

© Н.М.Зайкова, В.В.Длин, В.Г.Петрович, Л.В.Синицына, А.А.Корсунский, Ш.Г.Гацкан, 2016
УДК [618.137: 612.46] – 092.4

*Н.М. Зайкова^{1,3}, В.В. Длин², В.Г. Петрович¹, Л.В. Синицына¹, А.А. Корсунский³,
Ш.Г. Гацкан¹*

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА НА УРОВЕНЬ ПРОФИБРОГЕННЫХ ФАКТОРОВ РОСТА В МОЧЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПАРЕНХИМЕ ПОЧЕК У КРЫС С ИНФИЦИРОВАННЫМ ПУЗЫРНО-МОЧЕТОЧНИКОВЫМ РЕФЛЮКСОМ

¹Институт Матери и Ребенка, г. Кишинев, Молдова, ²Научно-исследовательский клинический институт педиатрии Российского научно-исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ³кафедра педиатрии и инфекционных болезней Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Россия

*N.M. Zaicova^{1,3}, V.V. Dlin², V.G. Petrovici¹, L.V. Sinitcina¹, A.A. Korsunshii³,
S.G. Gatchkan¹*

THE EFFECT OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS ON URINE LEVEL OF PROFIBROGENIC GROWTH FACTORS AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RENAL PARENCHYMA IN RATS WITH INFECTED VESICoureTERAL REFLUX

¹Institution of Mother and Child Care, Kishinev, Moldova, ²Pirogov Russian National Research Medical University, ³Department of Pediatrics and Communicable Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

РЕФЕРАТ

При экспериментальном инфицированном пузырно-мочеточниковом рефлюксе у крыс были установлены различные неоднотипные структурно-анатомические изменения со стороны почечно-мочеточникового комплекса на 1-, 3- и 6-м месяце эксперимента. Выраженность морфофункциональных изменений паренхимы почек взаимосвязана со степенью тяжести ПМР и длительностью воспалительного процесса в почечной ткани, что и определяет развитие тубулоинтерстициального фиброза. Высокий мочевого уровень Ang II и TGF-β1 в моче у крыс, не получавших иАПФ, отражает выраженность склеротических изменений в почечной ткани. Раннее назначение иАПФ с целью блокады Ang II и ренопротекции снижает формирование фиброзной ткани в почках за счет снижения продукции фибробластами экстрацеллюлярного матрикса и профиброгенных факторов роста, но не влияет на уже сформировавшиеся очаги склероза.

Ключевые слова: эксперимент, инфекция мочевых путей, крысы, пузырно-мочеточниковый рефлюкс, тубулоинтерстициальный фиброз.

ABSTRACT

In the experimental simulations bacterial vesico-ureteral reflux of rats, the results of the morphological studies at individuals gave us the possibility to identify various non-typical structural-anatomic changes in the renal-ureteral complex at 1, 3 and 6 months and to clarify the definite morphological status of the structural components of the kidneys at the individuals. The severity of the morphofunctional changes in renal parenchyma is interconnected with the severity and the duration of the VUR and the inflammatory process with the development of tubulointerstitial fibrosis. High levels of Ang II and TGF-β1 in the urine of rats receiving no inhibitors reflects the severity of sclerotic changes in the renal tissue. Early administration of inhibitors for the purpose of the blockade of Ang II and renoprotection, reduce the formation of fibrosis tissue in the kidneys by reducing the production of extracellular matrix by fibroblasts and profibrogenic growth factors, but do not eliminate already formed foci sclerosis.

Key words: experiment, urinary tract infection, vesico-ureteral reflux, rats, tubulointerstitial fibrosis.

ВВЕДЕНИЕ

Особенности возникновения и прогрессирования нефропатии при пузырно-мочеточниковом рефлюксе (ПМР), несмотря на довольно длительную историю изучения и большое число опубликованных работ, продолжает оставаться актуальной проблемой в педиатрии [1–3]. Частота встречаемости ПМР у детей с инфекцией мочевых путей составляет 15–64,5% [4, 5]. Возможным вариантом исхода уродинамических нарушений при ПМР является развитие нефросклероза, как без присоединения бактериального компонента, так и с формированием вторичного пиелонефрита. Наряду с этим, возможно возникновение особой формы патологии – рефлюкс-нефропатии (РН), которая возникает у 30–60% детей с ПМР [6–10].

При прогрессировании РН появляются протеинурия, артериальная гипертензия, постепенное снижение функции почек вплоть до развития терминальной хронической почечной недостаточности (тХПН). Среди всех детей с тХПН в 8–25% случаев причиной ХПН явилась прогрессирующая РН, в том числе в 2–5% среди детей, находившихся на гемодиализе [3–5]. Поэтому главная цель современной нефрологии – максимальное продление собственных функций почек, что особенно актуально при РН. Следовательно, главный акцент должен быть перенесен на раннюю диагностику и предупреждение развития почечных рубцов. Ввиду трудности установления своевременного диагноза у маленьких детей, терапия часто запаздывает [6].

В литературе имеются противоречивые данные о воздействии ПМР на паренхиму почек. По данным N. Shaikh et al. (2010), было отмечено, что длительно персистирующий ПМР, даже низкой степени, имеет значительный повреждающий эффект на почечную паренхиму [11]. H.J. Paltiel et al. (2000) у растущих поросят не обнаружили неблагоприятного воздействия низких степеней рефлюкса на рост почки или уровень клубочковой фильтрации, однако, максимальная концентрационная способность почек была снижена, в паренхиме почек отмечались признаки хронического интерстициального воспаления и фиброз [12]. В работе M. Baek et al. (2010) при моделировании стерильного рефлюкса у кроликов авторы отметили различную степень склероза и повреждение эпителия дистальных канальцев без воспалительной клеточной инфильтрации, и глубокие повреждения в паренхиме при высоких степенях рефлюкса [13].

В экспериментальных моделях I.N. Slotki et al. (1982), индуцируя почечную инфекцию у крыс, начинали терапию антибиотиком в периоде от

8 ч до 7 дней [14]. Была выявлена корреляция повреждения почечной паренхимы с запаздыванием терапии: терапия была более эффективна, если она начиналась не позже 24 ч. J.A. Roberts et al. (1990) в модели восходящего пиелонефрита (*E. coli*) у обезьян начинали терапию через 72 ч. Все животные с задержкой терапии имели рубцы в почках [15].

Полученные экспериментальные данные обосновывают необходимость ранней диагностики выявления и предупреждения почечного повреждения на фоне инфекции мочевой системы (ИМС) и ПМР.

