

© С.В.Талалаев, А.В.Лепилов, В.П.Булгаков, Я.Ф.Зверев, В.В.Лампатов, Н.В.Лель, Ю.Г.Мотин, 2008
УДК 612.46:612.824]:66.062.59-092.4

С.В. Талалаев, А.В. Лепилов, В.П. Булгаков, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов, Н.В. Лель, Ю.Г. Мотин

ОБРАТИМОСТЬ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА ПОЧКИ КРЫС, ВЫЗВАННЫХ СУБХРОНИЧЕСКИМ ПРИЕМОМ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

S.V. Talalaev, A.V. Lepilov, V.P. Bulgakov, Ya.F. Zverev, V.V. Lampatov, N.V. Lel, Yu.G. Motin

REVERSIBILITY OF STRUCTURAL CHANGES OF THE RATS KIDNEY MEDULLA CAUSED BY SUBCHRONIC INTAKE OF ETHYLENE GLYCOL

Кафедры гистологии, патологической анатомии и фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, отдел биотехнологии Биолого-почвенного института ДВО РАН, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ явилось комплексное морфофункциональное изучение воздействия этиленгликоля на мозговое вещество почки, оценка обратимости вызываемых изменений и особенностей распределения кальциевых депозитов в условиях экспериментального нефролитиаза. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперимент был поставлен на 20 самцах крыс Wistar массой 200-250 г. Все животные были разделены на 4 группы, по 5 крыс в каждой. Крысы 1-й группы получали в качестве питья чистую воду, 2-й группы – 1% раствор этиленгликоля в течение 21 сут., что индуцировало развитие экспериментального нефролитиаза. Животным 3-й группы, предварительно получавшим этиленгликоль на протяжении 21 суток, по окончании этого периода в течение 3-х недель через зонд вводили в желудок в 2%-й крахмальной взвеси препарат из культуры тканей Марены сердцелистной (*Rubia Cordifolia*) в дозе 75 мг/кг. Животные 4-й группы одновременно получали препарат Марены сердцелистной и 1%-й раствор этиленгликоля в течение 21 дня. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показана обратимость морфологической перестройки почки, вызванной субхроническим воздействием этиленгликоля, и протективное действие приема препарата из культуры тканей Марены сердцелистной. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Введение препарата из культуры тканей Марены сердцелистной приводит к обратимости морфологических изменений мозгового вещества почки, вызванных субхроническим приемом этиленгликоля.

Ключевые слова: почка, соли кальция, камнеобразование.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was a complex morpho-functional study of the action of ethylene glycol on the kidney medullary substance, estimation of reversibility of the resulting changes and specificities of the distribution of calcium deposits under conditions of experimental nephrolithiasis. **MATERIAL AND METHODS.** The experiment was carried out in 20 male Wistar rats, body mass 200-250 g. The animals were divided into 4 groups, 5 rats in each. Rats of the 1st group were given pure water, 2nd group – 1% of ethylene glycol during 21 days that induced the development of experimental nephrolithiasis. The 3rd group animals, previously given ethylene glycol during 21 days, after this period received 2% starch suspension with a preparation from tissue culture of *Rubia Cordifolia* in dosage 75 mg/kg during 3 weeks. The 4th group animals simultaneously received the preparation from *Rubia Cordifolia* and a 1% solution of ethylene glycol during 21 days. **RESULTS.** The work has shown reversibility of the morphological alterations in the kidney caused by subchronic effects of ethylene glycol, and protective action of the preparation from tissue culture of *Rubia Cordifolia*. **CONCLUSION.** Administration of the preparation from tissue culture of *Rubia Cordifolia* results in reversible morphological alterations to the medullary substance of the kidney caused by subchronic intake of ethylene glycol.

Key words: kidney, calcium salts, nephrolithiasis.

ВВЕДЕНИЕ

В экономически развитых странах мира до 10% населения страдают мочекаменной болезнью [1–4]. Одним из индукторов нефролитиаза является этиленгликоль, широко используемый в химическом производстве, (производство полиэфирных резин, волокон и пленок). Этиленгликоль содержится в различных антифризах, в том числе и автомобильных, противообледеневаяющих жидкостях, по-

верхностно-активных веществах, сурфактантах и эмульгаторах. Использование соединений этиленгликоля в качестве автомобильных охлаждающих жидкостей, определяет широкий спектр негативных воздействий на человеческий организм. Как показал ряд исследований, при отравлении этиленгликолем чаще всего поражаемым органом является почка. Токсические повреждения этого органа при субхроническом воздействии этиленглико-

ля обусловлены формированием кристаллов оксалата и других соединений кальция [5]. Взаимодействие последних с эпителием почечных канальцев играет значимую роль в патогенезе нефролитиаза.

