

© Н.В.Мотина, Я.Ф.Зверев, А.В.Лепилов, В.В.Лампатов, А.Ю.Жариков, О.С.Талалаева, 2010
УДК 616.613-003.7-07:616.61-001]-092.4

*Н.В. Мотина¹, Я.Ф. Зверев², А.В. Лепилов³, В.В. Лампатов², А.Ю. Жариков²,
О.С. Талалаева²*

ОКСИДАТИВНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ПОЧЕК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОКСАЛАТНОМ НЕФРОЛИТИАЗЕ

*N.V. Motina, Ya.F. Zverev, A.V. Lepilov, V.V. Lampatov, A.Yu. Zharikov,
O.S. Talalaeva*

OXIDATIVE DAMAGE OF KIDNEY IN EXPERIMENTAL OXALATE NEPHROLITHIASIS

Кафедры ¹ гистологии, ² фармакологии, ³ патологической анатомии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ явилось сопоставление структурной перестройки почек при нефролитиазе с показателями свободнорадикального окисления в крови и тканях почек. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперимент выполнен на крысах линии Wistar, получавших в качестве питья 1% водный раствор этиленгликоля на протяжении 42 сут. Морфологически в почечных срезах оценивали изменения мозгового вещества почки, особенности распределения депозитов кальция, расположение соединительнотканых элементов. Биохимическими методами оценивали оксидантный и антиоксидантный статус почек и крови. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** В ходе эксперимента в срезах почек наблюдалось отложение кальциевых нефролитов в области почечного сосочка с разрастанием соединительной ткани. Развитие нефролитиаза сопровождалось активацией свободнорадикального окисления почек и крови и ослаблением антиоксидантной защиты, обусловленное угнетением активности глутатионпероксидазы. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, при моделировании мочекаменной болезни нами отмечена прямая связь между активацией свободнорадикального окисления и развитием оксалатного нефролитиаза.

Ключевые слова: экспериментальный нефролитиаз, морфология, почки, свободнорадикальное окисление.

ABSTRACT

THE AIM of the study was a comparison of the structural adjustment of the kidneys in nephrolithiasis with indicators of free-radical oxidation in blood and tissues of the kidneys. **MATERIAL AND METHODS.** The experiment was performed on Wistar rats, treated as a drinking a 1% aqueous solution of ethylene glycol for 42 days. Morphologically in the kidney sections was assessed changes in the kidney medulla, especially the distribution of calcium deposits, the location of the connective tissue elements. Biochemical methods evaluated oxidative and antioxidative status of kidneys and blood. **RESULTS.** In the course of the experiment in slices of kidney calcium deposition was observed in the renal papilla with the growth of connective tissue. The development of nephrolithiasis associated with activation of free-radical oxidation of the kidneys and blood, and the weakening of antioxidant defense due to the inhibition of glutathione peroxidase. **CONCLUSION.** Thus, when modeling urolithiasis we noted a direct correlation between the activation of free-radical oxidation in the development of oxalate nephrolithiasis

Key words. experimental nephrolithiasis, morphology, kidneys, free-radical oxidation.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время около 10% населения страдают мочекаменной болезнью [1], что обуславливает актуальность исследований, связанных с выявлением отдельных звеньев ее этиопатогенеза, лечения и профилактики.

Показано, что в начальных стадиях заболевания кристаллы оксалата кальция способны индуцировать тканевые реакции в эпителии дистальных почечных канальцев и собирательных трубок [2,

3]. По мнению приведенных авторов, возникающие воспалительные изменения являются результатом прямого повреждающего воздействия кристаллов. Не исключено, что этот процесс связан с образованием активных форм кислорода, что создает условия для адгезии кристаллов солей и формирования очага кристаллизации с последующей активацией процессов агрегации и образования микролита. Продолжение роста и увеличение камня происходит уже в просвете чашечно-лоханочной.

Цель. Сопоставить структурную перестройку почек при нефролитиазе у крыс с показателями свободнорадикального окисления в крови и тканях почек.

