Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ім. М. Горького

**ГРИГОРЯН ХАЧЕН**

УДК 591.147.7:599.323.4].084.1:547.854.6

**ПАТОГЕНЕЗ РЕНАЛЬНИХ ДИСФУНКЦІЙ
ЗА УМОВ АЛОКСАНОВОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ З РІЗНОЮ
АКТИВНІСТЮ еNOS І ПРОТЕЇНКІНАЗИ С**

14.03.04 – патологічна фізіологія

**А в т о р е ф е р а т**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Донецьк – 2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Донецькому національному медичному університеті
ім. М. Горького МОЗ України.

**Науковий керівник:**

академік АН Вищої школи України, доктор медичних наук, професор **Барінов Едуард Федорович**, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького МОЗ України, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології.

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Крюк Юрій Якович**, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького МОЗ України, професор кафедри патологічної фізіології;

доктор медичних наук, професор **Роговий Юрій Євгенович**, Буковинський державний медичний університет МОЗ України, м. Чернівці, професор кафедри патологічної фізіології.

.

Захист відбудеться “24” жовтня 2008 р. о 1200 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 11.600.02 при Донецькому національному медичному університеті ім. М. Горького МОЗ України (83003, м. Донецьк, проспект Ілліча, 16).

З дисертацією можно ознайомитись у бібліотеці Донецького національного медичного університету ім. М. Горького (83003, м. Донецьк, проспект Ілліча, 16).

Автореферат розісланий “4” вересня 2008 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 11.600.02

доктор медичних наук, доцент **М. В. Єрмолаєва**

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Цукровий діабет (ЦД) супроводжується розвитком ренальних дисфункцій (Тареева Н. А., 2003; Gross J. L., 2005)**.** Високі резервні можливості нирок маскують порушення транспортних процесів у нефронах за умов ЦД протягом тривалого часу (Рябов С.И., 1997; Rebsomen L., 2006), що стало підставою для виділення в окрему групу “silent нефропатії”, яка відповідає доклінічній стадії розвитку діабетичної нефропатії (Шамхалова М. Ш. и соавт., 2006). Зміна метаболічного статусу нефронів, проліферації, диференціації клітин та їх апоптозу за умов ЦД визначають специфіку репаративного процесу в нирці при травмах й оперативних втручаннях в урологічних хворих (Schena F. P. et al., 2005). Ключовим патогенетичним механізмом розвитку ренальних ускладнень ЦД є ендотеліальна дисфункція (Lamarre-Cliche M. et al., 2005; Shah D. I., 2006), яка викликана змінами внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS–Протеїнкіназа G (Фрейдлин И. С., 2006; Takeuchi K., 2007). Генетично детерміноване зниження експресії eNOS вважається фактором ризику розвитку кардіоваскулярних і ренальних ускладнень ЦД (Jones L.C. et al., 2005), однак механізми даного феномена залишаються нез’ясованими. Вивчення принципів регуляції експресії й активності eNOS продемонструвало наявність як мінімум двох альтернативних шляхів контролю eNOS: Са2+-залежного, пов’язаного з підвищенням рівня Са2+-кальмодуліна (Chen Y. et al., 2003), а також Са2+-незалежного механізму за участю серин-треонінових протеїнкіназ (Davis B. J. et al., 2006). Серед останніх особливу роль відіграє протеїнкіназа С (ПкС) - фермент, що контролює процеси проліферації, диференціації та секреторної активності клітин, у тому числі нирок (Marrikone T. et al., 2007; Mingzhang G. et al., 2003). Вважається, що високий рівень ПкС за умов ЦД сприяє зниженню активності eNOS і розвитку ендотеліальної дисфункції (Grumbach I. M. et al., 2005; Marrikone T. et al., 2007). На сьогодні виявлено прямий зв’язок між ступенем активації ПкС і проявами мікроангіопатії, виразністю протеїнурії й швидкістю прогресування тубуло-інтерстиційного ушкодження за умов ЦД (Musso C. et al., 2006; Rebsomen L., 2006). У літературі немає достатньої інформації щодо специфіки взаємин ПкС і сигнальної системи eNOS-протеїнкіназа G під час ЦД (Ohshiro Y.et al., 2006), їхніх індивідуальних особливостей і ролі в детермінації структурно-функціонального стану нирок за умов діабетичної нефропатії (Salivon I. et al., 2005). Мало відомо про механізми нефропротекторного ефекту модуляторів протеїнкіназ, не визначені показання до призначення інгібітору ПкС за умов ЦД, хоча з’ясування цього питання сприятиме розробці індивідуалізованої тактики корекції ренальних дисфункцій за умов ЦД. Продовжується пошук інформативних критеріїв, які дозволили б оцінити швидкість розвитку діабетичної нефропатії.

Таким чином, вивчення патогенезу ренальних дисфункцій за умов алоксанового діабету у щурів з різною активністю eNOS і протеїнкінази С має як теоретичне, так і клінічне значення й дозволяє вважати роботу перспективним дослідженням сучасної патофізіології.

**Зв’язок з науковими програмами, планами, темами.** Робота є фрагментом НДР МОЗ України “Вивчити роль внутрішньоклітинних сигнальних систем під час реалізації запальнево-репаративних процесів в органах, що забезпечують гомеостаз організму” (№ 0106U010840, шифр МК 07.01.02). Здобувачем виконані фрагменти “Стан систем внутрішньоклітинної сигналізації в динаміці розвитку ендотеліальної дисфункції за умов моделювання цукрового діабету у щурів” й “Структурна характеристика ниркових тілець у щурів з різною вихідною потужністю eNOS за умов розвитку діабетичної нефропатії”.

**Мета і задачі дослідження:** Метою дослідження є вивчення ролі внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS-Протеїнкіназа G і протеїнкінази С в патогенезі ренальних дисфункцій за умов алоксанового діабету. Досягнення даної мети базувалося на рішенні наступних задач:

1. Проаналізувати індивідуальні особливості активності різних ланок NO-залежної сигнальної системи в інтактних щурів.

2. Дослідити in vitro стан системи eNOS-протеїнкіназа G й модулюючі ефекти протеїнкінази С в динаміці алоксанового діабету у щурів з різною вихідною експресією eNOS.

3. Установити залежність між змінами в системі внутрішньоклітинної сигналізації й структурно-функціональним станом нирок під час алоксанового діабету у щурів з різною індивідуальною реактивністю.

4. Вивчити вплив інгібітору Протеїнкінази С (рубоксістаурину) на стан внутрішньоклітинного сигнального шляху eNOS-протеїнкіназа G за умов алоксанового діабету.

5. Оцінити ефекти інгібітору Протеїнкінази С на структурно-функціональний стан нирок під час алоксанового діабету у щурів з низькою початковою експресією eNOS.

*Об’єкт дослідження*: структурно-функціональний стан нирок, цукровий діабет, внутрішньоклітинні сигнальні системи.

*Предмет дослідження:* ренальні дисфункції за умов алоксанового діабету, внутрішньоклітинна сигнальна система eNOS-Протеїнкіназа G, протеїнкіназа С.