Одним из основных патогенетических факторов развития гломерулосклероза, а в последующем и тубулоинтерстициального фиброза является внутриклубочковая гипертензия. Ключевую роль в инициации фиброзирующих процессов играет ангиотензин II (Ang II). Концентрация Ang II в почках в тысячи раз выше, чем в циркулирующей крови, а при заболеваниях почек усиливается его внутривисочечная продукция [16]. Повышенное образование Ang II изменяет физиологические функции почечной ткани, приводя к нарушению ее структуры, цитоархитектоники и клеточного метаболизма, что, в конечном счете, сопровождается морфологическими изменениями и развитием фиброза. В литературе недостаточно освещен вопрос о фиброзирующей роли Ang II при различных типах нефропатий, в том числе при рефлюкс-нефропатии. Являясь основным профиброгенным фактором, иницирующим и поддерживающим процессы фибриллогенеза, Ang II активизирует синтез трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) в проксимальных канальцах, который стимулирует пролиферацию клеток и образование соединительной ткани [17,18]. Поэтому для контроля над развитием склеротических процессов в почечной ткани, в том числе и при ПМР, важно исследовать мочевые уровни TGF- $\beta 1$ и Ang II для выяснения их диагностического значения в качестве маркеров нефросклероза.

Согласно современным представлениям, ренин-ангиотензиновая система (РААС) непосредственно участвует в регуляции гомеостаза организма, в том числе в сохранении нормальной архитектоники и функции почки. При вовлечении почечной ткани в патологический процесс (инфекция, обструкция) происходит активация РААС, что приводит к активации клеток мезангия и канальцевого аппарата почек, которые секретируют про- и противовоспалительные цитокины и факторы роста. В итоге это приводит к морфофункциональным изменениям в почках в виде образования соединительной ткани, рубцевания и атрофии паренхимы [17–21].

В связи с этим становится очевидным, что по-

тенциальным средством защиты почки являются фармакологическая блокада Ang II и уменьшение внутриклубочковой гипертензии [16]. Механизм нефропротективного действия иАПФ связывают с блокадой внутрипочечного синтеза Ang II [16, 20, 21]. Хорошо доказаны на сегодняшний день органопротективные эффекты ингибиторов АПФ: антипротеинурическое действие и замедление/предотвращение развития ХПН при гломерулопатиях и диабетической нефропатии [22, 23]. В то же время, работы, доказывающие нефропротективный эффект и АПФ при рефлюкс-нефропатии, единичны [24, 25]. В работе Л.Ю. Мачехиной (2010) было отмечено, что на фоне приема иАПФ у большинства детей с РН происходит улучшение или стабилизация показателей почечного кровотока [24].

В связи с этим, целью нашей работы явилось определение ренопротективного эффекта раннего назначения иАПФ при бактериальном обструктивном пиелонефрите у крыс, осложненном пузырно-мочеточниковым рефлюксом, и влияние их длительного применения на мочевого уровень профиброгенных факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментальных исследованиях известен способ моделирования пиелонефрита, который воспроизводят введением суточной культуры кишечной палочки в количестве 200–500 млн микробных тел в просвет мочеточника с последующей перевязкой его [26]. Согласно данным литературы, *E.coli* является патогенной культурой для крыс и вызывает острый пиелонефрит [27].

Характеристика экспериментальных групп. Исследование выполнено на 27 половозрелых белых крысах-самцах одного возраста массой 240 ± 40 г (масса от 200 до 260 г), максимальная длительность наблюдения составила 6 мес. Соответственно поставленной цели для выполнения экспериментального исследования подопытные особи были разделены на 3 основные группы:

1-я группа (n=15) – моделирование стеноза уретры, инфицирование мочевых путей, лечение антибиотиком и иАПФ (эналаприлом);

2-я группа (n=9) – моделирование стеноза уретры, инфицирование мочевых путей, лечение антибиотиком;

3-я группа (n=3) – группа контроля.

Все подопытные особи содержались в одинаковых условиях вивария, в отдельных клетках, хорошо вентилированной комнате при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и кормились стандартной пищей. Воспроизведение бактериального пиелонефрита у особей обеих

групп проводилось введением суточной культуры микробных тел *E.coli* (1 мл) в мочевого пузырь через катетер (диаметром 0,2 см). В качестве бактериальной культуры использовали *E.coli*, полученную из мочи больного ребенка с острым пиелонефритом. Стеноз уретры у крыс создавали путем скарификации уретры с помощью металлического катетера и введения 1 мл спиртового раствора йода в просвет уретры после анестезии 5% кетаминном [28]. Через 48–72 ч после развития первых признаков пиелонефрита крысам 1-й и 2-й групп назначался антибиотик – *цефатаксим*, однократно в дозе 100 мг/кг/24 ч внутримышечно в течение 5 дней. Введенная крысам культура *E.coli* была чувствительна к данному антибиотику по результатам посева и определения антибиотикочувствительности.

Эналаприл был использован только в 1-й группе крыс в дозе 0,1 мг/кг/24 ч ($0,024 \pm 0,03$ мг/24 ч). Таблетки были раздроблены в порошок, который смешивался с питьевой водой для крыс. Лечение проводилось в течение всего периода эксперимента.

Микционную цистографию проводили на 1-, 3-м и 6-м месяцах эксперимента, путем введения 3–5 мл урографина в полость мочевого пузыря с помощью шприца.

На 6-м месяце эксперимента в моче животных определяли уровни TGF- β 1 и Ang II методом иммуноферментного анализа (ELISA) в биохимической лаборатории Государственного медицинского университета «Н. Тестимицану» (зав. лабораторией – проф. В. Гудумак). Мочевой уровень TGF- β 1 и Ang II пересчитывали на ммоль креатинина, определенного в конкретной порции мочи (нг/ммоль креатинина).

Выведение животных из эксперимента проводилось после анестезии путем внутрибрюшинного введения 0,4 мл 5% кетамина.

Морфологические исследования проводились методом макро- и микроскопии почечно-мочеточниковых комплексов, полученных от особей экспериментальных групп и группы контроля. Материалом для гистопатологического исследования послужили биоптаты (1х1х0,5 см) почечно-мочеточникового комплекса, полученные при вскрытии животных, предварительно фиксированные в 4% и 10% растворе формалина в течение не более 12 ч. Гистопатологическая обработка материала в биоптатах проводилась согласно стандартным протоколам гистологической технологии с использованием рутинных (гематоксилин-эозином – Г-Е) и специальных (пикрофуксин по Ван-Гизону – ВГ, анилиновым синим по Масону) методов окраски для определения степени развития

соединительной ткани и коллагенообразования. Взятие материала от крыс контрольной группы проводили в динамике одновременно с экспериментальными животными (по 1 крысе на 1-, 3-м и 6-м месяцах).

Для статистического анализа были взяты следующие морфологические изменения: клеточная инфильтрация, интерстициальный отек, интерстициальный фиброз. Для анализа морфологических данных была применена оценочная шкала, описанная В. Rodrigues-Iturbe (2005), где 0 – без изменений, 1 – слабые, 2 – умеренные и 3 – выраженные изменения [28].

Для статистической обработки полученных результатов использовалась программа Statistica for Windows 6.0 с проведением корреляционного анализа. Достоверными считали различия показателей при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В экспериментальных группах клиническая картина острого пиелонефрита развивалась через 48–72 ч (появилась вялость, отказ от еды, температура, лейкоцитурия). При анализе микционной цистографии у 18 крыс обеих групп (75%) был выявлен односторонний ПМР различной степени выраженности, причем степень тяжести его оказалась более выраженной на 3-м и 6-м месяцах от начала эксперимента. ПМР был обнаружен у 11 крыс (73,3%) 1-й группы и у 7 (77,8%) – 2-й группы ($p > 0,05$). У особей обеих групп рентгенологические признаки высокой (III–IV) степени ПМР наблюдались спустя 6 мес эксперимента, причем у всех животных 2-й группы (рис. 1).

