ISSN 1561-6274. Нефрология. 2016. Том 20. №4.

© В.Ю.Перфильев, Я.Ф.Зверев, В.М.Брюханов, Т.М.Черданцева, И.П.Бобров, 2016
УДК [616.61 : 61.001.57] – 032.4

В.Ю. Перфильев[1], Я.Ф. Зверев[1], В.М. Брюханов[1], Т.М. Черданцева[2,3], И.П. Бобров[2]

УСПЕШНЫЙ ОПЫТ МОДЕЛИРОВАНИЯ УРАТНОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС

[1]Кафедра фармакологии; [2]Морфологическая лаборатория Центральной научно-исследовательской лаборатории; [3]кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии Алтайского государственного медицинского университета, Барнаул, Россия

V.Yu. Perfil'ev[1], Ya.F. Zverev[1], V.M. Bryukhanov[1], T.M. Cherdantceva[2,3], I.P. Bobrov[2]

SUCCESSFUL EXPERIENCE OF URATE NEPHROPATHY MODELING IN RATS

[1]Department of pharmacology; [2]Morphological laboratory Central research laboratory; [3]department of histology, embryology, cytology, Altai State Medical University, Barnaul, Russia

РЕФЕРАТ
ЦЕЛЬ: создать модель уратной нефропатии у крыс. *МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*: исследование выполнено на 25 крысах-самцах линии Вистар. С целью формирования уратной нефропатии крысам в составе стандартной лабораторной смеси давали оксониевую и мочевую кислоты (МК). С помощью биохимических и морфологических методов оценивали полученные изменения на 7-е, 14-е, 21-е сут. *РЕЗУЛЬТАТЫ*: в течение эксперимента был зафиксирован последовательный рост концентрации МК в плазме крови животных. Концентрация МК в моче и экскреции уратов существенно возросли. Одновременно фиксировали признаки повреждения почек: повышение экскреции белка с мочой, а также активность ряда ферментов в моче. Картина повреждения почек, характерная для уратной нефропатии, подтверждена результатами гистологического исследования: уже на 7-е сутки в просветах почечных канальцев определялись уратные депозиты. *ЗАКЛЮЧЕНИЕ:* выявленные функциональные, биохимические и морфологические изменения позволяют удостоверить факт наличия уратной нефропатии в условиях длительного ингибирования активности уриказы у крыс, что можно считать адекватной моделью соответствующего заболевания человека.

Ключевые слова: уратная нефропатия, экспериментальная модель на крысах.

ABSTRACT
THE AIM. To create model of urate nephropathy in rats. *MATERIAL AND METHODS*. The study was performed on 25 male Wistar rats. To form urate nephropathy rats were administered oxonium and uric acid (UA) as part of standard laboratory mixture. Using biochemical and morphological techniques were evaluated changes obtained on days 7, 14, 21. *RESULTS*. During the experiment was noticed sequential growth of UA concentration in the blood plasma of animals. The concentration of uric acid in the urine and excretion of urates increased significantly. At the same time in the course of the experiment were recorded signs of kidney injury: increased excretion of protein in the urine, and also activity of several enzymes in urine. Picture of kidney injury characteristic for urate nephropathy was confirmed by histological examination results: already on the 7th day in renal tubular lumen defined urate deposits. *CONCLUSION.* The identified functional, biochemical and morphological changes allow to certify existence of urate nephropathy in long-term inhibition of uricase in rats, which can be considered as an adequate model of the corresponding human disease.

Key words: urate nephropathy, experimental model in rats.

ВВЕДЕНИЕ

Уратная нефропатия – поражение почек, обусловленное отложением в них кристаллов мочевой кислоты (МК) с развитием нефролитиаза в результате гиперурикозурии, гиперурикемии, возникших вследствие нарушения пуринового обмена. В последние десятилетия распространение уратного нефролитиаза в индустриальных странах значительно возросло. Сегодня частота образования мочекислых камней составляет в среднем 7–10% от общего количества конкрементов, образующихся в почках [1]. Поэтому необходимость детального изучения данной патологии сохраняет свою актуальность. Новые стратегии в лечении мочекаменной болезни требуют широкого использования соответствующих экспериментальных моделей. Так, создана адекватная модель оксалатного нефролитиаза [2, 3].