Зверев Я.Ф. Алтайский государственный медицинский университет. 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40, тел. (3852) 26-08-35. zverg@asmu.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель оксалатного нефролитиаза была выполнена на самцах крыс линии Wistar массой 180–250 г, которые в течение 6 нед получали 1% водный раствор этиленгликоля. Контролем служили интактные животные, потреблявшие в качестве питья обычную водопроводную воду.

Для гистологического исследования животных декапитировали под эфирным наркозом. Материалом исследования служила почка крысы. Орган фиксировали в 10% растворе формалина, обрабатывали по стандартной методике, заливали в парафин. Поперечные срезы через почечный сосочек толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Оценивали характер изменений коркового и мозгового вещества почки: состояние сосудистых клубочков, капсулы почечного тельца, канальцев нефронов, собирательных трубок.

Для выявления отложений соединений кальция использовали импрегнацию серебром по методу Косса с контролем реакции 0,1% раствором соляной кислоты [4]. Оценивали характер отложения и распределения кальциевых депозитов, их средние размеры, особенности локализации в тканях почки и обратимость вызванных этиленгликолем изменений.

Для определения и оценки степени зрелости соединительной ткани использовали окраску на фибрин по MSB-методу (Marcius-Scarlett-Blue) в модификации Д.Д. Зербино. Для определения общей функциональной жизнеспособности клеточных популяций почек использовали полихромную методику окраски сафранином-О (Т) по А.Н. Яцковскому [5], дающую возможность судить о клеточной активности по степени конденсации хроматина.

Свободнорадикальное окисление оценивали по показателям оксидантного и антиоксидантного статуса. Оксидантный статус определяли в крови и гомогенате коркового вещества почки. Оценивали общую оксидантную активность по интенсивности окраски флюоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов перекисного окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой. В почке определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) и других тиобарбитурат-реактивных продуктов окисления жирных кислот (ТБРП).

Антиоксидантная система была исследована в гомогенате коркового вещества почки и гемоллизате эритроцитов. Определяли общую антиоксидантную активность и активность ферментов – каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Общую антиокси-

дантную активность оценивали по степени ингибирования Fe^{2+} /аскорбат-индуцированного окисления ТВИН-80 гомогенатом ткани (гемоллизат эритроцитов). Активность КАТ определяли по подавлению ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода, СОД – по содержанию в пробе нитроформазана (продукт восстановления нитротетразолия супероксидными радикалами), ГПО – по реакции неокисленного глутатиона с реактивом Элмана.

Морфометрические исследования проводили с использованием программных пакетов ImageJ 1.34 и AxioVision 3.1. Результаты работы представлены в виде значений \bar{X} (средняя), m (ошибка средней), $p < 0,05$. Результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов с использованием критерия Стьюдента. Оценку межгрупповых различий проводили по критерию Данна (SigmaStat 3.5 для Windows, Systat Software, Inc., США, 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У животных контрольной группы наблюдали нормальную гистологическую картину строения коркового и мозгового вещества почки. Диаметр собирательных трубок на вершине и по ходу почечного сосочка характеризовался однородностью, в среднем составлял $19,3 \pm 1,41$ мкм. Кальциевые депозиты у крыс интактной группы гистохимически не верифицированы.

На 3-й неделе после начала потребления этиленгликоля в почках наблюдались деформация почечных телец, полнокровие, расширение капиллярных петель сосудистых клубочков. Отмечались признаки гиалиново-капельной дистрофии эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев: неровная, фестончатая апикальная поверхность, пикнотичные ядра, эозинофильная зернистость в цитоплазме. Наблюдались слущенный эпителий и белковые депозиты в просвете канальцев.