Исследование образцов почечно-мочеточниковых комплексов контрольной группы, проведенных на 1-, 3-м и 6-м месяцах эксперимента, не выявили каких-либо макроскопических или гистологических отклонений, что послужило объективным критерием для сравнения процессов, происходящих в паренхиме почек в экспериментальных группах на протяжении всего указанного времени (рис. 2, А, Б).

При гистологическом исследовании почечной ткани на **1-м месяце** эксперимента у особей **из 1-й группы с ПМР** отмечалась очаговая полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация лимфо-плазмочитарного характера в пределах чашечно-лоханочных сегментов, извитые канальцы незначительно расширены. У половины животных выявлены незначительный интерстициальный очаговый отек и полнокровие капилляров. В кортикальной зоне, в капсуле отдельных клубочков и на уровне базальной мембраны извитых пери-

гломерулярных канальцев местами отмечались минимальные или умеренные процессы склерозирования (рис. 3).

У животных с ПМР **из 2-й группы** на стороне рефлюкса почки незначительно увеличены в размерах, отмечалось расширение чашечно-лоханочных сегментов и полнокровие кортикальной паренхимы и паранефральной клетчатки. В чашечно-лоханочных сегментах установлены пролиферация уротелия и более выраженная полиморфно-клеточная инфильтрация, и умеренная коллагенизация подэпителиальной зоны. Отмечались сглаженность папиллярных структур, расширение тубулярной части нефрона, умеренная дистрофия и некроз нефротелия извитых канальцев. Параллельно с более выраженными сегментарными утолщениями базальной мембраны клубочков и канальцев со стороны интерстициальных сосудов отмечалась гипотрофия стенки артериальных сосудов с их умеренным стенозом в сочетании с незначительным периваскулярным склерозом, клеточным инфильтратом и умеренной гиперплазией фибробластов (рис. 4), что не наблюдалось в 1-й группе.

На рис. 5 представлены сравнительные показатели уровней клеточной инфильтрации, тубулоинтерстициального отека и склероза почечной ткани у крыс двух групп на 1-м месяце эксперимента. Установлено, что уровень интерстициального отека достоверно различался в обеих группах, тогда как уровень клеточной инфильтрации и фиброза почечной ткани был достоверно ниже у крыс 1-й группы, чем у особей 2-й группы ($p < 0,05$).

У крыс с ПМР **из 1-й группы** на **3-м месяце** эксперимента почки имели бобовидную форму, были желтовато-зеленого цвета, симметричны, на срезе корковое и мозговое вещество сохраняло четкое разграничение. В 2/5 случаев капсула почки утолщена, в 1/5 случаев сформированы грубые фиброзные спайки, единичные очаги склероза – преимущественно в корковой зоне. На уровне чашечно-лоханочных сегментов воспалительные изменения проявлялись в виде умеренной и невыраженной полиморфно-клеточной инфильтрации. Параллельно были замечены пылевидные или очаговые кальцификации уротелия. Со стороны нефрона отмечались невыраженная дистрофия эпителия извитых канальцев, очаговые интерстициальные склеротические изменения и наличие белковых цилиндров (рис. 6). Во всех исследуемых образцах отмечались слабовыраженный очаговый перитубулярный склероз с утолщением базальной мембраны проксимальных и дистальных канальцев, очаговый склероз в интерстиции.

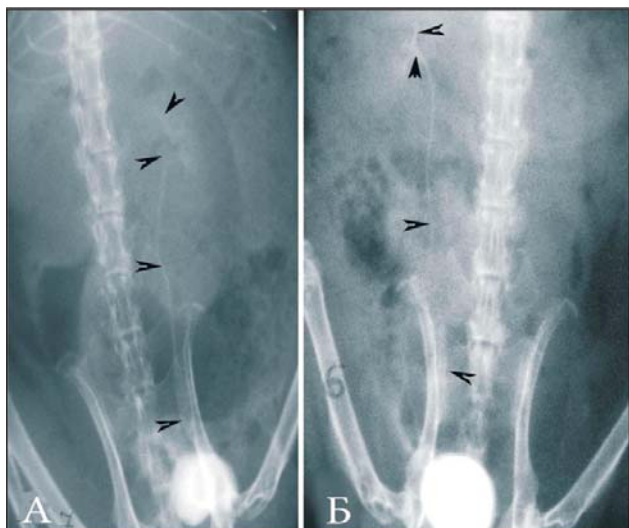


Рис. 1. Микционная цистография у крыс. ПМР III–IV степени на 6-м месяце эксперимента. А – левосторонний ПМР у особи 1-й группы; Б – правосторонний ПМР у особи 2-й группы.

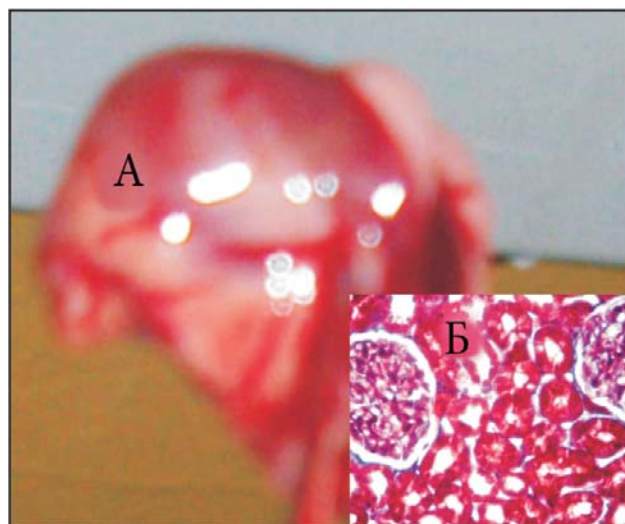


Рис. 2. Макромикроскопический фрагмент почки крысы из контрольной группы на 6-м месяце эксперимента. А – макропрепарат почки; Б – гистопрепарат кортикальной зоны паренхимы почки в норме. Окраска по Masson. Ув. 200.

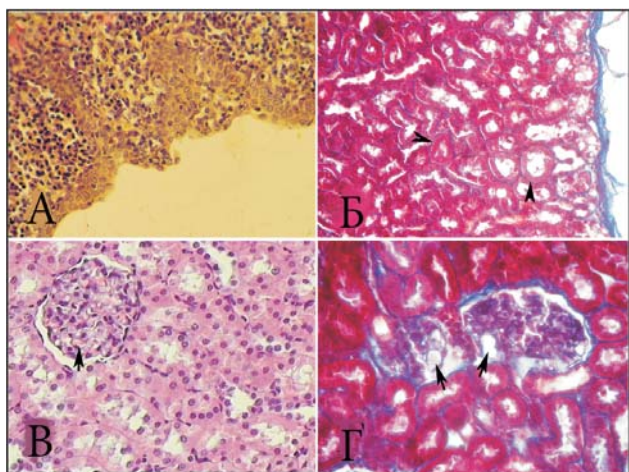


Рис. 3. Микроскопические изменения у особей с ПМР из 1-й группы на 1-м месяце исследования. Окраска по Ван-Гизону (А) $\times 100$, по Масону (Б,Г) $\times 100$, Гематоксилин-эозином (В) $\times 100$.

