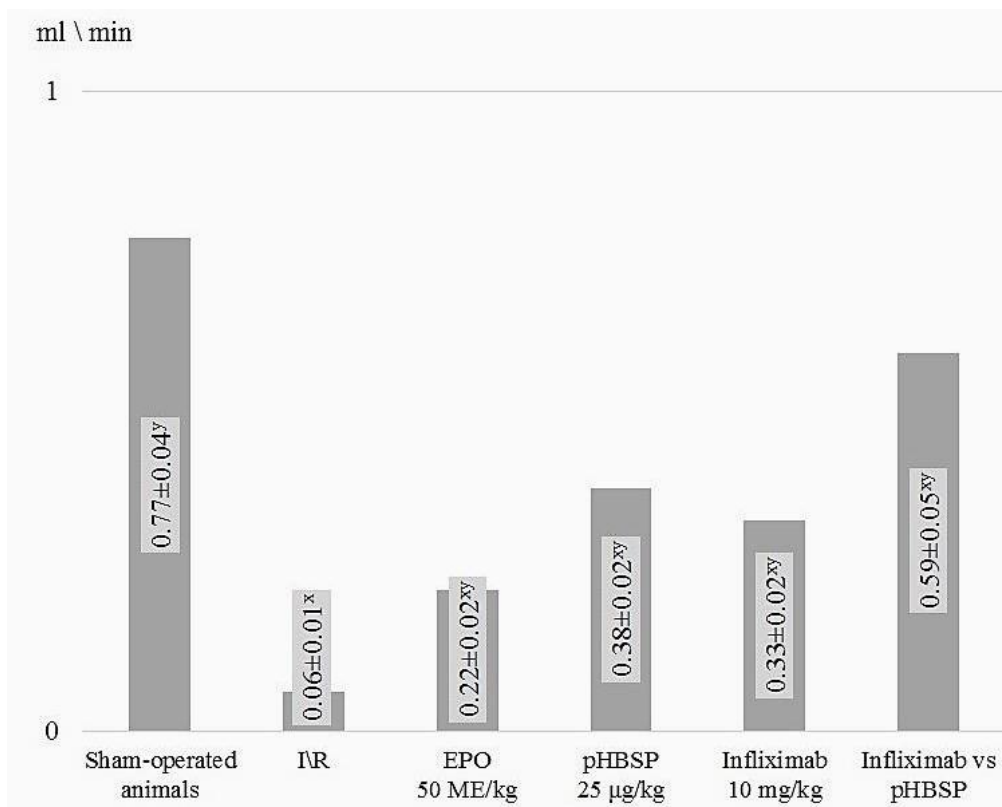


Рис. 1. Показатели скорости клубочковой фильтрации через 72 часа реперфузии в условиях ишемически-реперфузионной травмы почек