В мозговом веществе отмечалось расширение системы собирательных трубок, причем наибольшего размера были собирательные трубки на вершине почечного сосочка (до 56,6 мкм), очаговая интерстициальная и субэпителиальная (под переходным эпителием) лимфогистиоцитарная инфильтрация. Отмечалось снижение функциональной активности эпителиоцитов собирательных трубок на всем протяжении почечного сосочка, с максимальной выраженностью в области основания, средней трети и, частично, верхушки почечного сосочка. Изменения эпителиоцитов собирательных трубок характеризовались мозаичностью. В области средней трети сосочка и его верхушки обнаруживались признаки как гиалиново-капельной, так и гидропической дистрофии. В области основания

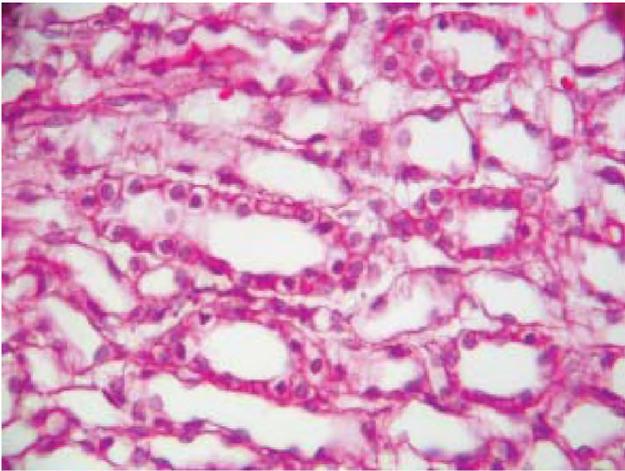


Рис. 1. Экспериментальный нефролитиаз 21 сут. Признаки гидropической дистрофии в эпителиоцитах собирательных трубок области основания почечного сосочка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

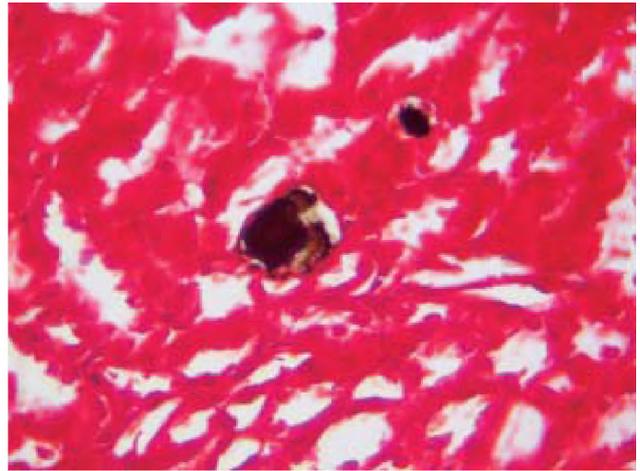


Рис. 2. Экспериментальный нефролитиаз 21 сут. Микролиты в просвете собирательных трубок. Окраска по Коссу. Ув. 400.

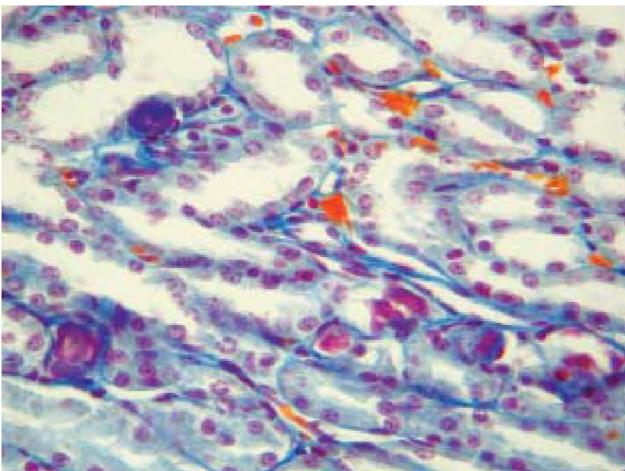


Рис. 3. Склеротические изменения стенок собирательных трубок и интерстиция почки, перифокально участкам отложения кальциевых депозитов. Окраска MSB. Ув. 400.