*Методи дослідження:* фізіологічні, морфологічні, біохімічні, які дозволили з’ясувати залежність патогенезу ренальних дисфункцій під час цукрового діабету від індивідуальних особливостей внутрішньоклітинного сигнального шляху eNOS-ПкG, а також обґрунтувати застосування інгібітору ПкС для профілактики розвитку діабетичної нефропатії. Вірогідність отриманих результатів підтверджували статистичними методами.

 **Наукова новизна отриманих результатів**. У даній роботі вперше встановлено, що резервна потужність eNOS визначає ефективність реалізації компенсаторних реакцій нирок за умов дії патогенетичних факторів ЦД. Уперше виявлено, що в умовах нормальної експресії eNOS у ранній термін (через 1 міс) після моделювання ЦД відбувається адаптивне підвищення активності системи eNOS-протеїнкіназа G, що оптимізує мікроциркуляцію в умовах гіпертрофії нирок, сприяє підвищенню швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) і реабсорбції в проксимальних звивистих канальцях (ПЗК), товстій висхідній частині петлі Генле (ТВЧПГ) й збірних трубках. У гіпореактивних тварин до кінця 1 місяця має місце зниження активності eNOS-ПкG і ПкA на фоні активації ПкС і фосфодіестераз (ФДЕ). Це супроводжується розвитком мезангіальної експансії й протеїнурії, порушенням перитубулярної мікроциркуляції, розвитком дистрофії тубулярного епітелію на фоні вираженої гіпертрофії канальців й інфільтрації строми лейкоцитами, а до кінця 3 місяця - розвитком склеротичних змін у нирках, зниженням фільтрації, проксимальної й дистальної канальцевої реабсорбції. Вперше продемонстровано, що інгібування ПкС оптимізує роботу внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS-ПкG. Призначення інгібітору ПкС обмежує розвиток гіперфільтрації й гіпертрофії нирок в ранні терміни ЦД, знижує ступінь мікроциркуляторних порушень й активацію мезангіуму через 2 місяці після моделювання ЦД, що гальмує розвиток гломерулосклерозу й тубуло-інтерстиційного ушкодження в діабетичних нирках до кінця 3 місяця після введення алоксану.

**Практичне значення отриманих результатів**. Динаміка активності внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS-протеїнкіназа G і ПкС, а також їх взаємозв’язок з патоморфологічними змінами в нирках є теоретичною основою для розробки методів ранньої діагностики й прогнозування розвитку ДН, а також реалізації тактики індивідуалізованої фармакологічної нефропротекції. Дані щодо оцінки активності ПкС і стану внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS-ПкG, впроваджені в практику Інституту невідкладної й відновлювальної хірургії АМН України, НДІ травматології й ортопедії ДонНМУ МОЗ України. Матеріали роботи, що відбивають вплив інгібітору ПкС на компенсаторні й адаптаційні процеси в діабетичних нирках, впроваджені в навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології Одеського, Запорізького, Харківського, Кримського, Луганського медичних університетів й сприятимуть розширенню знань про патогенез ренальних дисфункцій за умов ЦД.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно проаналізована наукова література, виконані експерименти, проведені функціональні, біохімічні й морфологічні дослідження, а також статистична обробка даних, аналіз й узагальнення результатів дослідження, обґрунтовані наукові висновки та рекомендації для теоретичного і практичного використання одержаних результатів. Разом з науковим керівником проведені аналіз й обговорення плану, результатів дослідження, підготовлені публікації за темою дослідження.

**Апробація результатів дисертації.** Дисертаційна робота апробована на спільному засіданні кафедр гістологіі, анатомії, патологічної фізіології, урології та оперативної нефрології. Матеріали дисертаційної роботи представлені, обговорені й одержали позитивну оцінку на наукових конференціях: “VI читання ім. В.В. Підвисоцького” (Одеса, 2007), “Досвід і проблеми застосування сучасних морфологічних методів досліджень органів і тканин у нормі та при діагностиці патологічних процесів” (Тернопіль, 2007), IІІ Міжнародній науковій конференції “Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія й клініка” (Одеса, 2007), об`єднаному пленумі Російського й Московського наукових товариств патофізіологів “Дизрегуляционная патология” (Москва, 2007), “VIІ читання ім. В.В. Підвисоцького” (Одеса, 2008), V національному конгресі патофізіологів України “Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів” (Запоріжжя, 2008).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 15 друкованих праць: 11 статей у спеціалізованих наукових журналах (1 моноавторська), рекомендованих ВАК України, 2 моноавторські статті в збірниках і 2 тез.

**Обсяг і структура дисертації.** Робота викладена на 183 сторінках машинописного тексту (обсяг тексту основної частини - 122 с) і складається з вступу, огляду літератури, розділу “Матеріал і методи дослідження”, 3 розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків і списку використаних літературних джерел. Робота проілюстрована 18 мікрофотографіями, 40 графіками й 5 таблицями. Список літератури включає 235 джерел (45 кирилицею й 190 латиницею).

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріал і методи дослідження**. Дослідження виконане на 136 щурах самцях лінії Вістар масою тіла 220±15 г. Підготовка тварин до експериментів та інвазивні втручання здійснювалися з дотриманням відповідних вимог Європейської Конвенції до захисту хребетних тварин, які використовуються в дослідницьких та інших наукових цілях.

Розподіл тварин на групи проводили до моделювання цукрового діабету на основі оцінки стану систем внутрішньоклітинної сигналізації з урахуванням індивідуальних параметрів генетично детермінованої схильності до розвитку ендотеліальної дисфункції. З цією метою проводили оцінку базальної активності та резервної потужності ендотеліальної синтази оксиду азоту в тесті in vitro. В якості об’єкту вивчення активності ферменту використовували тромбоцити, що експресують східний з ендотелієм високий рівень eNOS. Для оцінки стану ланок внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS–Протеїнкіназа G та протеїнкіназ А і С використовували інгібіторний аналіз. Визначали амплітуду модулюючого впливу трифтазину, L-аргініну, L-NAME, ОDQ (1H-[1,2,4]оксадіазоло[4,3-а]квіноксаліну-1, теофіліну, Н89 і стауроспорину на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів, що дозволило інтерпретувати активність Са2+-кальмодуліну, eNOS, гуанілатциклази (ГЦ), фосфодіестераз, ПкА і ПкС відповідно. Агрегацію і дезагрегацію тромбоцитів реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 шляхом виміру оптичної щільності світлового потоку, що проходить через суспензію клітин (Барінов Е.Ф. та інш., 2001). Базальна активність eNOS не розрізнялася статистично значуще у всіх тварин. Додавання L-аргініну в суспензію тромбоцитів, преінкубованих з АДФ, дозволяло скласти судження щодо резервної потужності ферменту. Даний ефект відрізнявся вираженою індивідуальною гетерогенністю. На підставі аналізу характеру розподілу параметрів АТ за умов інкубації з L-аргініном всіх тварин розділили на дві групи: з нормальною (індукована АТ знижувалася на 15-20%) і зниженою (індукована АТ змінювалася на 4-9%) резервною потужністю eNOS. Із групи тварин з нормальною резервною потужністю eNOS для моделювання ЦД відібрали 40 тварин, що сформували 1-у групу (нормореактивні щури), та 10 щурів використовували в якості контролю. Гіпореактивних тварин - щурів з низькою резервною експресією eNOS (n=76) - розділили на дві групи: 2-у – склали 40 гіпореактивних щурів з алоксановим діабетом без будь-якої фармакологічної корекції; інші 36 щурів віднесли до 3-ї групи, у якій використовували рубоксістаурин - інгібітор протеїнкінази С. Препарат додавали в питну воду в дозі 32 мг/кг, яка відповідає IC50 – інгібуючій концентрації, що викликає 50% зниження активності ферменту (Idris I., 2006). Інгібітор ПкС призначали через 2 тижні після введення алоксану. В якості групи порівняння для щурів 2-3 групи використовували 10 інтактних гіпореактивних щурів.