У особей с ПМР из 2-й группы почки увеличены в размерах, в капсуле грубые фиброзные спайки, отмечается нечеткая дифференциация на корковый и мозговой слои. Установлены расширение, атрофия и утолщение базальной мембраны канальцев за счет гиалиноза, дистрофические изменения нефротелия с наличием различных цилиндрических структур в просвете отдельных канальцев (рис. 7). В интерстициальной строме с различной степенью выраженности отмечалось лимфогистиоцитарное воспаление с повышенным коллагенообразованием стромы, что не наблюдалось у образцов 1-й группы (см. рис. 7).

В гломерулярном комплексе были выявлены аневризмальные расширения капилляров и сегментарные утолщения базальной мембраны за счет

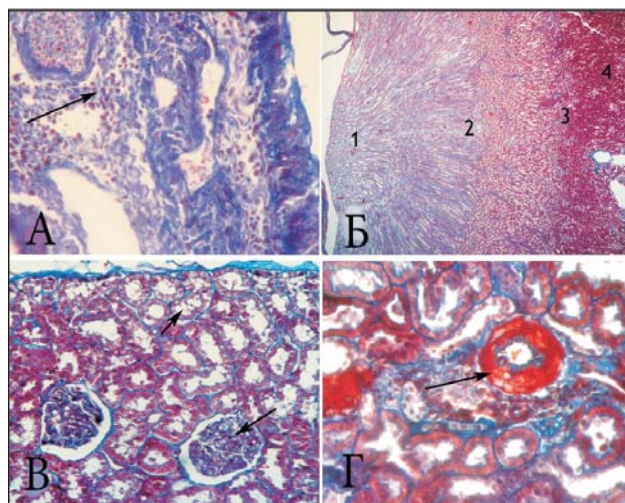


Рис. 4. Микроскопические изменения в почках у крыс 2-й группы с ПМР на 1-м месяце исследования. Окраска по Масону (А,Б,Г) $\times 100$ (Б) $\times 25$.

склероза и гиалиноза. Сосудистая сеть нефрона на всем его протяжении полнокровна.

Нами было отмечено, что уровень интерстициального отека в почечной ткани был недостоверно ниже в 1-й группе, чем во 2-й группе ($p > 0,05$). У крыс 1-й группы уровень клеточной инфильтрации и фиброза в почечной ткани был достоверно ниже, чем у особей, не получавших эналаприл ($p < 0,05$, рис. 8).

У особей 1-й группы на 6-м месяце эксперимента почки незначительно увеличены в размерах на стороне ПМР, капсула блестящая. На разрезе корково-медуллярное вещество сохранено, с четкой дифференциацией. При микроскопическом исследовании выявлены единичные очаги фиброза в мозговом веществе почки (рис. 9), слабывыра-



Рис. 5. Уровень тубулоинтерстициального отека, клеточной инфильтрации и фиброза почечной паренхимы у крыс обеих групп на 1-м месяце эксперимента.

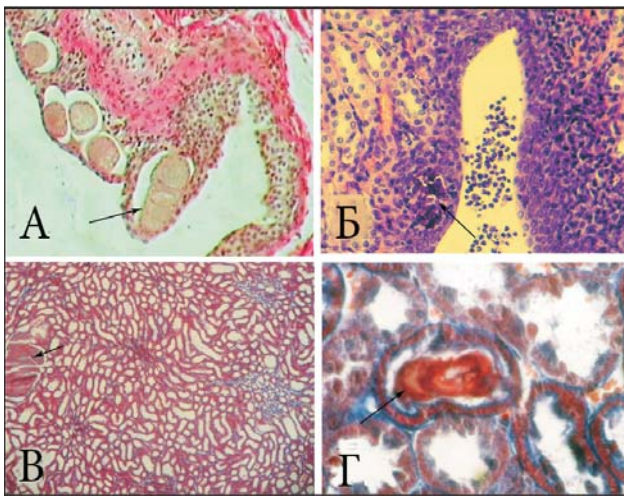


Рис. 6. Микроскопические изменения у особей 1-й группы с ПМР на 3-м месяце исследования. Окраска Ван-Гизону (А) x75, Гематоксилин-эозином (Б)x200, по Массону (В) x25 и (Г) x200 Об.40.ок10 (А,В,Г); Об.20.ок.10 (Б).

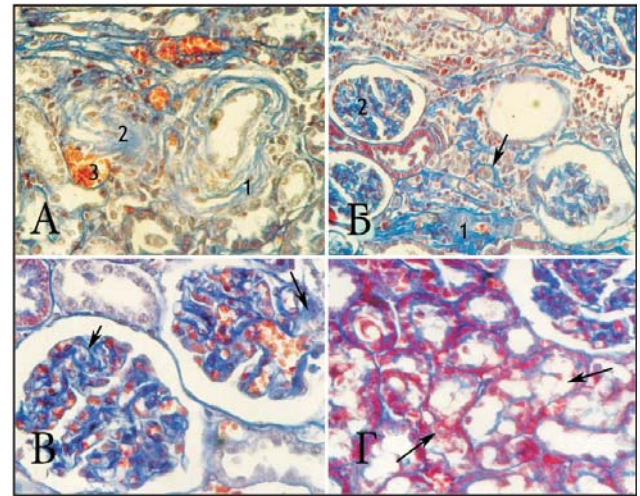


Рис. 7. Микроскопические изменения у особей 2-й группы с ПМР на 3-м месяце эксперимента. Окраска по Массону (А,В,Г) x100; (Б)x200.

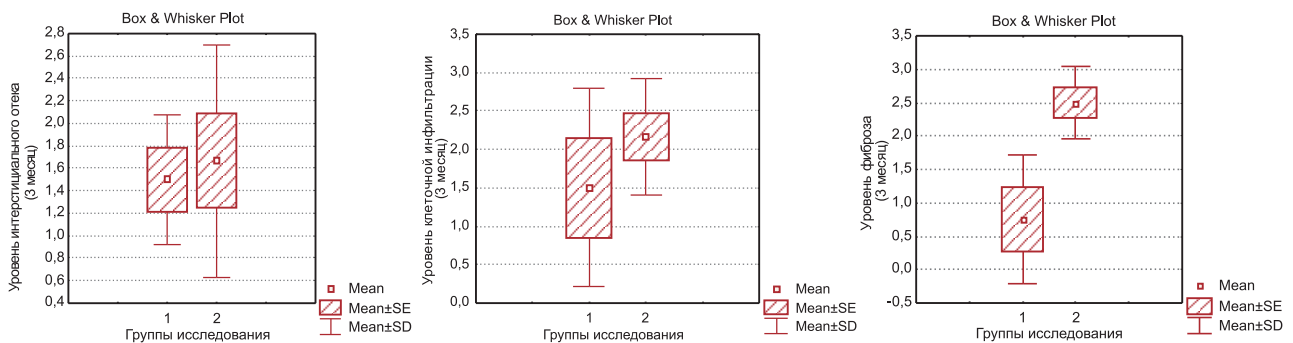


Рис. 8. Уровень, тубулоинтерстициального отека, клеточной инфильтрации и фиброза почечной паренхимы у крыс обеих групп на 3-м месяце эксперимента.