Целью настоящей работы явилось комплексное морфофункциональное изучение воздействия этиленгликоля на мозговое вещество почки, оценка обратимости вызываемых изменений и особенностей распределения кальциевых депозитов в условиях экспериментального нефролитиаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент был поставлен на 20 самцах крыс Wistar массой 200–250 г. Все животные были разделены на 4 группы, по 5 крыс в каждой. Исследование проведено согласно правилам работы с лабораторными животными. Крысы 1-й группы получали в качестве питья чистую воду, мочекаменная болезнь не инициировалась, данная группа оставалась интактной и использовалась в качестве контрольной. Животные 2-й группы на фоне стандартной диеты получали в качестве питья 1%-й раствор этиленгликоля в течение 21 сут., что индуцировало развитие экспериментального нефролитиаза. Данная модель мочекаменной болезни является общепринятой и наиболее адекватно имитирует нефролитиаз человека [6–8]. Животным 3-й группы, предварительно получавшим этиленгликоль на протяжении 21 суток, по окончании этого периода в течение 3 недель через зонд вводили в желудок в 2%-й крахмальной взвеси препарат из культуры тканей Марены сердцелистной (*Rubia Cordifolia*) в дозе 75 мг/кг. Животные 4-й группы одновременно получали препарат Марены сердцелистной и 1%-й раствор этиленгликоля в течение 21 дня.

Для гистологического исследования животных декапитировали под легким эфирным наркозом по общепринятым методам. Материалом исследования послужила почка крысы. Орган фиксировали в 10% растворе формалина, обрабатывали по стандартной методике, заливали в парафин. Поперечные срезы через почечный сосочек толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Оценивали характер изменений коркового и мозгового вещества почки: состояние сосудистых клубочков,

капсулы почечного тельца, канальцев нефронов, собирательных трубок.

Гистохимическое исследование проводили на парафиновых и криостатных срезах толщиной 15–20 мкм. Для определения соединений кальция использовали методику Косса, основанную на превращении соединений кальция в соединения серебра, которые под действием света вновь восстанавливались в металлическое серебро. Оценивали характер отложения и распределения кальциевых депозитов, их средние размеры, особенности локализации в мозговом веществе почки и обратимость вызванных этиленгликолем изменений.

Морфометрические исследования проводили с использованием программных пакетов ImageJ 1.34 [9] и AxioVision 3.1. В каждом случае проводили 30 морфометрических измерений каждого показателя. Результаты работы представлены в виде значений $\bar{X}$ (средняя), m (ошибка средней), $p < 0,05$. Оценку межгрупповых различий проводили по критерию Холма-Сидака при нормальном распределении признака и равенстве дисперсий или по критерию Дана (SigmaStat 3.5 для Windows, Systat Software, Inc., США, 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У животных контрольной группы (группа 1) наблюдали нормальную гистологическую картину строения коркового и мозгового вещества почки. Диаметр собирательных трубочек на вершине и по ходу почечного сосочка характеризовался однородностью, в среднем составлял $19,33 \pm 1,41$ мкм (таблица). Кальциевые депозиты у крыс интактной группы гистохимически не верифицированы.

У группы животных с экспериментально вызванным нефролитиазом (группа 2) в корковом веществе наблюдались деформация почечных телец, расширение капиллярных петель сосудистых клубочков, в отдельных случаях – локальное утолщение и деструкция наружного листка капсулы почечного тельца. Отмечены дистрофические изменения эпителия канальцев нефронов, в виде гидропической дистрофии, расширение канальцевой системы, слущенный эпителий и белковые депозиты в просвете канальцев.

Размеры просвета собирательных трубок и кальциевых депозитов, $\bar{X} \pm m$

Морфометрические показатели	Интактная группа	Экспериментальный нефролитиаз	Группа лечения	Группа профилактики
Средний размер просвета собирательных трубок, мкм	$19,33 \pm 1,41$	$40,93 \pm 2,1^*$	$33,41 \pm 2,21^*$	$17,04 \pm 0,52$
Средний размер кальциевых депозитов, мкм	-	$10,1 \pm 0,62$	$7,5 \pm 1,09$	$8,17 \pm 0,48$

Примечание: * - данные достоверно отличны от показателей контрольной группы, $p < 0,05$.