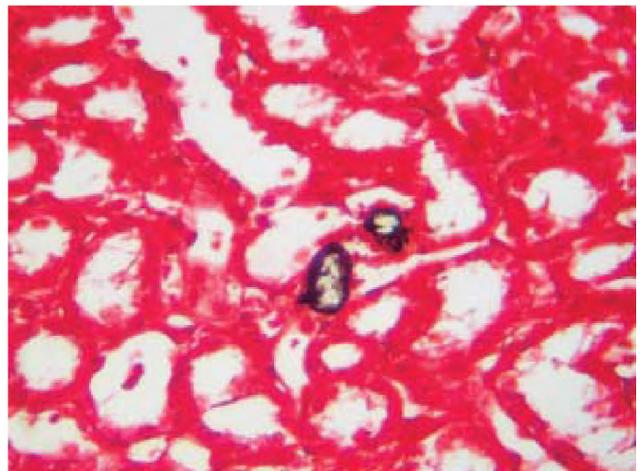


Рис. 4. Экспериментальный нефролитиаз 42 сут. Выраженная инкрустация эпителия собирательных трубок. Окраска по Коссу. Ув. 400.

сосочка преобладали изменения эпителия по типу гидropической дистрофии (рис. 1).

Множественные мелкие кристаллы кальция обнаруживались в эпителии канальцев и собирательных трубок, в интерстиции мозгового вещества, в просветах собирательных трубок в составе белковых цилиндров. Характерной являлась локализация соединений кальция – преимущественно в области основания и средней трети почечного сосочка. В составе эпителия на вершине почечного сосочка количество микролитов было менее значительным. В поле зрения определялись умеренные количества кальциевых депозитов величиной в среднем $3,6 \pm 0,11$ мкм. Выявлялась инкрустация эпителия собирательных трубок соединениями кальция. В 10% наблюдений обнаруживались довольно крупные микролиты (размером до 30 мкм) с obturацией просвета собирательных трубок (рис. 2). В областях отложения кальция опре-

делись разрастания соединительной ткани с формированием перитубулярного и периваскулярного фиброза (рис. 3).

При биохимическом исследовании в гомогенате коркового вещества почки животных подопытной группы общая оксидантная активность (концентрация МДА и ТБРП) увеличивалась по сравнению с плазмой крови в три раза, в то время как у интактных животных она не отличалась от показателей в крови (табл. 1, 2). Общая антиоксидантная активность в нефроцитах крыс была в три раза ниже, чем в крови. Различия активности глутатионпероксидазы в крови и почках были выражены меньше, а сравнение показателей каталазы и супероксиддисмутазы не выявило значительных отличий.

Показатели свободнорадикального окисления на фоне экспериментального нефролитиаза обнаружили существенную активацию, что проявилось увеличением оксидантной активности крови на

Показатели активности оксидантной и антиоксидантной систем гомогената почки крыс при экспериментальном оксалатном нефролитиазе ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Контрольная группа	Подопытная группа
Тиобарбитуратреактивные продукты, мкМ	7,3±0,40	12,9±0,3*
Общая оксидантная активность, %	54,3±2,36	66,8±1,67*
Каталаза, %	13,2±0,66	15,5±1,06
Супероксиддисмутаза, %	19,6±1,85	18,4±1,90
Глутатионпероксидаза, %	45,2±1,89	30,1±1,85*
Общая антиоксидантная активность, %	20,9±2,69	18,2±1,73

* $p < 0,05$ в сравнении с показателями животных контрольной группы.

Показатели активности оксидантной и антиоксидантной систем крови крыс с экспериментальным оксалатным нефролитиазом ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Контрольная группа	Подопытная группа
Тиобарбитуратреактивные продукты, мкМ	2,6±0,26	3,9±0,42*
Общая оксидантная активность, %	51,6±3,69	73,4±0,92*
Каталаза, %	15,6±0,69	22,0±1,99*
Супероксиддисмутаза, %	24,8±2,53	16,4±1,99*
Глутатионпероксидаза, %	57,8±2,04	32,3±3,29*
Общая антиоксидантная активность, %	67,9±0,90	60,1±1,17*

* $p < 0,05$ в сравнении с показателями животных контрольной группы.

20%. В почках описываемый показатель возрастал на 10% по сравнению с контрольной группой.