Перфильев В.Ю. Россия, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии. Тел. +7 (3852) 24-18-59, E-mail 1991PS@mail.ru

Существует несколько подходов к моделированию уратного нефролитиаза. Один из них заключается в использовании трансгенных животных, имеющих мутацию в локусе гена, отвечающего за синтез уратоксидазы (уриказы) – фермента, метаболизирующего МК у большинства млекопитающих [4]. Это позволяет в 10 раз повысить концентрацию МК в сыворотке крови, однако обусловливает значительную летальность животных, когда 65% мышей не доживают до зрелого возраста, что, по существу, сделало данный метод неприемлемым. В этой связи представляется целесообразным вновь обратиться к традиционному методу моделирования уратного нефролитиаза у грызунов в условиях совместного длительного введения оксониевой и МК [5]. С момента разработки данной модели прошло более 40 лет, в течение которых представления о патогенезе уратного нефролитиаза претерпели значительные изменения. Цель исследования – создание модели уратной нефропатии у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 25 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 3–4 мес массой 250–330 г. Животные находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи. Условия содержания соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

В качестве диеты 10 контрольных крыс (группа № 1) ежедневно свободно потребляли по 20 г стандартной лабораторной смеси. 15 подопытных животных дополнительно в составе смеси ежедневно получали по 0,145 г оксониевой кислоты (ОК) и 0,3 г МК. Этих крыс разделили на 3 группы по 5 животных: группа №2 получала ОК и МК в течение 1 нед, группа №3 – в течение 2 нед, группа № 4 – в течение 3 нед. В конце каждой недели из эксперимента выводили по 3–4 крысы из контрольной группы.

Ежедневно у животных собирали суточную мочу, в которой определяли содержание МК, общего белка, креатинина для расчета скорости клубочковой фильтрации и активность ферментов-маркеров дисфункции почек – лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (НАГ). После декапитации у крыс забирали кровь для определения уровня МК и креатинина в плазме. Кроме того, у животных изымались почки для определения ряда параметров свободнорадикального окисления (активность каталазы, глутатионпероксидазы, концентрация восстановленного глутатиона), а также гистологического исследования.

Для расчетов и статистического анализа данных использовали пакеты прикладных программ Microsoft Office Excel 2003 («Microsoft Corporation», США) и Sigma-Stat 3.5 («Systat Software Inc.», США). Для сравнения данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из рис. 1, уже после первых 7 дней эксперимента концентрация МК в моче существенно выросла по сравнению с контрольными значениями и достигла своего максимума к концу 2-й недели наблюдения. Это обусловило существенное увеличение экскреции урата, достигшее максимума к 14-му дню опыта. После этого величина выделения МК с мочой стабилизировалась, сохраняясь примерно на одном уровне вплоть до окончания эксперимента.

В течение эксперимента (см. рис. 1) был также зафиксирован последовательный рост концентрации МК в плазме крови у животных. Повышение содержания МК в плазме впервые было отмечено уже на 7-е сутки эксперимента, статистической значимости

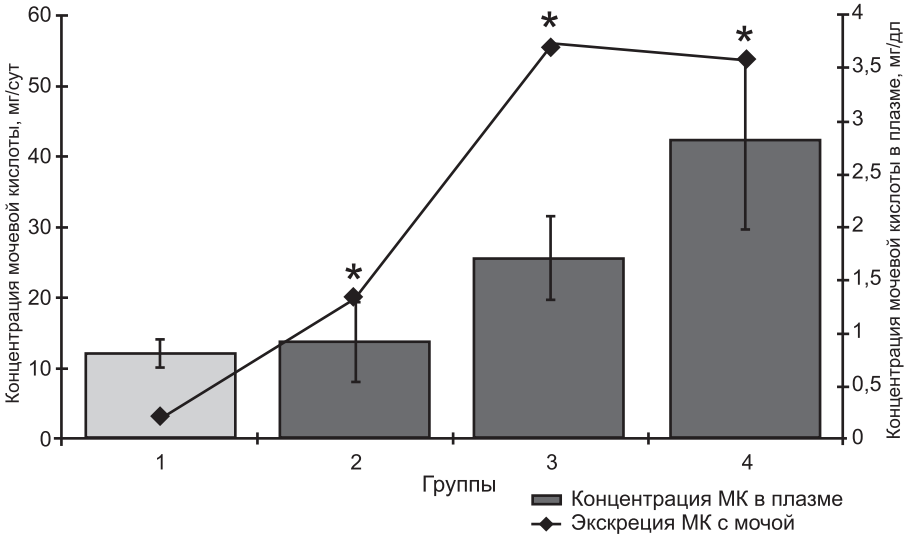

Рис. 1. Экскреция мочевой кислоты (МК) с мочой и ее концентрация в плазме крови.
Примечание. Звездочками (*) отмечены достоверные изменения экскреции МК в сравнении с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