Цукровий діабет моделювали через 16 годин після останнього годування тварин шляхом ін’єкції у хвостову вену алоксану з розрахунку 16 мг/кг маси тіла (Bagby S. P., 2007). Підтвердженням розвитку інсулярної недостатності вважали підвищення рівня глюкози в крові у межах 12-24 ммоль/л на 14-у добу експерименту. Масу тіла тварин, рівень глікемії й глюкозурії вимірювали до початку експерименту, через 14 діб, 1, 2 й 3 місяці після введення алоксану. У ці ж терміни проводили аналіз стану систем внутрішньоклітинної сигналізації, а також структури й функції нирок.

Гістологічні зрізи нирок забарвлювали гематоксиліном та еозином, толуїдиновим синім, за методом Браше, ван Гізону, виконували PAS-реакцію (Саркисов Д.С., 1996). Оцінювали питомий обсяг (ПО) ниркових тілець (НТ), канальців нефронів і збірних трубок, перитубулярних капілярів, інфільтратів і сполучної тканини інтерстицію. Визначали діаметри НТ і судинного клубочка (СК), ширину сечового простору капсули Боумена, розраховували абсолютний обсяг НТ і СК (Matsumoto T., 1998). На підставі цього всі НТ ранжували на нормальні; гіпертрофовані, склерозовані (Dai T. R., 2006). В структурі СК оцінювали ПО гломерулярних капілярів і мезангіума, оцінювали щільність ядер клітин (кількість ядер на одиницю об’єму СК) і серед них подоцитів, ендотеліоцитів, мезангіальних клітин. Визначали ПО тубулярних профілів з нормальною будовою, гіпертрофією, ознаками клітинної й внутрішньоклітинної регенерації, дистрофічними змінами, проявами некрозу й апоптозу клітин (Evangelista C., 2006).

ШКФ розраховували за кліренсом креатиніну (Карпенко В. С., 1977). Концентрацію креатиніну в пробах крові і сечі визначали фотометрично на спектрофотометрі СФ-46 в реакції з пікриновою кислотою. Про канальцеву реабсорбцію судили за показниками екскреторної фракції натрію (EFNa) і води (EFН2О), кліренсу натрію (CNa). Концентрацію натрію в плазмі та сечі визначали методом полум’яної фотометрії. Проксимальну канальцеву реабсорбцію оцінювали за максимальною реабсорбцією глюкози (TGm) (Шюк О., 1981). Рівень глюкози в плазмі крові та сечі визначали глюкозооксидазним методом. Оцінку функціонування ТВЧПГ проводили на підставі аналізу кліренсу води, вільної від натрію (CNaН2O). Розраховували показники реабсорбції осмотично вільної води (TCH2O), кліренсу осмотично активних речовин (Cosm) і концентраційного індексу (Uosm/Posm). Осмолярність плазми крові та сечі оцінювали кріоскопічним методом на осмометрі “ОМКА-1Ц-01”. Всі показники розраховували за загальноприйнятими формулами (Наточин Ю. В., 1974).

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали на комп’ютері Pentium-III у середовищі Windows-ХР з використанням пакетів статистичних програм Statistica та MedStat (Лях Ю.Е., 2003) за допомогою варіаційного, кореляційного, регресійного, одно- і багатофакторного дисперсійного аналізу. Оцінювали характер розподілу ознаки, середнє арифметичне, стандартну помилку, середньо-квадратичне відхилення, коефіцієнти кореляції, критерії регресії, дисперсії, Стьюдента, Вілкоксона-Рао, Xi-квадрат і ступінь вірогідності статистичних показників (Гланс С., 1999). Вірогідність розходжень показників між експериментальними групами і контролем оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

 **Результати дослідження та їх обговорення.** В інтактних щурів 1-ї групи ЕС50 АДФ становила 5,0±0,31 мкМ. Додавання в інкубаційну суміш ТФЗ супроводжувалося підвищенням АТ на 16,3±0,6% (р<0,05). Стимуляція й інгібування еNOS під дією L-аргініну й L-NAME вели до зміни АТ відповідно на 18,4±0,8% й 17,9±0,7% (р<0,05). Пригнічення активності ГЦ супроводжувалося підвищенням індукованої АТ на 18,3±0,9%, тоді як модулюючий ефект теофіліну досягав 13,2±0,4% (р<0,05). При введенні Н89 АДФ-індукована АТ збільшувалася на 8,2±0,23% (р<0,05), а стауроспорин знижував даний показник на 7,8±0,31% (р<0,05).

За умов експериментального ЦД у тварин 1-ї групи на 14 добу відзначалося підвищення активності системи eNOS–Протеїнкіназа G. Ефекти стимулятора й інгібітору eNOS у тесті in vitro були відповідно на 38,59% нижче й 40,22% вище, ніж в інтактних щурів (p<0,01). Активність ГЦ виявилася на 48,63% вище, ніж у контролі (p<0,01). Активація сигнальної системи eNOS-Протеїнкіназа G була обумовлена одночасною стимуляцією Са2+-кальмодуліна й протеїнкінази А. Про це свідчило посилення ефекту ТФЗ і Н89 відповідно на 24,53% й 42,68% (p<0,01) порівняно з показниками в інтактних щурів. Активність ФДЕ й ПкС, судячи з ефектів ТФ і стауроспорина, мало відрізнялися від контрольних значень. Через 1 місяць після введення алоксану в нормореактивних щурів зберігалася висока активність всіх ланок сигнального ланцюжка eNOS-ПкG. Ефект L-NAME був на 14,74% вище, ніж у попередній термін дослідження (p<0,05), і на 60,89% (р<0,01) перевищував контроль. Але при цьому фактично вичерпаною виявилася резервна потужність eNOS: додавання в інкубаційну суміш L-аргініну знижувало АТ лише на 8,1±0,2% (тобто в 2,27 рази нижче, ніж в інтактних щурів; p<0,001). Зіставлення ефектів ТФЗ й L-NAME свідчило про роль не тільки Са2+-кальмодуліну, але й незалежних від Са2+ механізмів регуляції eNOS. Відзначено підвищення активності ПкА на 28,2% у порівнянні з попереднім терміном дослідження (p<0,01), що на 82,93% перевищувало показник в інтактних щурів (p<0,001); приріст ефекту ТФЗ був менш значним - 11,33% (p<0,05). Ефект теофіліну на АТ зріс на 25,18% у порівнянні з попереднім терміном дослідження й на 31,82% перевищував такий в інтактних щурів (p<0,01). Ефект стауроспорина виявився на 12,19% більш виразним, ніж на 14-у добу, й на 17,94% перевищував показник у контролі (p<0,05). Через 2 місяці після введення алоксану відзначено зниження ефективності Са2+-залежної стимуляції eNOS: ефект ТФЗ був на 19,01% нижчим за такий в інтактних щурів (p<0,05). Це супроводжувалося падінням активності eNOS - ефект L-NAME виявився на 29,61% (p<0,01) нижче контролю. Закономірно, що при цьому ефект Н89 став в 2,4 рази нижчим, ніж у попередній строк дослідження (p<0,001) і був на 24,39% меншим за показник в інтактних щурів (p<0,05). На відміну від цього, вплив стауроспорину на АТ зріс на 71,74% (p<0,01) у порівнянні з попереднім місяцем, й практично в 2 рази перевищував контрольні дані (p<0,001). Активність ГЦ знижувалася до показника в інтактних щурів. Але при цьому ефект теофіліну на АДФ-індуковану АТ виявився на 44,69% вищим, ніж у здорових тварин (p<0,01), прямо корелюючи з ефектами стауроспорину (r=0,840; p<0,01). Таким чином, через 2 місяці в нормореактивних щурів можна констатувати порушення внутрішньо-клітинних механізмів адаптації до дії патогенетичних факторів ЦД.