Общая антиоксидантная активность тканей почки существенно не менялась, хотя наблюдалось уменьшение активности глутатионпероксидазы на 30% при незначительных колебаниях показателей каталазы и супероксиддисмутаза. В то же время, в крови животных подопытной группы активность сукцинатдегидрогеназы уменьшилась на 33%, глутатионпероксидазы – на 44%, что, по-видимому, и обеспечило снижение показателя общей антиоксидантной активности эритроцитов. Наряду с этим, при экспериментальном нефролитиазе в крови активность каталазы несколько возросла.

В условиях продолжающегося воздействия этиленгликоля до 6 нед в почках выявлялись более выраженные токсические изменения с поражением коркового и мозгового вещества. В эпителии канальцев и собирательных трубок определялись выраженные изменения преимущественно по типу гидрорической дистрофии, часто со слущиванием эпителия. Наблюдались расширения просвета канальцев нефрона и собирательных трубок.

Мелкие нефролиты определялись в больших количествах (до 67 в поле зрения). Они располагались на всем протяжении почечного сосочка и, реже, в канальцах коркового вещества. Средний

размер кальциевых депозитов составил $2,8 \pm 0,15$ мкм. Характерна выраженная инкрустация эпителия дистальных канальцев и собирательных трубок (рис. 4).

Крупные микролиты, обтурирующие просвет собирательных трубок, обнаруживались в 40% случаев. Лимфогистиоцитарная инфильтрация почечного интерстиция носила выраженный характер. При этом функциональная активность клеток эпителия собирательных трубок была снижена лишь в области основания и частично средней трети сосочка с сохранением активности в области вершины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Модель этиленгликолевого оксалатного нефролитиаза наиболее адекватно воспроизводит мочекаменную болезнь в эксперименте, что подтверждают наши исследования и данные литературы [6]. Этиленгликоль быстро всасывается и метаболизируется в печени до гликолевой кислоты, которая окисляется до глиоксальной кислоты, с образованием щавелевой кислоты, ее соли, выделяясь почками, обуславливают гипероксалурию, что создает необходимые условия для образования кальций-позитивных структур.

Установлено, что на начальных стадиях нефролитиаза кристаллы кальция фиксируются на апикальных поверхностях нефроцитов, затем транспортируются в интерстиций, скапливаясь в области почечного сосочка, где в дальнейшем и происходит камнеобразование [7, 8].

Наши эксперименты показали, что в физиологических условиях в крови и почках соотношение оксидантной и антиоксидантной систем заметно не отличается. При этом в нефроцитах преобладает уровень оксидантной активности, в крови – антиоксидантной. Возможно, активность процессов свободнорадикального окисления в тканях почек превышает таковую в крови за счет высокого уровня метаболизма и прооксидантов, выводимых с мочой. Антиоксидантная активность почек в норме была существенно ниже, что, скорее всего, обусловлено меньшей концентрацией глутатионпероксидазы, главного антиоксидантного фермента почек. Активность КАТ и СОД в почках и крови существенно не различалась.

В условиях применения этиленгликоля, наряду с отложением композитов оксалата кальция, мы фиксировали активацию свободнорадикального окисления. При этом увеличивалось образование

активных форм кислорода и в тканях почек, и в крови животных. Это обусловило нарастание как тиобарбитуратреактивных продуктов, особенно в гомогенате почки (увеличение в 1,75), так и общей оксидантной активности крови (рост на 40%). Гипероксалурия, моделируемая в эксперименте, по мнению ряда исследователей, является необходимым условием для камнеобразования. Образующиеся кристаллы оксалата активно взаимодействуют с почечным эпителием, являясь индуктором свободнорадикального окисления, и обуславливают возникновение окислительного стресса [9, 10]. Активные формы кислорода повреждают мембраны нефроцитов, инициируя дистрофические изменения и клеточную реакцию. Поврежденный эпителий, являясь идеальной площадкой для прикрепления кристаллов оксалата кальция, подвергается дальнейшим дистрофическим изменениям, что усугубляет течение процесса, сопровождающееся ростом нефролитов. В свою очередь, при накоплении в цитоплазме кальция включается кальций-зависимый механизм повреждения клетки, что, в конечном итоге, усиливает окислительное повреждение и вызывает дистрофические изменения [11].