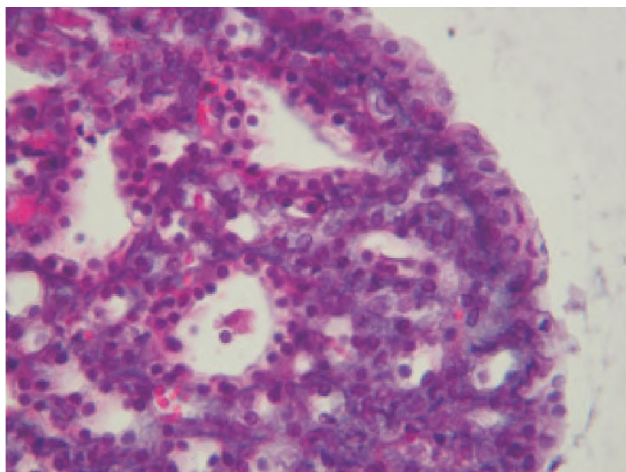


Рис. 1. Экспериментальный нефролитиаз. Гидропическая дистрофия эпителия, слущенные эпителиоциты и белковые депозиты в просвете собирательных трубок. Окраска гематоксилином и эозином. X400.

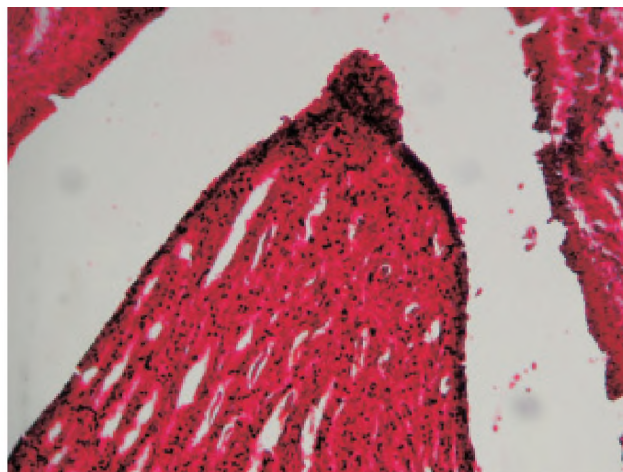


Рис. 4. Экспериментальный нефролитиаз. Кальциевые депозиты (черные) в интерстиции почечного сосочка, по поверхности эпителия, с преимущественной локализацией на вершине почечного сосочка. Слущенные эпителиоциты в просвете расширенных собирательных трубочек. Окраска по методу Косса. X200.

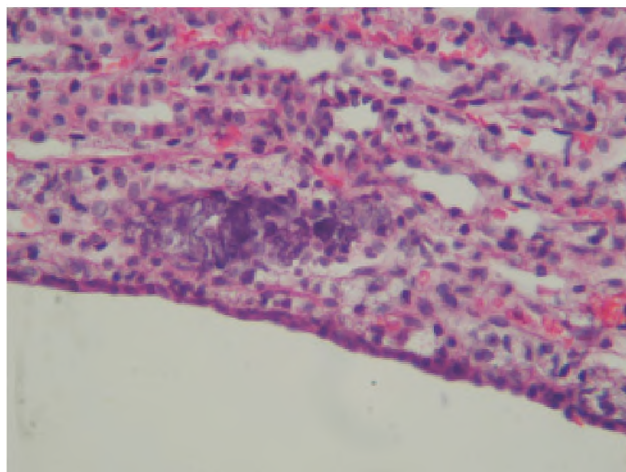


Рис. 2. Слущивание переходного эпителия с обнажением базального слоя. Лимфогистиоцитарная инфильтрация в прилежащих отделах интерстиция почки. Окраска гематоксилином и эозином. X200.

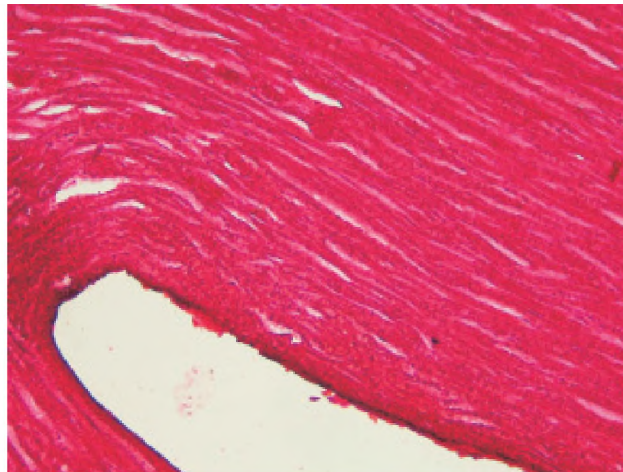


Рис. 5. Локализация кальциевых депозитов на поверхности эпителия почечной чашечки. Окраска по методу Косса. X200.