женный склероз капсулы отдельных клубочков. В 4/5 случаев клубочки сохраняли незначительное полнокровие без экссудативных изменений, отмечалась умеренная очаговая воспалительная инфильтрация, склеротические изменения были минимальны. Морфологическая структура большинства клубочков и канальцев сохранена (рис.9).

У животных **2-й группы** выявлены выраженные макро- и микроскопические изменения в

почечно-мочеточниковом комплексе. В 2 случаях почки на стороне ПМР были увеличены в 1,5–2 раза, достигая размеров 3,5x2,0x2,2 см (при норме 1,5x1,0x1,2 см), темно-зеленоватого цвета, с нечеткими бугристыми контурами и отчетливым расширением лоханок и чашечек (гидронефротическая трансформация). Выявлены признаки выраженной атрофии почечной паренхимы параллельно с вышеуказанными изменениями, в 2

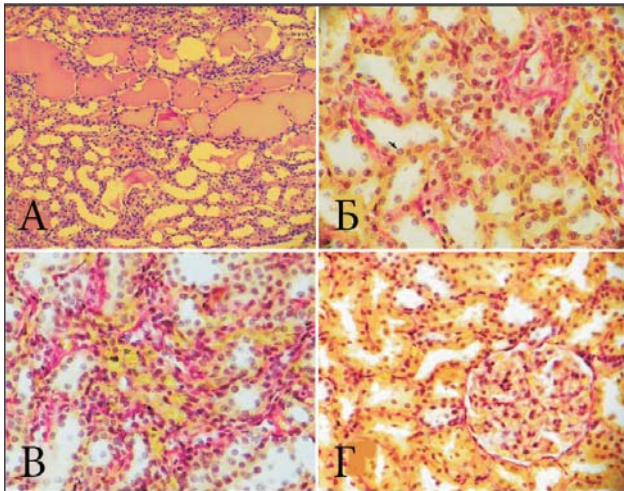


Рис. 9. Микроскопические изменения у особей 1-й группы с ПМР на 6-м месяце исследования. Окраска гематоксилин-эозином (А)х75, Ван-Гизону (Б,В,Г) х100.

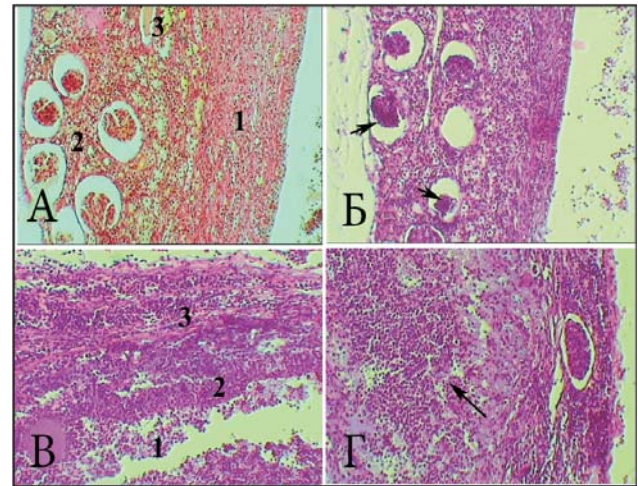


Рис. 10. Микроскопические изменения у особей 2-й группы с ПМР на 6-м месяце исследования. Окраска Ван-Гизону (А,Б) х75 гематоксилин-эозином (В,Г) х100.

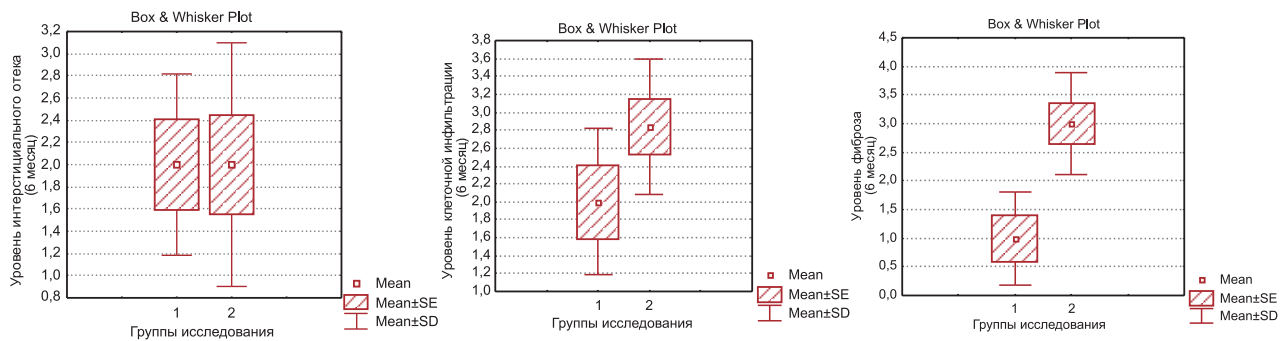


Рис. 11. Уровень тубулоинтерстициального отека, клеточной инфильтрации и фиброза почечной паренхимы у крыс обеих групп на 6-м месяце эксперимента.

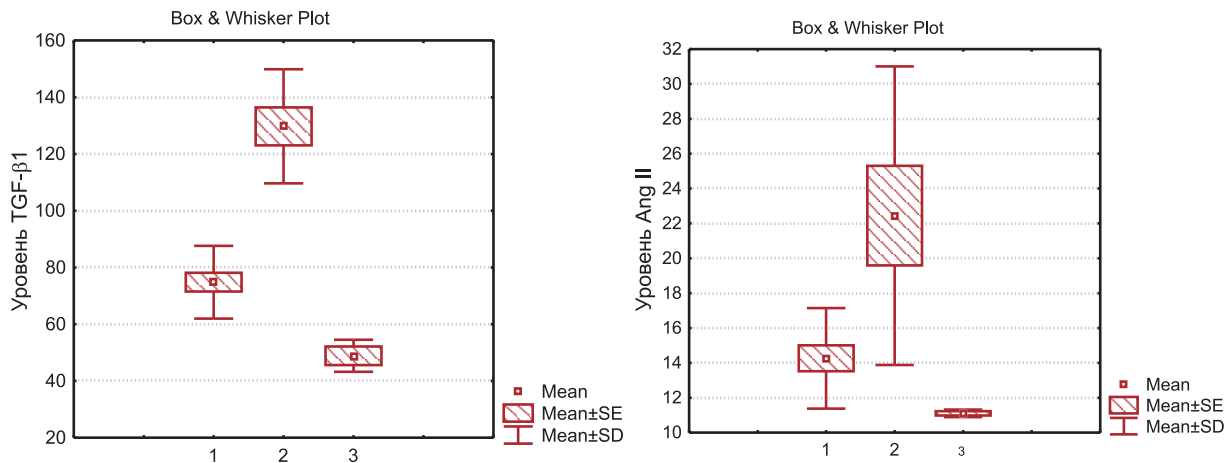


Рис. 12. Уровень TGF-β1 и Ang II (нг/ммоль креатинина) в моче у крыс, где 1-я группа – особи, получавшие эналаприл, 2-я группа – крысы, не получавшие эналаприл, 3-я – группа контроля.