Під час морфологічного дослідження нирок нормореактивних щурів через 14 діб після ін’єкції алоксана визначено гіперперфузію СК переважно суперфіційної зони кіркової речовини. В них ПО капілярів зріс на 11,52% (p<0,05), простір капсули Боумена розширився на 6,36% (p<0,05). Це супроводжувалися підйомом ШКФ на 15,17% (p<0,05). Однак при цьому EFН2О и EFNa не відрізнялися статистично значуще від контролю, що свідчить про інтенсифікацію канальцевої реабсорбції. Гістологічний аналіз канальців нирки виявив розвиток гіпертрофії в 14,8±1,2% ПЗК. У багатьох клітинах тубулярного епітелію в кірковій речовині мали місце ознаки активації ядра й синтетичних процесів у цитоплазмі. Це пояснювало підвищення ТGm на 63,63% (p<0,01) у порівнянні з контролем. Через 1 місяць ЦД розвивалася гіпертрофія нирок. Абсолютний обсяг НТ виріс на 29,58%, щодо такого у попередній термін дослідження (p<0,01) за рахунок збільшення ПО капілярів та мезангіальних клітин відповідно на 30,11% (p<0,01) і 18,79% у порівнянні з контролем (p<0,05). На цьому фоні приріст ШКФ склав 16,59% (p<0,05). На фоні стимуляції неоангіогенезу в кірковій речовині зареєстровано значну гіпертрофію ПЗК. Їх ПО зріс на 77,7% у порівнянні з попереднім терміном дослідження (p<0,001). Паралельно в деяких канальцях відзначено вакуолізацію цитоплазми, деструкцію щіточкової облямівки, перинуклеарний набряк і пікноз ядер епітеліоцитів. Але функціонально мало місце компенсаторне підвищення транспортних процесів в нефронах. Показник ТGm був в 2 рази вищим, ніж у інтактних щурів (p<0,001). Зростаюче об’ємне завантаження нефронів призвело до підсилення транспортних процесів у ТВЧПГ: CNaН2O зріс на 29,60% у порівнянні з попереднім терміном і на 35% перевищував контроль (p<0,01). Протягом 2 місяця алоксанового діабету було відзначене підвищення ПО НТ із явищами гіпертрофії на 81,37% (p<0,01), а абсолютний обсяг НТ перевищив контрольний показник на 48,81% (p<0,01). Незважаючи на це ПО капілярів у СК знизився на 17,18% відносно показника в попередній місяць (p<0,05), але залишався на 7,76% вище контролю (p<0,05). Редукція гломерулярних капілярів була асоційована з експансією мезангіума, ПО якого виріс на 21,49% порівняно з попереднім терміном і на 44,29% - з контролем (p<0,01). Підвищення ШКФ на 17,15% протягом 2-го місяця (p<0,05) було асоційоване із порушенням цілісності фільтраційного бар’єра та розвитком протеїнурії. Зміни в гломерулі супроводжувалися зниженням транспортних процесів у канальцях нирок. Відзначене зростання EFН2О и EFNa відповідно на 21,71% й 30,17% порівняно з попереднім терміном дослідження (p<0,01). Морфологічно це було пов’язане з порушенням перитубулярної мікроциркуляції та цілісності ендотелію. В периваскулярному інтерстиції на фоні набряку відзначене підвищення інфільтрації лейкоцитами та активація проліферації фібробластів. ПО сполучної тканини й інфільтратів виросли відповідно на 9,52% (p<0,05) і 99,5% у порівнянні з попереднім строком дослідження (p<0,001). Це призвело до підвищення ПО канальців з дистрофією й некрозом відповідно на 59,8% (p<0,01) і 87,5% (p<0,001). ПО канальців з явищами регенерації знизився на 17,24% (p<0,05), хоча, як і раніше, перевищував показник у контролі. Описані зміни прогресували до кінця 3-го місяця. Ключовими ознаками нефропатії у цей термін дослідження було підвищення ПО склерозованих НТ на 7,3% порівняно з попереднім місяцем (p<0,05) і ПО мезангіума на 73,05% (p<0,01), порівняно з контролем, що вело до посилення протеїнурії до 336,9±32,1 мг/добу. Зниження ПО гіпертрофованих канальців супроводжувалося підвищенням ПО канальців з дистрофічними й деструктивними змінами – відповідно на 30,6% й 41,3% (p<0,01). Результатом цього стало виразне підвищення діурезу на фоні стабілізації ШКФ. За 3-й місяць EFН2О и EFNa виросли відповідно на 19% й 24% (p<0,05), у результаті чого виявилися на 45,64% й 65,5% вище контролю (p<0,01). Одним з факторів підвищення екскреції було обмеження резервних можливостей ТВЧПГ - CNaН2O за минулий місяць знизився ще на 17% (p<0,05). Таким чином, у тварин 1-ї групи протягом 1-го місяця розвивається компенсаторна реакція, що пов’язана з активацією сигнальної системи eNOS-ПкG. Розвиток ренальних дисфункцій через 2 місяці діабету був асоційований зі зниженням активності eNOS, ГЦ і ПкА при активації ПкС і ФДЕ.