Анализируя уровень антиоксидантной защиты, отметим, что основным эффектом, зафиксированным нами, явилось существенное снижение активности глутатионпероксидазы в крови и почках животных подопытной группы, что подтверждается данными других исследователей [12–14]. Как известно, глутатионпероксидаза является важным антиоксидантным ферментом. Вероятно, ее снижение связано с изменением редокс-баланса глутатиона (GSH), возникающим при нефролитиазе.

Проведенный эксперимент показал определенную взаимозависимость между характером распределения кальциевых депозитов и степенью дистрофических изменений эпителия собирательных трубок.

На 3-й неделе эксперимента максимальное количество микролитов обнаруживалось в областях почечного сосочка, где преобладали изменения эпителия собирательных трубок по типу гидропической дистрофии. Функциональная активность этих эпителиоцитов была закономерно снижена.

Продолжающееся субхроническое воздействие этиленгликоля (до 6 нед) привело к более выраженной патогистологической перестройке тканей почки. В этих условиях на большей части почечного сосочка в эпителиоцитах собирательных трубок отмечались признаки гидропической дистрофии. Здесь, по-видимому, наблюдались признаки компенсаторной активации, клетки становились функционально активными. Важно подчеркнуть, что морфологические изменения клеток, интерпре-

тируемые как дистрофические, могут отражать как повреждение структур и нарушение функций клеток, так и интенсивную функцию клетки, ее повышенную метаболическую активность. Обращает на себя внимание, что микролиты располагались по всей площади почечного сосочка, включая и верхушку. Наличие крупных микролитов сопровождалось obturацией просвета собирательных трубок, выраженной инкрустацией эпителия собирательных трубок, так что сопутствующая патогистологическая перестройка тканей почки была максимально выражена. Описанные изменения, свидетельствующие о прогрессировании нефролитиаза и изменении функционального состояния нефроцитов, ожидаемо усиливали оксидативный стресс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при моделировании мочекаменной болезни нами отмечена прямая связь между активацией свободнорадикального окисления и развитием оксалатного нефролитиаза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol* 2000;13 (3): 45-50
2. Khan SR. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis and the formation of human urinary stones. *Scanning Microsc* 1995; 9 (1): 89-100
3. Khan SR. Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. *Nephron Exp Nephrol* 2004; 98 (2): 55-60
4. Sheehan DC, Hrapchak BR. *Theory and practice of histotechnology*. CV Mosby. St. Louis, 1980; 227
5. Яцковский АН. Метод оценки функциональной активности клеточных ядер. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии* 1987;1: 76–79
6. de Water R, Boeve ER, van Miert PP et al. Experimental nephrolithiasis in rats: the effect of ethylene glycol and vitamin D3 on the induction of renal calcium oxalate crystals. *Scanning Microsc* 1996; 10 (2): 591-601
7. Evan AP, Bledsoe SB, Smith SB, Bushinsky DA. Calcium oxalate crystal localization and osteopontin immunostaining in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int* 2004; 65 (1): 154-161
8. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest* 2003; 111 (5): 607–616
9. Khan SR. Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. *Urol Res* 2005; 33 (5): 349-357
10. Thamilselvan S, Khan SR, Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urol Res* 2003; 31 (1): 3-9
11. Саркисов ДС, Пальцев МА, Хитров НК. *Общая патология человека*. Медицина, М., 1997; 256-263
12. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Cells of proximal and distal tubular origin respond differently to challenges of oxalate and calciumoxalate crystals. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (14): 452-456
13. Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P et al. Renal tubular cell damage, and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment. *Urol Res* 2005; 33 (1): 65-69
14. Selvan R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urol Res* 2002; 30 (1): 35-47

Поступила в редакцию 18.11.2009 г.

Принята в печать 02.03.2010 г.