образцах отсутствовала дифференциация между корковым и мозговым веществом, паренхима истончена, с участками втяжения и признаками инфильтративно-продуктивного воспаления, в области почечной лоханки – клеточный лейкоцитарный детрит (рис.10). Атрофия нефротелия с облитерацией гиалиновыми цилиндрами встречались

во всех образцах 2-й группы. Клубочки имели различную степень склероза и гиалиноза, отдельные были гипертрофированы, наблюдалось расширение чашечек по типу гломерулокистоза (см. рис. 10). В 1/3 случаев отмечались сближение гломерул в виде конгломератов с их склерозированием, выраженная лимфогистиоцитарная и плазмоцитарная

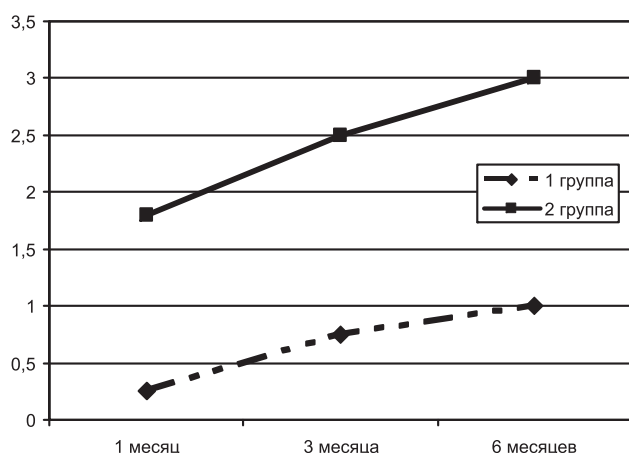


Рис. 13. Динамика развития фиброза в изучаемых группах крыс.

инфильтрация паренхимы и гнойно-деструктивные изменения в чашечно-лоханочных сегментах с образованием абсцессов (см. рис. 10).

На 6-м месяце эксперимента уровень интерстициального отека не отличался в обеих группах ($p > 0,05$), в то время как клеточная инфильтрация и фиброз в тубулоинтерстиции были достоверно ($p < 0,01$) выше во 2-й группе, чем в 1-й группе (рис. 11).

С целью определения влияния эналаприла на маркеры склерозирования почечной ткани была исследована мочевая экскреция профиброгенных факторов в обеих экспериментальных группах на 6-м месяце эксперимента и в группе контроля (3-я группа, $n=3$). Повышенная мочевая экскреция TGF- $\beta 1$ была выявлена у всех особей с ПМР по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). При этом у особей 2-й группы отмечался достоверно более высокий уровень мочевой экскреции TGF- $\beta 1$ в моче по сравнению с 1-й группой ($p < 0,001$, рис.12).

Уровень Ang II в моче у особей 2-й группы с ПМР, не получавших эналаприл, был в 2 раза выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). У крыс 1-й группы уровень Ang II в моче был достоверно ниже, чем во 2-й группе ($p < 0,001$) (см. рис. 12).

Следовательно, достоверно более высокий мочевой уровень Ang II и особенно TGF- $\beta 1$ у крыс, не получавших иАПФ (2-я группа), по сравнению с крысами, получавшими в течение 6 мес эналаприл (1-я группа), указывает, что одним из патогенетических механизмов ренопротективного действия иАПФ является их ингибирующее действие на Ang II и опосредованно на TGF- $\beta 1$. Уровень этих профиброгенных факторов в моче может отражать выраженность склеротических изменений в почечной ткани.

Это также подтверждается наличием у крыс 2-й группы прямой сильной корреляционной связи между уровнями TGF- $\beta 1$ и Ang II, с одной стороны, и степенью склероза – с другой ($r=0,67$ и $r=0,78$ соответственно, $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного экспериментального исследования и сравнительного гистологического анализа установлено, что при инфицировании мочевой системы возникшие воспалительные процессы в разной степени захватывают все компоненты почечно-мочеточникового комплекса с неоднородными макро- и микроскопическими изменениями, что обусловлено как воздействием бактериальных агентов, так и длительным нарушением уродинамики.

Так, с первого месяца эксперимента у крыс обеих групп сосудистый компонент характеризовался гипертрофией стенок внутривисцеральных артериол, незначительным утолщением интимы, периваскулярным фиброзом, а также кровенаполнением перитубулярных и гломерулярных капилляров во всех образцах, но более выраженным во 2-й группе, не получавшей эналаприл, что характеризует развитие локальной гломерулярной гипертензии. Вероятно, нарастание патологических изменений со стороны сосудов является следствием прямого воздействия бактериально-токсического фактора на интиму сосудов с развитием дистрофически-ишемических повреждений, а также вследствие нарастания гидронефротической трансформации нефрона с развитием интерстициального склероза, так как не была устранена обструкция, о чем свидетельствует распространенность патологических изменений в динамике наблюдений. Выраженность интерстициального отека на первом месяце эксперимента достоверно не отличалась между группами ($p > 0,05$), хотя имела тенденцию к нарастанию к 3-му и 6-му месяцам эксперимента, причем более выраженным во второй группе особей. В то же время, на первом месяце эксперимента, уровень клеточной инфильтрации в паренхиме почек был достоверно меньше в 1-й группе по сравнению со 2-й группой ($p < 0,05$). У крыс, не получавших эналаприл (2-я группа), отмечалось достоверно более интенсивное образование коллагеновых волокон в паренхиме почек, чем в 1-й группе ($p < 0,05$), которая получала иАПФ.

К 3-му месяцу эксперимента в обеих группах росли явления воспалительной инфильтрации, отека интерстиция и фиброза, но были существенно более выраженными во второй группе крыс,

получивших только антибактериальную терапию ($p < 0,05$). Аналогичная динамика наблюдалась и на 6-м месяце наблюдения.

При анализе динамики нарастания выраженности фиброза в почечной ткани крыс различия между основными группами были видны уже на первом месяце, и они еще больше увеличивались к 6-му месяцу наблюдения, несмотря на то, что в обеих группах наблюдалось усиление фиброза (рис.13).

Таким образом, сравнительный анализ выявил, что у крыс с ПМР при длительном применении эналаприла основные морфологические изменения в почках (клеточная инфильтрация, интерстициальный отек, интерстициальный фиброз) менее выражены по сравнению с группой нелеченных эналаприлом ($p < 0,05$).

Рубцевание почечной ткани – это многофакторный процесс, в результате которого в клетках почечных канальцев развиваются метаболические нарушения, активируются различные провоспалительные факторы – цитокины, факторы роста, что в совокупности способствует развитию воспалительной реакции в интерстиции почек и, в конечном итоге, приводит к тубулоинтерстициальному фиброзу [17–20, 30]. Нарушение пассажа мочи и повышение уретерального и лоханочного давления активируют клетки канальцев и эндотелия капилляров, что приводит к избыточному накоплению экстрацеллюлярного матрикса [31, 32].