У гіпореактивних тварин відзначена активація сигнальної системи eNOS-ПкG через 14 діб експерименту. Однак вже через 1 місяць зареєстроване зниження активності eNOS. Ефект L-NAME був на 40,28% й 24,09% (p<0,01) нижчим за такий у попередній термін дослідження й у інтактних щурів. При цьому активність ПкА була на 54,12% нижчою, ніж у попередній строк дослідження, на 43,18% меншою за вихідний рівень (p<0,01) і в 3 рази відрізнялася від показника в 1-й групі. Ефект стауроспорину навпаки виявився на 53,49% більшим, ніж у попередній строк дослідження й на 67,08% перевищив контрольний рівень (p<0,01). На фоні зниженої активності eNOS у щурів 2-ї групи підтримувався відносно високий рівень ГЦ (на 16,2% вище за показник в інтактних щурів; p<0,05). Активність ФДЕ виросла на 26,57% і перевищувала вихідний рівень на 38,16% (p<0,01), таким чином обмежуючи внутрішньоклітинний пул циклічних нуклеотидів й активацію ПкG. Протягом 2 місяця зниження активності всіх ланок сигнального ланцюжка еNOS-ПкG відбувалося на фоні прогресуючої гіперстимуляції ПкС і ФДЕ. Внаслідок цього наприкінці 3 місяця алоксанового діабету дефіцит базальної активності та резервної потужності eNOS склав відповідно 48,6% і 73,37% відносно показників у інтактних щурів (p<0,01). Активність ГЦ зменшилася на 14,88% відносно попереднього терміну дослідження й була на 21,86% нижчою за контроль (p<0,05). Рівень активності ПкС і ФДЕ перевищив контрольні значення відповідно на 103,6% й 54,19% (p<0,001).

Морфологічним проявом цих патохімічних розладів був ранній розвиток гіпертрофії нирок. Через 14 діб визначено підвищення абсолютного обсягу НТ на 31,66% (p<0,01) у порівнянні з контролем і на 12% (p<0,05) відносно 1-ї групи. Приріст ШКФ був вищим, ніж в 1-й групі (18,82%; p<0,05). Відзначено більш виразне, ніж у нормореактивних тварин, підвищення проксимальної реабсорбції - ТGm була на 15,32% вищою за показник в 1-й групі (p<0,05). І нарешті ‑ виявлена рання компенсаторна реакція ТВЧПГ – CNaН2O до 14 доби виріс на 19,26% у порівнянні з контролем (p<0,05). Через 1 місяць міжгрупові відмінності були більш значимими й виражалися в зміні балансу між компенсаторними й патологічними процесами в нирках. Відзначено набряк та інфільтрацію ренального інтерстицію. ПО гіпертрофованих НТ виріс більш, ніж в 2 рази, у порівнянні з попереднім терміном дослідження, і на 58,82% перевищував показник в 1-й групі (p<0,01). Потовщення базальної мембрани гломерулярних капілярів супроводжувалося активацією мезангіуму, ПО якого був на 15,15% вищим, ніж у нормо реактивних щурів (p<0,05). Зміни в канальцевому апарату проявлялися посиленням гіпертрофії і розвитком дистрофії в клітинах тубулярного епітелію. ПО канальців з дистрофічними змінами виріс більш, ніж в 2,5 рази у порівнянні з попереднім терміном й був на 80,43% вищим, ніж у щурів 1-ї групи (p<0,001). В цей термін зареєстровано значний приріст діурезу – 36,96% порівняно з попереднім терміном дослідження (p<0,01). Провідною причиною цього було зменшення канальцевої реабсорбції на фоні протеїнурії. Остання досягала 154,19±7,6 мг/добу, що було майже в 3 рази вище за показник у нормореактивних щурів в цей же термін дослідження. Екскреторна фракція води і натрію зросли відповідно на 15,4% й 22,8% (p<0,05), і на 9,98% і 14,46% перевищували показники в 1-й групі (p<0,05). Наслідком цих змін було зростання СNa на 45,4% відносно контролю (p<0,01).

Через 2 місяці в НТ зафіксовано зниження ПО гломерулярних судин (на 21,86% у порівнянні з попереднім строком дослідження; p<0,05; і на 21,18% відносно 1-ї групи; p<0,05) та збільшенням ПО мезангіуму (який був на 7,09% вищим, ніж в 1-й групі; p<0,05; і на 65,96% перевищував контроль; p<0,01). Зареєстроване чергування зон альтерації та ремоделю-вання кіркової речовини діабетичних нирок, що супроводжувалося зростанням ПО інфільтратів практично в 2 рази порівняно з попереднім терміном дослідження і на 69,59% до показника у нормореактивних щурів. На цьому фоні зареєстровано стабілізацію ШКФ за умов протеїнурії та зниження канальцевої реабсорбції. Максимальної виразності функціональні розлади в нирках гіпореактивних щурів були зафіксовані до кінця 3 міс. В цей термін зареєстроване зниження ШКФ на 12% порівняно з попереднім терміном і на 17,1% відносно 1-ї групи на фоні прогресування протеїнурії, рівень якої практично в 1,54 рази був вище показника у нормореактивних щурів. Крім того, протягом 3 міс відзначено розвиток фіброзу, асоційованого зі зниженням проксимальної й дистальної канальцевої реабсорбції та обмеженням механізмів осморегуляції. Тобто у гіпореактивних щурів гіперстимуляція ПкС через 1 міс веде до розвитку діабетичної нефропатії за рахунок зниження активності сигнальної системи eNOS-ПкG, порушення структурно-функціонального стану нирок внаслідок мікроциркуляторних розладів, мезангіальної експансії і протеїнурії, розвитку запальної реакції та тубуло-інтерстиційного ушкодження, що прогресували до кінця 3 місяця експерименту.