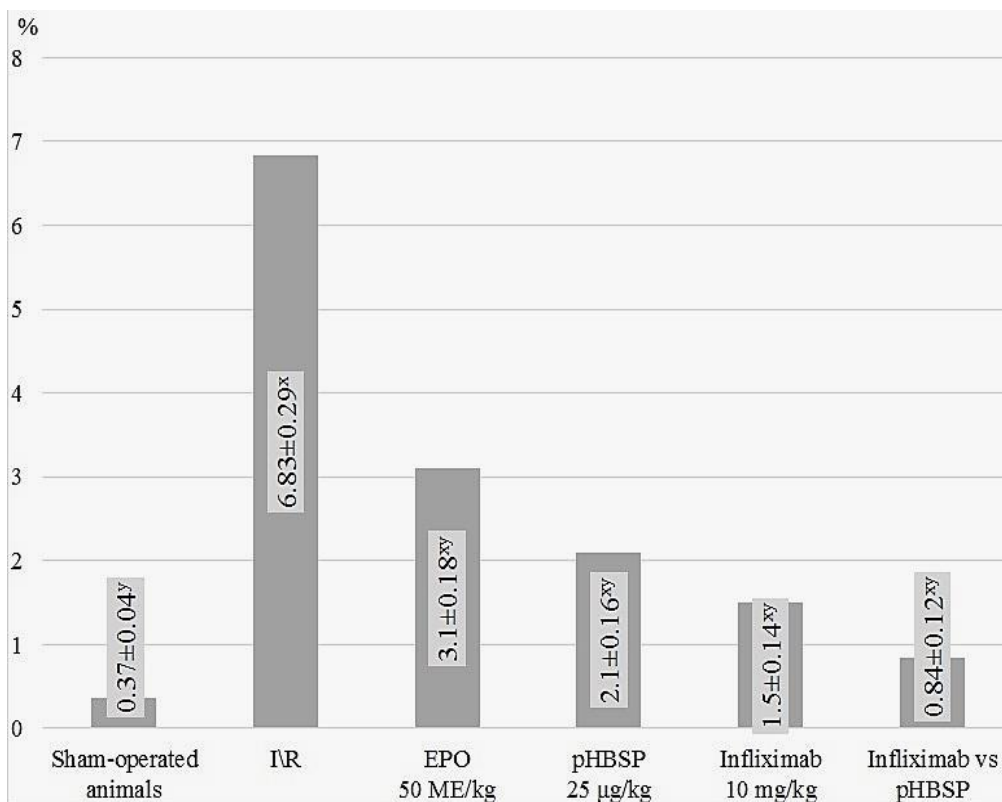


Рис. 2. Показатели фракционной экскреции натрия через 72 ч реперфузии в условиях ишемически-реперфузионной травмы почек

Влияние рНБСП и инфликсимаба на микроциркуляцию в почке
при ишемически-реперфузионном повреждении через 72 ч реперфузии, PU

Экспериментальная группа	До ишемии	5 мин	72 ч
Ложнооперированные животные	897 ± 45	903 ± 43	890 ± 36
Ишемия/реперфузия	900 ± 42	217 ± 15	410 ± 20
рНБСП (25 мкг/кг)	899 ± 35	681 ± 20	625 ± 36
Инфликсимаб (10 мг/кг)	906 ± 67	688 ± 25	631 ± 30
Инфликсимаб + рНБСП	899 ± 53	806 ± 42	762 ± 41

Защитная роль эритропоэтина продемонстрирована в многочисленных доклинических исследованиях на моделях ишемии/реперфузии различных органов и тканей. В своем исследовании мы доказали, что комбинированное использование рНБСП и инфликсимаба в значительной степени способствует сохранению нормальной функциональной активности почек после моделирования ишемически-реперфузионной травмы.

Способность рНБСП селективно связываться с гетеродимерным рецептором эритропоэтина и обуславливает активацию плейотропных эффектов: противоишемического, антиапоптотического, противовоспалительного, оказывая защитное действие на паренхиму почки и снижая образование гуморальных факторов, приводящих к клубочковой и канальцевой дисфункции и активации eNOS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинированное профилактическое применение пептида, имитирующего альфа-спираль эритропоэтина-бета (рНБСП), в дозе 25 мкг/кг и инфликсимаба в дозе 10 мг/кг при моделировании ишемически-реперфузионной травмы почки продемонстрировало достоверное превосходство нефропротективных свойств, в сравнении с монотерапией данным препаратами. Введение до ишемии рНБСП в дозе 25 мкг/кг и инфликсимаба в дозе 10 мг/кг приводило к восстановлению адекватного функционирования почечных канальцев и улучшению микроциркуляции в почечной паренхиме.

Следует отметить, что указанные вещества влияют на разные звенья патологического процесса при ишемической и реперфузионной травме почки: введение рНБСП обуславливает активацию механизмов фармакологического preconditionирования, в свою очередь инфликсимаб блокирует каскад патологических реакций, обусловленных воспалением и тканевой деструкцией.