Поскольку проксимальные канальцы, поврежденные ишемией и повышенным гидростатическим давлением, являются основным источником факторов роста, повышенный уровень TGF- β 1 и Ang II в моче у крыс с инфицированным ПМР указывает на гиперпродукцию данных цитокинов в почках [27, 31, 32]. Учитывая выявленную корреляцию между мочевыми уровнями профиброгенных факторов и выраженностью фиброза в тубулоинтерстиции, можно предполагать, что TGF- β 1 и Ang II активируют пролиферацию фибробластов с разрастанием соединительной ткани в почках, что согласуется с данными X.L. Liang et al. (2010) и J. Peter et al. (2012) [29, 33]. Полученные данные согласуются с данными, представленными A. Hussein et al. (2010), которые определили связь между нарушением урегемодинамики, инфекцией мочевой системы и активностью TGF- β 1 в крови [17]. Выявленная сильная прямая корреляционная связь между уровнем экскреции TGF- β 1 и Ang II, с одной стороны, и степенью склеротических изменений в почечной ткани – с другой стороны указывает на возможность их использования в качестве маркеров

тяжести склеротических изменений в тубулоинтерстициальной ткани почек.

Полученные данные совпадают и с результатами других фундаментальных работ. A.K. Singal et al. (2005) при экспериментальном пиелонефрите у трех групп крыс отметили характерные гистологические изменения для пиелонефрита (лимфогистиоцитарную клеточную инфильтрацию и появление рубцов). Группа контроля получала только антибиотик, а две основные группы крыс антибиотик + лозартан/каптоприл. При гистологическом исследовании групп контроля и основных групп через 48 ч и на 7-й день применения препаратов авторы не выявили достоверной разницы в нефропротективном эффекте данных препаратов. Однако на 6-й неделе эксперимента было отмечено меньшее количество рубцовой ткани у 1/3 крыс в обеих группах, получавших и антибиотик, и лозартан/каптоприл за счет блокады РААС [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты морфологических исследований почек и профиброгенных факторов в моче у крыс с моделированным инфицированным ПМР, осложненным РН, показали, что раннее назначение иАПФ с целью блокады Ang II и ренопротекции предупреждало развитие тяжелого нефросклероза, а также в этой группе крыс была меньше выражена степень интерстициального отека и клеточной инфильтрации. Вероятно, это связано с действием иАПФ как на системную, так и локально на внутривисцеральную гемодинамику и на снижение внутривисцеральной продукции Ang II и TGF- β 1, что в итоге приводит к уменьшению интрагломерулярного капиллярного давления и снижению фиброзированию почечной ткани, что согласуется с данными S. Kagami et al. (1994) и E. Serlachius et al. (1997) [33,34]. Мочевые уровни профиброгенных факторов были достоверно ниже в группе особей, которые получали 6 мес эналаприл. Исходя из полученных результатов, иАПФ снижают формирование фиброзной ткани в почках за счет снижения продукции фибробластами экстрацеллюлярного матрикса и профиброгенных факторов роста, но не влияют на сформировавшиеся очаги склероза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Giovanni M, Kjell T, Hewitt I. Febrile Urinary Tract Infections in Children. *New Engl J of Medicine* 2011; 365:239-250
2. Peters C, Rushton HG. Vesicoureteral reflux associated renal damage: congenital reflux nephropathy and acquired renal scarring. *J Urol* 2010; 184(1):265-273
3. Tej K. Mattoo. Vesicoureteral Reflux and Reflux Nephropathy

thy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2011; 18(5): 348–354

4. Лакомова ДЮ, Стародубова АВ, Максимова АВ. Ранняя диагностика и прогнозирование развития нефросклероза у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом. *Bulletin of Medical Internet Conferences* 2012; 2(1):27–28. [Lakomova DYU, Starodubova AV, Maksimova AV. Rannaya diagnostika i prognozirovanie razvitiya nefroskleroza u detej s puzyrno-mochetochnikovym refluksom. *Bulletin of Medical Internet Conferences* 2012; 2(1):27–28]

5. North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS). *Annual report. 2010. The EMMES Corporation, Rockville, MD*

6. Oh MM, Kim JW, Park MG et al. The impact of therapeutic delay time on acute scintigraphic lesion and ultimate scar formation in children with first febrile UTI. *Eur J Pediatr* 2012; 171(3):565

7. Skoog SJ, Peters CA, Arant BS Jr et al. Pediatric Vesicoureteral Reflux Guidelines Panel Summary Report: Clinical Practice Guidelines for Screening Siblings of Children With Vesicoureteral Reflux and Neonates/Infants With Prenatal Hydronephrosis. *J Urol* 2010; 184(3):1145–1151

8. Heather J. Lambert Primary, Nonsyndromic Vesicoureteric Reflux and Nephropathy in Sibling Pairs: A United Kingdom Cohort for a DNA Bank. *CJASN*, 2011; 6 (4) 760–766

9. Massanyi EZ, Preece J, Gupta A, et al. Utility of screening ultrasound after first febrile UTI among patients with clinically significant vesicoureteral reflux. *Urology* 2013;82(4):905

10. Salo J, Ikäheimo R, Tapiainen T et al. Childhood urinary tract infections as a cause of chronic kidney disease. *Pediatrics* 2011;128(5):840

11. Shaikh N, Ewing AL, Bhatnagar S et al. Risk of renal scarring in children with a first urinary tract infection: a systematic review. *Pediatrics* 2010;126:1084–1091

12. Paltiel HJ, Mulkern RV, Perez-Atayde A et al. Effect of chronic, low-pressure, sterile vesicoureteral reflux on renal growth and function in a porcine model: a radiologic and pathologic study. *Radiology* 2000; 217(2):507–515

13. Baek M, Paick SH, Jeong SJ et al. Urodynamic and histological changes in a sterile rabbit vesicoureteral reflux model. *J Korean Med Sci* 2010;25(9):1352–1358

14. Slotki IN, Asscher AW. Prevention of renal scarring in experimental pyelonephritis in the rat by early antibiotic therapy. *Nephron* 1982;30:262–268

15. Roberts JA, Kaack MB, Baskin G. Treatment of experimental pyelonephritis in the monkey. *J Urol* 1990;143(1):150–154

16. Silva AC, Flynn JT. The rennin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2012. DOI 10.1007/s0046-011-2002

17. Hussein A, Askar E, Elsaied M, Schaefer F. Functional polymorphisms in transforming growth factor-beta-1 (TGFbeta-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) genes modify risk of renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(3):779–785

18. Hussein A, Askar E, Elsaied M, Schaefer F. Functional polymorphisms in transforming growth factor-beta-1 (TGFbeta-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) genes modify risk of renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(3):779–785

19. Меркоданова ЮА, Утц ИА. Цитокиновый профиль мочи при различных этиопатогенетических вариантах хронического пиелонефрита у детей. *Саратовск науч-мед журн* 2011; 7(4): 901–904 [Merkodanova YA, Utts IA. Titokinovii profil mohi pri razlichnih ehtiopatogeneticheskikh variantah khronicheskogo pielonefrita u detei. *Saratovskii nauchno-meditsinskii jurnal* 2011; 7(4): 901–904]