В 3-й групі за умов інгібування ПкС відзначено пролонгування адаптаційного підйому активності eNOS і ГЦ до кінця 1 міс. Ефект L-NAME й інгібітору ГЦ був на 76,19% й 62,56% (p<0,01) вищим, ніж у 2-й групі. Це було пов’язане з посиленням Са2+-кальмодулін і ПкА залежної модуляції активності сигнальної системи eNOS-ПкG. Вплив ТФЗ був на 55,93% (p<0,01) вищим, ніж у 2-й групі. Модулюючий ефект Н89 виявився на 24,77% вищим, ніж у попередній строк дослідження (p<0,01), і перевищував значення показника у контролі та у 2-й групі відповідно на 54,55% й в 2,7 рази (p<0,001). Через 2 місяці алоксанового діабету інгібітор ПкС обмежував пригнічення сигнальної системи eNOS-ПкG. Ефект ТФЗ виявився на 32,61% вищим за показник у тварин 2-ї групи (p<0,01). Незважаючи на зниження активності eNOS на 39,64%, остання була на 38,14% (p<0,01) вищою, ніж у 2-й групі. Активність ПкА залишалася на 12,5% більшою, ніж в інтактних тварин (p<0,05), і в 2,35 рази перевищувала показник у щурів 2-ї групи (p<0,001). Активність ГЦ за 2-й міс зменшилась на 35,74% (p<0,01), але перевищувала аналогічний показник у 2-й групі на 11,31% (p<0,05). На відміну від цього ефект теофіліну виріс незначно – на 5,96% (p>0,05) — і був на 19,19 % нижчим, ніж в 2-й групі (p<0,05). Через 3 місяці у щурів 3-ї групи, на відміну від тварин 1-ї й 2-ї груп, зниження ефектів ТФЗ й L-NAME носило недостовірний характер. Ці показники були на 22,36% й 22,89% нижчими, ніж у контролі (p<0,05), але перевищували показники у 2-й групі відповідно на 34,09% й 39,13% (p<0,01). Ефект Н89 знизився на 29,29% (p<0,01) і став на 20,45% нижчим за контроль (p<0,05), проте, був на 84,4% вищим за показник у тварин 2-ї групи (p<0,001). Виявлено зниження активності ГЦ на 17,61% у порівнянні з попереднім строком дослідження (p<0,05), але даний показник був на 11,18% й 7,43% вищим, ніж у 2-й й 1-й групах відповідно (p<0,05). При цьому активність ФДЕ була на 11,38 й 10,05% нижчою, ніж відповідно у 2-й та 1-й групах (p<0,05). Цей факт із урахуванням зареєстрованої активності ГЦ свідчить про більш високий внутрішньоклітинний рівень цГМФ, що може стримувати приріст внутрішньоклітинного Са2+ й явища оксидативного стресу. Таким чином, інгібування ПкС запобігає розвитку ендотеліальної дисфункції. Морфологічно це проявлялося зміною програми ремоделювання НТ. Розміри НТ через 1 місяць були на 11,3% нижчими, ніж у 2-й групі, що було пов’язане із обмеженням активації мезангіальних клітин. Через 2 місяці після моделювання експериментального діабету об’єм НТ був на 36% вищим, ніж у гіпореактивних щурів без корекції. Цей ефект був пов’язаний з підтриманням високого ПО гломерулярних капілярів при низьких значеннях ПО мезангіуму. Ці дані відбивають роль ПкС у розвитку мезангіальної експансії й гломерулосклерозу за умов ЦД. Крім того, відзначене зниження ПО інфільтратів на 38,2% та ПО канальців з дистрофічними явищами (на 30%; p<0,05). Аналіз функціонального стану нирок у щурів 3-ї групи показав, що інгібування ПкС через 1 міс експерименту веде до зниженнядіуретичної реакції за рахунок обмеження ступеня гіперфільтрації й підтримання оптимальної канальцевої реабсорбції. Позитивний ефект на фільтрацію проявлявся також зниженням ступеня протеїнурії. Концентрація білка в сечі щурів 3-ї групи через 1 місяць експерименту була на 85,5%, а через 2 місяці – в 2,1 рази нижчою за таку у гіпореактивних щурів без корекції. При цьому розходження з показниками у нормореактивних щурів носили недостовірний характер. Аналіз транспортних процесів виявив підтримання високої проксимальної реабсорбції протягом 3 місяців й тривалий компенсаторний підйом гіпоосмотичної реабсорбції у ТВЧПГ.

Таким чином, інгібування ПкС у гіпореактивних щурів за умов ЦДоптимізує роботу внутрішньоклітинних сигнальних систем, знижує виразність мікроциркуляторних порушень, гломерулосклерозу та запальної інфільтрації строми, гіпертрофії і дистрофії канальців, що обмежує ренальні дисфункції. Отримані результати свідчать про роль гіперстимуляції ПкС у розвитку ендотеліальної дисфункції та порушенні структурно-функціонального стану нирок за умов дії патогенетичних факторів ЦД. Ці факти можуть бути використаними для прогнозування розвитку ДН і розробки методів фармакологічної корекції й профілактики ренальних дисфункцій за умов ЦД.

**ВИСНОВКИ**

 У дисертаційній роботі проведене теоретичне узагальнення й нове рішення актуальної та мало вивченої наукової задачі, що полягає в з’ясуванні ролі сигнальної системи eNOS-протеїнкіназа G і протеїнкінази С у патогенезі ренальних дисфункцій за умов цукрового діабету залежно від індивідуальних особливостей експресії eNOS.

1. На суспензії тромбоцитів у інтактних тварин зареєстровані індивідуальні особливості резервної потужності еNOS (в 1-й групі – 15-20% – нормореактивні щури; в 2-й групі – 4-9% – гіпореактивні тварини), що визначає реактивність організму на дію патогенетичних факторів ЦД.

2. У нормореактивних щурів протягом 1 місяця після моделювання алоксанового діабету стимуляція сигнальної системи eNOS-ПкG забезпечується Са2+-кальмодулін- і ПкА-залежними механізмами; при цьому формується гіпертрофія нирок, зростає ШКФ (на 35%; p<0,01) і реабсорбція глюкози (на 103%; p<0,001). Через 3 міс пригнічення системи eNOS-ПкG на фоні активації ПкС і ФДЕ супроводжувалося мезангіальною експансією, альтерацією канальців та інфільтрацією строми, розвитком протеїнурії (336,96±32,1 мг/добу) і підвищенням EFH2O й EFNa на 45,6% і 65,5% відносно контролю (p<0,01).

3. У гіпореактивних щурів через 14 діб виявлена компенсаторна активація eNOS і через 1 міс – зниження її активності (на 24,09% порівняно з контролем; p<0,01) внаслідок обмеження ПкА-залежного механізму та стимуляції ПкС. Прогресуюче пригнічення сигнальної системи eNOS-ПкG і ПкА до кінця 3 місяця було пов’язане з гіперактивністю ПкС і ФДЕ (на 103,6% і 54,19% більше, ніж у інтактних щурів; p<0,001).

4. У гіпореактивних тварин відзначено ранню (на 14 добу) гіпертрофію ниркових тілець і проксимальних канальців. Через 1 місяць мали місце проліферація мезангіальних клітин і розвиток протеїнурії (в 2,83 рази вище, ніж у нормореактивних щурів; p<0,001), інфільтрація строми та дистрофія тубулярного епітелію. Через 3 місяця відзначене зменшення ШКФ, зниження реабсорбції у ТВЧПГ і осмоконцентрування (СNaН2O – на 29,17%; ТСН2О/V – на 9,82% менше контрольних значень; р<0,05).

5. Інгібування ПкС у гіпореактивних щурів за умов алоксанового діабету запобігало ранньому порушенню функціонування внутрішньоклітинного сигнального шляху eNOS-ПкG. Цей ефект був пов’язаний з підтриманням активності ПкА і ГЦ, які наприкінці 3 місяця перевищували аналогічні значення у 2-й групі (відповідно на 84,4% і 11,18%; p<0,05), та запобіганням стимуляції ФДЕ (активність була на 11,38% нижчою за таку у 2-й групі; p<0,05).

6. Використання інгібітору ПкС у ранній термін діабету (через 1 міс) обмежувало протеїнурію (на 85,5%; p<0,001); гіпертрофію нирок і приріст реабсорбції глюкози у ПЗК. Через 2 міс відзначене зниження інфільтрації строми нирки (на 38,2% порівняно з 2-ю групою; p<0,01) і альтерації канальців (на 30% нижче, ніж в 2-й групі; p<0,01). Через 3 міс ефект інгібітору ПкС проявлявся зниженням гломерулосклерозу, протеїнурії (в 2,1 рази; p<0,001) і тубуло-інтерстиційного ушкодження.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА
 ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

 1. Баринов Э.Ф. Адаптационные реакции почек в условиях функциональных нагрузок у крыс / Э.Ф. Баринов, В.В. Волошин, *Х. Григорян* // Вестн. неотл. и восстановит. мед. – 2007. – Т. 8, № 2. – С. 264-267 *(дисертант особисто виконав експериментальні дослідження, провів статистичну обробку та аналіз отриманих результатів)*.