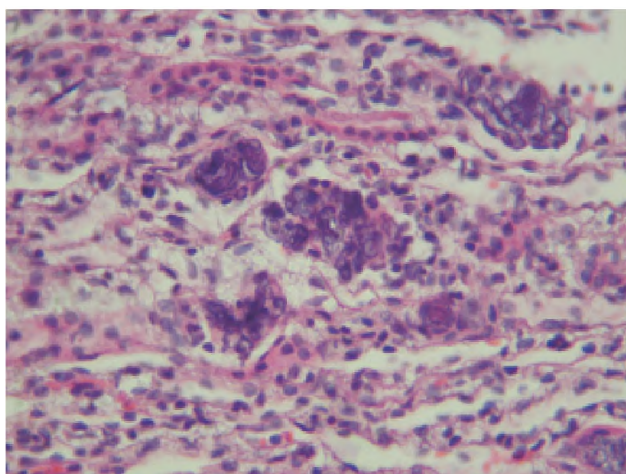


Рис. 3. Экспериментальный нефролитиаз. Очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация интерстиция почки. Окраска гематоксилином и эозином. X200.

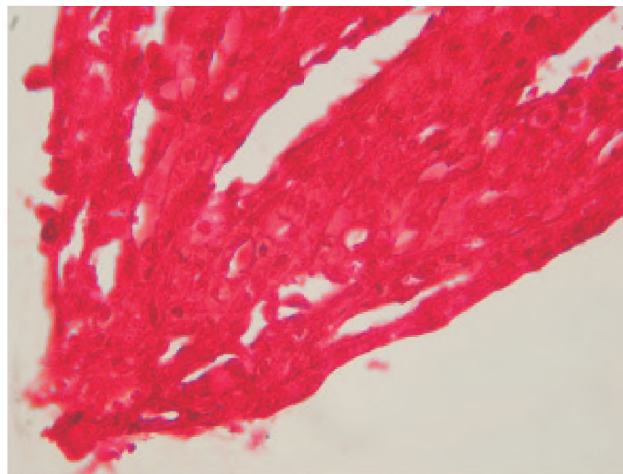


Рис. 6. Вершина почечного сосочка. Единичные интерстициально расположенные кальциевые депозиты. Окраска по методу Косса. X400.

В мозговом веществе в целом отмечали расширение системы собирательных трубочек (см. таблицу), причем наибольшего размера были собирательные трубки на вершине почечного сосочка (до 83,9 мкм). На светооптическом уровне были выявлены дистрофические изменения эпителия, его десквамация и белковые депозиты в просвете собирательных трубок (рис. 1), слущивание переходного эпителия почечного сосочка и лоханки, обнажение базального слоя эпителия (рис. 2). Характерной чертой являлась очаговая интерстициальная и субэпителиальная (под переходным эпителием) лимфогистиоцитарная инфильтрация паренхимы мозгового вещества почки (рис. 2, 3).

Гистохимически определяли значительное количество кальциевых депозитов (до 100 и более в поле зрения). Последние были неправильной округлой формы, часто с образованием «шипииков», боковых выростов. Кристаллы располагались в интерстиции коркового и мозгового вещества почки, с преимущественной локализацией в интерстиции почечного сосочка, на вершине сосочка по поверхности эпителия (рис. 4). В единичных случаях отмечено наличие соединений кальция в просвете собирательных трубок. Средний размер кальциевых депозитов составил $10,1 \pm 0,62$ мкм.

В случае приема препарата с 21-го дня (группа лечения, группа 3) обнаруживали дистрофические изменения эпителия собирательных трубок, слущивание эпителия с расположением эпителиоцитов в просвете собирательных трубок. На вершине почечного сосочка отмечали расширение их просвета (72,14 мкм). Переходный эпителий почечного сосочка уплощен, местами слущен с обнажением клеток базального слоя. Характерно выраженное снижение количества кальциевых депозитов (10-20 в поле зрения) в интерстиции мозгового вещества почки. Отмечена преимущественная локализация соединений кальция в области лоханки, в отдельных случаях наблюдался Са-позитивный материал на вершине сосочка, как в интерстиции, так и по поверхности эпителия (рис. 5). Такие единичные образования встречались и в просвете собирательных трубок. Средний размер кальциевых депозитов составил $7,5 \pm 1,09$ мкм.