Таким образом, комбинированная терапия пептидом, имитирующим альфа-спираль эритропоэтина-бета (рНБСП), и инфликсимабом является наиболее перспективной в плане нефропротекции при моделировании острого ишемически-реперфузионного повреждения почек в эксперименте.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Костина Д.А., Покровская Т.Г., Полтев В.Ю. Ренопротекторное действие карбамилированного дарбепоедина и уденафила при ишемии-реперфузии почек крыс за счет эффекта preconditionирования и ингибирования ядерного фактора карпа В // *Research Results in Pharmacology*. 2021. № 7 (1). С. 1–19.
2. Бейкер Д.Э. Эритропоэтин имитирует ишемическое preconditionирование // *Vascular Pharmacology*. 2005. № 1 (6). С. 233–241.
3. Елагин В.В., Братчиков О.И., Затолокина М.А. Коррекция морфофункциональных нарушений эритропоэтином и селективным ингибитором аргиназы II KUD975 при ишемическом поражении почек в эксперименте // *Research Results in Pharmacology*. 2018. № 4 (4). С. 29–40.
4. Негематопозитический аналог эритропоэтина, ARA 290, ингибирует активацию макрофагов и предотвращает повреждение трансплантированных островков поджелудочной железы / М. Ватанабэ, Т. Лундгрэн, Ю. Сайто [и др.] // *Transplantation*. 2016. № 100 (3). С. 554–562.
5. 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.
6. Шенер Г., Сехирли О., Велиоглу-Огюнч А. Защитное действие Монтелукаста при ишемически/реперфузионном повреждении почек у крыс // *Pharmacological Research*. 2006. № 54 (1). С. 65–71.
7. Защитное действие инфликсимаба на индуцированное ишемией/реперфузией повреждение почек крыс / С. Тасдемир, С. Тасдемир, Н. Варди [и др.] // *Renal Failure*. 2012. № 34 (9). С. 1144–1149.

REFERENCES

1. 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. *Research Results in Pharmacology*. 2021;7(1):1–19. (In Russ.).
2. Baker J.E. Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. *Vascular Pharmacology*. 2005;1(6):233–241. (In Russ.).
3. Elagin V.V., Bratchikov O.I., Zatolokina M.A. Correction of morphofunctional disorders with assessed erythropoietin and selective arginase II inhibitor KUD975 for ischemic kidney damage in the experiment. *Research Results in Pharmacology*. 2018;4(4):29–40. (In Russ.).
4. Watanabe M., Lundgren T., Saito Yu. et al. Non-hematopoietic Erythropoietin Analogue, ARA 290, Inhibits

Macrophage Activation and Prevents Damage to Transplanted Islets. *Transplantation*. 2016;100(3): 554–562. (In Russ.).

5. 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.).

6. Sener G., Sehrlı O., Velioglu-Ogünç A. Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacological Research*. 2006;54(1):65–71. (In Russ.).

7. Tasdemir C., Tasdemir S., Vardi N. et al. Protective effect of infliximab on ischemia/reperfusion-induced damage in rat kidney. *Renal Failure*. 2012;34(9):1144–1149. (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, <https://orcid.org/0000-0003-2212-0508>

Владислав Викторович Елагин – кандидат медицинских наук, доцент кафедры, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, marika1212@mail.ru.

Дарья Александровна Костина – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, marika1212@mail.ru.

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>, produmen@yandex.ru

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

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

Елена Геннадьевна Сапрыкина – ординатор кафедры госпитальной хирургии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, Lena.saprykina5555@yandex.ru

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>, marika1212@mail.ru.

Тамара Васильевна Орлова – профессор кафедры фармацевтической технологии, доктор фармацевтических наук, доцент, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4609-0975>, tam-orlova@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 02.04.2022; одобрена после рецензирования 11.06.2022; принята к публикации 23.06.2022.

The authors declare no conflicts of interests.

Information about the authors

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

Vladislav V. Elagin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, marika1212@mail.ru.

Daria A. Kostina – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, marika1212@mail.ru.

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>, produmen@yandex.ru

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

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

Elena G. Saprykina – Resident of the Department of Hospital Surgery, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, Lena.saprykina5555@yandex.ru

Maria A. Zatlokina – 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>, marika1212@mail.ru.

Tamara V. Orlova – Professor of the Department of Pharmaceutical Technology, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4609-0975>, tam-orlova@yandex.ru

The article was submitted 02.04.2022; approved after reviewing 11.06.2022; accepted for publication 23.06.2022.