 2. Баринов Е.Ф. Морфогенез ниркових тілець у щурів з різною потужністю ендотеліальної NO-синтази за умов моделювання цукрового діабету / Е.Ф. Баринов, В.М. Гузенко, *Х. Григорян* // Здобутки клін. і експерим. мед. – 2007. – № 2. – С. 18-20 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, проаналізував морфологію ниркових тілець за умов цукрового діабету, провів статистичну обробку та аналіз результатів).*

 3. Баринов Э.Ф. Роль NO в развитии тубуло-интерстициальных нарушений при диабетической нефропатии у крыс / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян*, Б.П. Терещук // Акт. пробл. трансп. мед. – 2007. – Т. 9, № 3. – С.116-120 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, проаналізував морфологію канальців та інтерстицію нирки за умов цукрового діабету, провів статистичну обробку та аналіз результатів).*

 4. Баринов Э.Ф.Состояние различных звеньев сигнального пути еNOS–протеинкиназа G при аллоксановом диабете / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян* // Медицина сьогодні і завтра. – 2007, № 4. – С. 23-26 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, провів статистичну обробку даних)*.

 5. Баринов Э.Ф. Состояние систем внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крыс при моделировании сахарного диабета 1 типа: зависимость от индивидуальных особенностей резервной мощности eNOS / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян* // Таврический мед.-биол. вестник. – 2007.– Т. 10, № 4. – С. 137-140 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, провів статистичну обробку даних)*.

 6. Баринов Э.Ф. Протеинкиназа С при сахарном диабете – роль в развитии эндотелиальной дисфункции у крыс с различной исходной активностью eNOS / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян*, О.Н. Сулаева // Cвіт мед. та біол. – 2008. — № 1. — С.6-9 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, провів статистичну обробку даних)*.

 7. Баринов Э.Ф. Роль eNOS в патоморфозе сосудистых клубочков почек крыс при сахарном диабете / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян*, О.Н. Сулаева // Морфология. – 2008. – Т. 11, № 1. – С. 29-32 *(дисертант виконав експерименти, провів морфометричну оцінку ниркових тілець, статистичну обробку та аналіз результатів)*.

 8. Баринова М.Э.Влияние ингибитора ПкС на состояние внутриклеточного сигнального пути eNOS-Протеинкиназа G тромбоцитов крыс при сахарном диабете / М.Э. Баринова, *Х. Григорян*, О.Н. Сулаева, Л.И. Хламанова // Акт. проблеми. сучасної медицини. – 2008. – Т. 8, № 3. – С. 197-200 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз та статистичну обробку даних)*.

 9. Баринов Э.Ф. Влияние рубоксистаурина на морфогенез канальцев почки при сахарном диабете у крыс с низкой исходной экспрессией eNOS / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян* // Укр. Мед. Альманах. – 2008. – Т. 11, № 1. – С. 17-19 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, провів морфометричну оцінку ниркових канальців, статистичну обробку та аналіз результатів)*.

 10. Григорян Х. Функциональное состояние почек крыс при сахарном диабете: зависимость от активности eNOS / *Х. Григорян* // Укр. Мед. Альманах. – 2008.– Т. 11, № 2. – С. 52-54.

 11. Баринов Э.Ф. Модуляция тубуло-интерстициальных отношений при диабетической нефропатии путем ингибирования протеинкиназы С / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян*, О.И. Николенко // Вісник морфол. – 2008. – Т. 14, № 1. – С. 55-58 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, провів морфометричну оцінку діабетичних нирок, статистичну обробку та аналіз результатів)*.

 12. Григорян Х. Морфометрична характеристика ниркових тілець щурів в динаміці розвитку діабетичної нефропатії / *Х. Григорян* // Питання експерим. та клін мед. — 2007. —Т. 1, Вип. 11. — С. 132-137.

 13. Григорян Х. Снижение мезангиальной экспансии при диабетической нефропатии: эффекты ингибитора протеинкиназы С / *Х. Григорян* // Питання експерим. та клін мед. — 2008. Т. 1, Випуск 12. – С. 111-116.

 14. Гузенко В.Н. Структурно-функциональное состояние сосудистых клубочков почки при диабетической нефропатии у крыс с различной активностью eNOS / В.Н. Гузенко, *Х. Григорян*, Э.Ф. Баринов // Бюл. V читань ім. В.В. Підвисоцького. – Одеса. — 2007. — С.61-62 *(дисертант виконав експерименти, провів морфометричне дослідження нирок, статистичну обробку та аналіз результатів)*.

 15. Баринов Э.Ф. Состояние канальцевого аппарата почки при диабетической нефропатии у крыс с индивидуальными особенностями экспрессии eNOS / Э.Ф. Баринов, *Х. Григорян* // Патогенез. – 2007.– Прил. – С. 6 *(дисертант виконав експериментальні дослідження, провів структурно-функціональну оцінку ренальних канальців за умов діабетичної нефропатії, статистичну обробку та аналіз результатів).*

**АНОТАЦІЯ**

**Грігорян Х. Патогенез ренальних дисфункцій за умов алоксанового діабету у щурів з різною активністю eNOS і протеїнкінази С.- Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за фахом 14.03.04 - патологічна фізіологія. - Донецький національний медичний університет ім. М. Горького МОЗ України, Донецьк, 2008.

Дисертаційна робота присвячена встановленню ролі внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS-протеїнкіназа G і протеїнкінази С у патогенезі ренальних дисфункцій за умов алоксанового діабету. У тварин з нормальною резервною потужністю eNOS протягом 1 місяця після ін’єкції алоксану зареєстровано активацію системи eNOS-ПкG, що супроводжувалося гіпертрофією нирок, неоангіогенезом, підвищенням ШКФ, реабсорбції глюкози та електролітів. Однак через 2 місяці відзначено пригнічення продукції NO на фоні зростання активності ПкC і ФДЕ, активація мезангіуму, порушення мікроциркуляції, альтерація канальців, інфільтрація лейкоцитами та ініціація фіброзу. У гіпореактивних щурів зниження активності eNOS-ПкG та ПкА на фоні гіперстимуляції ПкС і ФДЕ відбувалося вже через 1 місяць алоксанового діабету, і було асоційоване з швидким розвитком гломерулосклерозу та тубуло-інтерстиціального ушкодження. Інгібітор ПкС оптимізував роботу внутрішньоклітинного сигнального шляху eNOS-ПкG, обмежував ступінь гіпертрофії нирок, запобігав порушенню мікроциркуляції, зменшував мезангіальну експансію та протеїнурію, ушкодження канальців та запалення, що визначило покращення функціональних показників діяльності діабетичних нирок.