В случае профилактического приема препарата из культуры тканей Марены сердцелистной с первого дня эксперимента (группа 4) отмечены умеренно выраженные дистрофические изменения почечного эпителия с единичными слущенными клетками в просвете собирательных трубок. Переходный эпителий начальных отделов мочевыводящих путей (чашечно-лоханочная система почки) сохранен. Отмечена однородность размеров

просвета собирательных трубочек почечного сосочка, средние значения составили $17,04 \pm 0,52$ мкм. При гистохимическом исследовании выявляли единичные (до 5 в поле зрения) кальций-позитивные образования на вершине и в интерстиции почечного сосочка (рис. 6). Средний размер кальциевых депозитов составил $8,17 \pm 0,48$ мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленные морфологические изменения в группах исследования и варианты распределения кальциевых депозитов имели отличительные особенности в зависимости от сроков воздействия этиленгликоля на организм животного, а также схемы приема препарата из культуры тканей Марены сердцелистной.

Наблюдаемые при воздействии этиленгликоля изменения системы собирательных трубок почки в виде гидropической дистрофии и слущивания эпителия, выраженное расширение их просвета на вершине почечного сосочка, лимфогистиоцитарные инфильтраты свидетельствуют о наличии процессов нефролитиаза. Это подтверждается гистохимическим верифицированием большого количества соединений кальция с преимущественной локализацией в области вершины почечного сосочка. Данные факты соответствуют литературным данным, согласно которым агрегаты кристаллов кальция вначале фиксируются на апикальных мембранах поврежденных эпителиальных клеток, затем транспортируются в интерстиций и концентрируются в основном на поверхности почечного сосочка, где и происходит последующее формирование камней [10-12].

Обратимость вызванных этиленгликолем морфофункциональных изменений почки при приеме препарата из культуры тканей Марены сердцелистной иллюстрируется значительным снижением степени выраженности структурных изменений почки, уменьшением количества кальциевых депозитов более чем в 5 раз и их размеров у животных группы лечения (группа 3).

Показано протективное действие данного препарата на паренхиму почки при профилактическом, одновременном приеме препарата из культуры тканей Марены сердцелистной и этиленгликоля. В этих условиях отмечены минимальные среди экспериментальных групп морфологические изменения почки, которые характеризовались умеренно выраженными дистрофическими изменениями эпителия, однородным просветом собирательных трубок на протяжении внутренней и наружной зоны мозгового вещества почки, единичными кальциевыми депозитами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение препарата из культуры тканей Марены сердцелистной приводит к обратимости морфологических изменений мозгового вещества почки, вызванных субхроническим приемом этиленгликоля. Профилактический прием данного препарата оказывает не только лечебный, но и протективный эффект на почку.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Тиктинский ОЛ, Александров ВП. Мочекаменная болезнь. СПб., 2000; 3-12
2. Coe FL, Evan A, Wocester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2598-2608
3. Daudon M. Epidemiology of nephrolithiasis in France. *Ann Urol (Paris)* 2005; 39(6): 209-231
4. Matlaga BR, Coe FL, Evan AP, Lingeman JE. The role of Randall's plaques in the pathogenesis of calcium stones. *J Urol* 2007; 177: 31-38
5. Cruzan G, Corley RA, Hard DC et al. Subchronic toxicity

of ethylene glycol in Wistar and F-344 rats related to metabolism and clearance of metabolites. *Toxicol Sci* 2004; 81 (2): 502-511

6. Khan SR, Hacklett RL. Calcium oxalate urolithiasis in the rat: is it a model for human stone disease? A review of recent literature. *Scan Electron Microsc* 1985; Pt.2: 759-774

7. Khan SR. Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol* 1997; 15(4): 236-243

8. Yamaguchi S, Wiessner JH, Hasegawa AT et al. Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions. *Int J Urol* 2005; 12 (3): 290-298

9. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with image. *J Biophotonics International* 2004;11(7): 36-42

10. Kumar S, Sigmon D, Miller T et al. A new model of nephrolithiasis involving tubular dysfunction/injury. *J Urol* 1991; 146(5): 1384-1389

11. Khan SR. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis and the formation of human urinary stones. *Scanning Microsc* 1995; 9(1): 89-100

12. Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest* 2003; 111(5): 602-605

Поступила в редакцию 23.11.2007 г.

Принята в печать 19.02.2008 г.