Таблица

Ферменты-маркеры почечного повреждения в моче

Фермент, U/ммоль креатинина	1-я группа (Контроль)	2-я группа (1 неделя)	3-я группа (2 недели)	4-я группа (3 недели)
ЛДГ	0,4 (0,3; 0,4)	1,5 (1,1; 2,3)^{0,006}	3,1 (1,7; 5,0)^{0,003}	1,2 (0,6; 1,3)^{0,043}
НАГ	0,7 (0,7; 0,8)	1,0 (0,6; 1,1)^{0,426}	1,5 (1,2; 2,0)^{0,003}	1,7 (1,3; 2,0)^{0,006}
ГГТ	74,0 (54,5; 102,3)	27,6 (21,4; 59,3)^{0,043}	65,3 (60,1; 111,3)^{0,854}	42,0 (33,7; 87,9)^{0,159}

Примечание. Верхний индекс – уровень статистической достоверности в сравнении с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

различий этот показатель достиг к 14-м суткам, а к 21-м суткам уровень МК в плазме увеличился более чем в 3 раза.

Следует отметить, что уже на 1-е сутки после введения ОК и МК мы наблюдали существенное повышение диуреза у всех подопытных животных, причем тенденция к увеличению мочеотделения сохранялась на протяжении всего эксперимента. При этом отмеченные изменения его уровня происходили параллельно с ростом скорости клубочковой фильтрации, что, по-видимому, внесло вклад в обеспечение диуретической реакции.

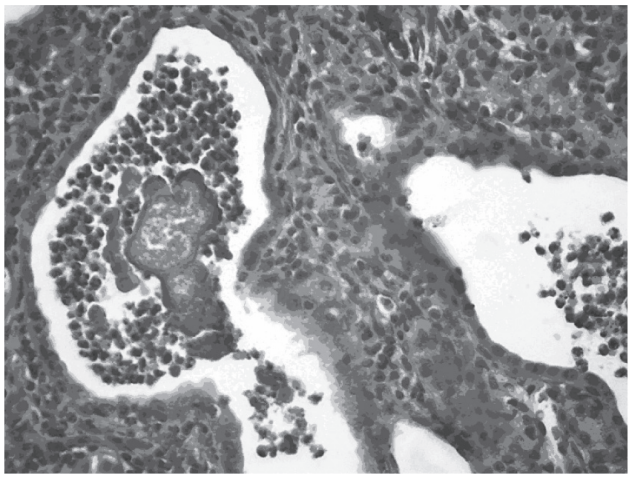

Рис. 2. Уратные микролиты и воспалительный инфильтрат в канальцах почки крысы на 14-й день эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

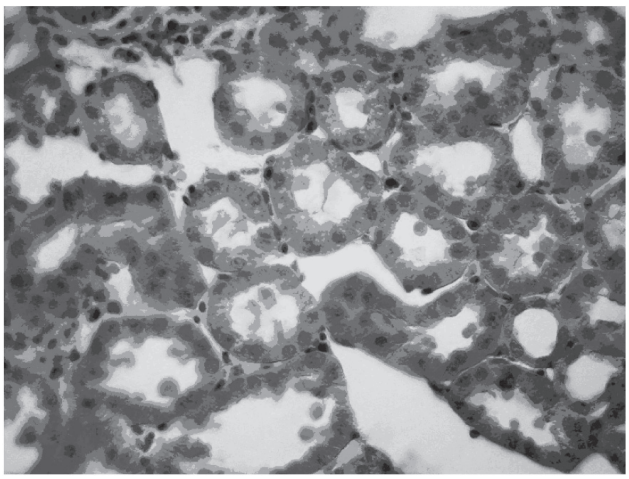

Рис. 3. Контрольная группа животных. Уратные депозиты не выявляются. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Одновременно по ходу эксперимента фиксировались признаки повреждения почек. Так, экскреция белка с мочой уже к концу 1-й недели на 60% превышала цифры контрольной группы, а к окончанию 2-й и 3-й недели наблюдения упомянутый показатель превосходил контрольные значения уже на 70%. Примечательно, что такая же динамика соответствовала выше отмеченным изменениям экскреции МК с мочой.

Факт развившейся уратной нефропатии подтвержден характером изменений активности в моче ряда ферментов, отражающих наличие повреждения почек. Как видно из таблицы, активность ЛДГ была значительно повышена на протяжении всего опыта, достигнув максимальных показателей к концу 2-й недели. Активность НАГ в моче значимо повышалась к 14-м суткам наблюдения. Иная динамика характеризовала изменения активности в моче ГГТ – этот показатель несколько снижался, особенно на начальной стадии эксперимента.

При оценке процесса свободнорадикального окисления в почечной ткани обращает внимание некоторое снижение активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы, особенно выраженное к концу 1-й недели эксперимента, и тенденция к росту восстановленного глутатиона в почечном гомогенате. Активность каталазы практически не изменялась.