**Ключові слова**: цукровий діабет, ренальні дисфункції, eNOS, Протеїнкіназа С.

**АННОТАЦИЯ**

 **Григорян Х. Патогенез ренальних дисфункций при аллоксановом диабете у крыс с различной активностью eNOS и протеинкиназы С. – Рукопись.**

 Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09. – патологическая физиология. – Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького МЗ Украины, Донецк, 2008.

Диссертационная работа посвящена актуальной и мало изученной задаче – изучению роли внутриклеточного сигнального пути eNOS–Протеинкиназа G и Протеинкиназы С в развитии ренальных дисфункций при аллоксановом диабете. До моделирования диабета в тестах in vitro на суспензии тромбоцитов оценивали резервную мощность eNOS на основании анализа эффекта L-аргинина на АДФ-стимулированную агрегацию тромбоцитов. Животных распределили на нормореактивных (1-я группа) и гипореактивных. Последние составили две группы: без коррекции (2-я группа) и с ингибированием ПкС рубоксистаурином (3-я группа). Моделирование сахарного диабета проводили путем инъекции аллоксана в хвостовую вену. Состояние сигнальной системы eNOS-Протеинкиназа G, активность фосфодиэстераз, протеинкиназы А и С, функцию и морфологию почек оценивали через 14 суток, 1, 2 и 3 месяца после введения аллоксана.

У нормореактивных крыс через 14 суток наблюдалась активация сигнальной системы eNOS-Протеинкиназа G за счет стимуляции Са2+-кальмодулина и протеинкиназы А. Как следствие, возрастала перфузия почечных телец, СКФ и проксимальная канальцевая реабсорбция. Через 1 мес выявлен максимальный уровень активности eNOS и гуанилатциклазы. Морфологически отмечено повышение УО гломерулярных и перитубулярных капилляров, неоангиогенез, гипертрофия ПИК, пролиферация клеток тубулярного эпителия. Это сопровождалось нарастанием СКФ и компенсаторным приростом транспорта в ПИК и ТВЧПГ. Однако, через 2 месяца отмечалось снижение активности eNOS, ПкА и ГЦ при стимуляции ПкС и ФДЭ. Морфологическое исследование обнаружило микроциркуляторные нарушения, активацию мезангиума, снижение УО гломерулярных капилляров, повышение УО канальцев с явлениями дистрофии и УО инфильтратов, а также пролиферацию фибробластов. Данные явления прогрессировали до конца 3 мес, сопровождаясь развитием протеинурии и снижением канальцевого транспорта.

У гипореактивных крыс подъем активности системы eNOS-Протеинкиназа G был кратковременным и через 1 мес сменялся развитием эндотелиальной дисфункции, проявляющейся снижением активности eNOS и ПкА, гиперстимуляцией ПкС и ФДЭ. При морфологическом исследовании почек в этот срок наблюдали вазодилятацию, интерстициальный отек, периваскулярные инфильтраты, выраженную гипертрофию ПТ и дистрофию канальцев. Повышение СКФ на фоне активации мезангиума сопровождалось развитием протеинурии. К концу 2 мес прогрессирование эндотелиальной дисфункции на фоне гиперстимуляции ПкС было сопряжено с развитием мезангиальной экспансии при редукции гломерулярных сосудов, нарушением перитубулярной микроциркуляции, прогрессированием тубуло-интерстициального повреждения. Следствием этого было снижение реабсорбции в ТВЧПГ, а к концу 3-го месяца – и в ПИК. Ингибирование Протеинкиназы С у гипореактивных крыс 3-й группы оптимизировало состояние внутриклеточной сигнальной системы eNOS-Протеинкиназа G за счет поддержания ПкА-зависимого механизма стимуляции eNOS и предотвращения гиперактивации фосфодиэстераз. В результате ограничивалась степень гипертрофии ПТ и ПИК. Абсолютный объем ПТ оказался через 1 мес на 11,3% (p<0,05), а через 2 мес - на 36% выше (p<0,01), чем у крыс 2-й группы за счет ограничения мезангиальной экспансии и редукции гломерулярных капилляров. Ингибирование ПкС через 2 мес вело к снижению УО инфильтратов на 38,2% и УО канальцев с дистрофическими явлениями на 30% в сравнении со 2-й группой (p<0,01). При этом уменьшался УО гипертрофированных канальцев, но выше оказался регенераторный потенциал почек. Анализ функционального состояния диабетических почек у крыс 3-й группы показал, что через 1 месяц ингибирование ПкС ведет к снижениюдиуретической реакции за счет ограничения степени гиперфильтрации и протеинурии при поддержании канальцевой реабсорбции. Концентрация белка в моче у крыс 3-й группы через 1 мес эксперимента была на 85,5%, а через 3 месяца – в 2,1 раза ниже таковой у гипореактивных крыс без коррекции.

Таким образом, индивидуальные особенности экспрессии eNOS определяют параметры пространственно-хронологического ремоделирования почек при действии патогенетических факторов сахарного диабета. Гиперстимуляция ПкС у гипореактивных крыс определяет раннее развитие синдрома эндотелиальной дисфункции и является фактором риска развития диабетической нефропатии. Ингибирование ПкС оптимизирует работу внутриклеточных сигнальных систем, снижает выраженность микроциркуляторных изменений, гломерулосклероза и тубуло-интерстициального повреждения, что ограничивает нарушение функции почек при СД.

**Ключевые слова**: сахарный диабет, ренальные дисфункции, eNOS, Протеинкиназа С.

**SUMMARY**

**Grigoryan H. Pathogesis of renal dysfunction under alloxan dibetes in rats with different activity of eNOS and proten kinase С.– Thesis.**

The dissertation is for a scientific degree of Candidate of Medical Sciences on the speciality 14.03.04 – pathological physiology.– M. Gorky Donetsk National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Donetsk, 2008.

The dissertation is devoted to the investigation of the role of intracellular signalling system eNOS-protein kinase G and protein kinase C in pathogenesis of renal dysfunction under diabetes mellitus. The activation of eNOS-protein kinase G system was detected in rats with normal primary reserve power of eNOS during 1st month after alloxan injection. It was accompanied with hypertrophy of renal corpuscles and proximal tubules, neoangiogenesis, acceleration of GFR, proximal glucose reabsorption and electrolyte transport in thick ascending limb of Henle“s loop. But after 2 months the decrease of NO production took place which was associated with protein kinase C and phosphodiestherases stimulation. These changes led to mesangial activation, alteration of microcirculation and tubular epithelium dystrophy, infiltration by leukocytes and fibrogenesis. In hyporeactive rats decrease of eNOS-protein kinase G system activity took place just after 1 month of alloxan diabetes and was associated with hyperstimulation of protein kinase C and phosphodiestherases. These pathochemical changes were accompanied with rapid glomerulosclerosis, alteration of renal microvessels, intensive infiltration and tubulo-interstitial nephritis development. Inhibition of protein kinase C in hyporeactive improved the state of intracellular signaling system eNOS-protein kinase G, limited the degree of renal hypertrophy, decrease the alteration of microcirculation, mesangial expansion and proteinuria, tubular damage and interstitial infiltration with leukocytes, which determined the stabilization of diabetic kidneys functional state.

**Key words**: diabetes mellitus, renal dysfunction, eNOS, protein kinase C.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>