20. Ibragim Gokce, Harica Alpay, Nese Biykli et al. Urinary levels of interleukin-6 and interleukin-8 in patients with vesicoureteral reflux and renal parenchymal scar. *Pediatr Nephrol* 2010; 25:905–912

21. Morales MG, Vazquez Y, Acuña MJ, Rivera JC, Simon F. Angiotensin II-induced pro-fibrotic effects require p38MAPK activity and transforming growth factor beta 1 expression in skeletal muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012 Nov;44(11):1993–2002

22. Rizvi S, Raza ST, Mahdi F. Association of genetic variants with diabetic nephropathy. *World J Diabetes* 2014; 15;5(6):809–186

23. Huo P, Zhang D, Guan X et al. Association between genetic polymorphisms of ACE & eNOS and diabetic nephropathy. *Mol Biol Rep* 2015;42(1):27–33

24. Мачехина ЛЮ. Современные взгляды на патогенетические механизмы, течение, прогноз и методы лечения рефлюкс-нефропатии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2010; 38 с. [Machehina LU. Sovremennye vzgliadi na patogeneticheskie mehanizmi, tehenie, prognoz i metodi lechenia refluks-nefropatii. Avtor. diss. na sosk. uh. step. kand. med. nauk, Moskva, 2010, 38 s]

25. Паунова СС, Ольхова ЕБ. Оценка эффективности ингибиторов АПФ у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом методом доплеровского исследования ренального кровотока. *Материалы 1 Всероссийского конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии»*. М., 2002; 399–400. [Paunova SS, Olhova EB. Otenka effektivnosti ingibitorov APF u detej s puzyrno-mochetochnikovym refluksom metodom dopplerovskogo issledovaniya renalnogo krvotoka. Materiali 1 Vserossiiskogo kongressa «Sovremennye tehnologii v pediatrii i detskoj hirurgii». Moskva, 2002. S. 399–400]

26. Лопухин ЮМ. Экспериментальная хирургия. М.: Медицина, 1971, 224 с. – прототип [Lopukhin YM. Eksperimentalnaa hirurgia. M.: Meditsina, 1971, s.224 – prototip]

27. Khalil A, Tullus K, Bakhiet M et al. Angiotensin II type I receptor antagonist (Losartan) down regulates transforming growth factor-β in experimental acute pyelonephritis. *J Urol* 2000;164:186–191

28. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Shahrarami A et al. Mycophenole mofetil ameliorates nephropathy in the obese Zucker rat. *Kidney Int* 2005;68:1041–1047

29. Peter J. Margetts, Catherine Hoff, Limin Liu. Transforming growth factor β-induced peritoneal fibrosis is mouse strain dependent. *Oxford Journals Medicine Nephrology Dialysis Transplantation* 2012 :28(8): 2015–2027

30. Gawłowska-Marciniak A, Niedzielski JK. Evaluation of TGF-β1, CCL5/RANTES and sFas/Apo-1 urine concentration in children with ureteropelvic junction obstruction. *Arch Med Sci* 2013; 9(5): 888–894

31. Kagami S, Border WA, Miller DE et al. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of TGF-β1 expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93:2431–2437

32. Serlachius E, Sundelin B, Eklof A. Pyelonephritis provokes growth retardation and apoptosis in infant rat renal cortex. *Kidney Int* 1997;51:1855–1862

33. Liang XL. Beyond Early Diagnosis: Prognostic Biomarkers for Monitoring Acute Kidney Injury: X.-L. Liang, W. Shi. *Hong Kong J Nephrol* 2010; 12(2):45–49

34. Singal AK, Bajpai M, Dinda AK. Blockade of rennin-angiotensin system blunts the fibrotic response in experimental acute pyelonephritis. *J of Indian Assot of pediat Surgeons Year* 2005;10 (1):20–24

Сведения об авторах:

Наталья Зайкова, к.м.н.

123317, Россия, Москва, Шмитовский проезд, д. 29. ГДКБ №9 им. Г.Н. Сперанского, врач высшей категории, педиатр-нефролог, ассистент кафедры педиатрии и инфекционных болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Институт Матери и Ребенка, Молдова, г. Кишинев, Тел.: (964) 529-90-49, E-mail: nataliazaikova@mail.ru

Natalia Zaicova, MD, PhD

Affiliations: 123317, Russia, Moscow, Shmitovscii st., 29. Department of Pediatrics and Communicable Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institution of Mother and Child Care, Kishinev, Moldova. Phone (964) 5299049: E-mail: nataliazaikova@mail.ru

Вержил Георгиевич Петрович
2060, Молдова, г. Кишинев, ул. Буребиста, д. 93. Институт Матери и Ребенка, кафедра патоморфологии, врач-морфолог, к.м.н. Тел.: (373) 523558; E-mail: petrovicivergil@yahoo.com
Verjil G. Petrovici –MD, PhD
Affiliations: 2060, Moldova, Kishinev, Burebista str, 93, Institution of Mother and Child Care. Phone (373) 523558; E-mail: petrovicivergil@yahoo.com

Лилия Васильевна Синицына
2060, Молдова, г. Кишинев, ул. Буребиста, д. 93. Институт Матери и Ребенка, кафедра патоморфологии, врач-морфолог, к.м.н, ст. научн. сотр. Тел.: (373) 52-35-58; E-mail: liliasinitsina@mail.ru
Lilia V.Sinitcina MD, PhD
Affiliations: 2060, Moldova, Kishinev, Burebista str, 93, Institution of Mother and Child Care. Phone (373) 523558; E-mail: liliasinitsina@mail.ru

Проф. Длин Владимир Викторович – д.м.н. зам директора по науке
125412, Россия, Москва, ул.Талдомская, д. 2. Научно-исследовательский клинический институт педиатрии «РНИМУ им. Н.И. Пирогова». Тел.: (495) 357-20-54, e-mail: niki@pedklin.ru
Prof. Vladimir V.Dlin – MD, PhD
Affiliations: 125412, Russia, Moscow, Taldomschii str, 2. Pirogov

Russian National Research Medical University. Phone (495) 357-20-54, e-mail: niki@pedklin.ru

Проф. Анатолий Александрович Корсунский
123317, Россия, Москва, Шмитовский проезд, д. 29. ГДКБ №9 им. «Г.Н.Сперанского», зав. кафедрой, кафедра педиатрии и инфекционных болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия. Тел.: (499) 256-21-62, e-mail: dr_kaa@mail.ru
Prof. Anatolii A. Korsunskiy – MD, PhD
Affiliations: 123317, Russia, Moscow, Shmitovscii st., 29. Department of Pediatrics and Communicable Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University. Phone: (499) 256-21-62, e-mail: dr_kaa@mail.ru

Штефан Георгиевич Гацкан – к.м.н,
Молдова, 2060, г. Кишинев, ул. Буребиста, д. 93. Директор Института Матери и Ребенка
Stefan G. Gatchkan – MD, PhD
Affiliations: 2060, Moldova, Kishinev, Burebista str, 93, Institution of Mother and Child Care. Phone (373) 52-35-58, E-mail: stgatkan@mail.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 03.01.2016 г.
Принята в печать: 18.03.2016 г.