Картина повреждения почек, характерная для уратной нефропатии, подтвердилась при гистологическом исследовании.

Так, уже на 7-е сутки моделирования уратного нефролитиаза в единичных расширенных почечных канальцах, эпителий которых выглядел уплощенным, а ядра клеток были уменьшены в размере, были зарегистрированы уратные депозиты.

При морфологическом исследовании почек крыс к окончанию 2-й недели эксперимента отмечались выраженные явления воспалительной инфильтрации в канальцах с преобладанием нейтрофильных лейкоцитов. Отложения солей МК наблюдались в просветах значительно расширенных

канальцев, преимущественно в составе белковых цилиндров (рис. 2).

На 21-й день эксперимента в просвете и в эпителии канальцев отмечали значительные отложения уратов. В областях отложения микролитов была видна выраженная лимфоплазмоцитарная инфильтрация и разрастание соединительной ткани с формированием выраженного перитубулярного и периваскулярного нефросклероза.

Отметим, что клубочки на протяжении всего эксперимента не были подвержены морфологическим изменениям.

У животных контрольной группы микроскопическая картина почек соответствовала гистологической норме. Уратные депозиты выявлены не были (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что образование уратных депозитов в канальцах достаточно выражено уже к концу 2-й недели эксперимента, причем к этому сроку в почках развиваются все, характерные для уратного нефролитиаза, воспалительные изменения.

Как известно, метаболизм пуринов у крыс отличается от такового у человека. Причина этого – наличие у крысы фермента уриказы, которая окисляет МК до хорошо растворимого аллантоина, который, в свою очередь, через ряд химических превращений деградирует до мочевины. Поэтому у крыс не бывает уратных камней. У человека такой фермент отсутствует. Для того, чтобы нивелировать это различие, мы использовали ингибитор печеночной уриказы – оксонат калия, что и привело к повышению уровня МК в плазме крови и клубочковом фильтрате [5]. Интересно отметить, что зафиксированное нами повышение экскреции МК регистрировалось лишь в первые две недели эксперимента, а к окончанию периода наблюдения этот показатель стабилизировался, несмотря на продолжающийся существенный рост концентрации МК в плазме крови у крыс. На наш взгляд, это свидетельствует о функциональной перегрузке почечного транспорта урата и способствует повреждающему действию уратных депозитов на почку. Об этом также свидетельствуют значительные отложения солей урата в эпителии канальцев на 21-е сутки эксперимента.

Повышение активности в моче ЛДГ, цитозольного фермента канальцевого эпителия, по-видимому, также обусловлено явлениями цитолиза. Вероятно, такова же причина снижения на 7-е сутки уровня ГГТ в моче. Кроме того, об изменении в канальцевом аппарате почки свидетельствует рост экскреции общего белка с мочой. Это согласуется с рядом литературных данных. Установлено, например, что нейтрофилы человека быстро поглощают кристаллы мононатрия урата [6]. Внутри нейтрофилов кристаллы окружаются единичной мембраной, образующей фагосому, которая превращается в фаголизосому, содержащую кислую фосфатазу. Фаголизосомальная мембрана растворяется и содержимое выходит в цитоплазму нейтрофила, что ведет к его лизису. Уратный кристалл высвобождается и инициирует повреждение в других клетках [7]. Значительное нарастающее повышение НАГ, лизосомального фермента, который, по мнению ряда авторов, является наилучшим маркером повреждения почек, свидетельствует о наличии функциональных нарушений в нефроне [8].

Известно, что МК определяет более 50% антиоксидантного потенциала крови человека, но при определенных условиях может приобретать свойства прооксиданта, чем, возможно, и объясняются изменения активности перекисного окисления липидов [9, 10]. Так, на 7-е сутки мы наблюдали снижение активности перекисного окисления липидов, выразившееся в повышении активности восстановленного глутатиона, что обусловлено, по всей видимости, антиоксидантными свойствами МК. Однако на 14-е сутки фиксировали значительное снижение активности глутатионпероксидазы и тенденцию к снижению восстановленного глутатиона, что может свидетельствовать об активации перекисного окисления липидов. Впрочем, изменения свободнорадикального окисления в условиях уратной нефропатии нуждаются в дальнейшем углубленном исследовании с определением всего комплекса соответствующих показателей не только в почечной ткани, но и в крови подопытных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные функциональные, биохимические и морфологические изменения подтверждают развитие уратной нефропатии в условиях длительного ингибирования активности уриказы у крыс, что можно считать адекватной моделью соответствующего заболевания человека.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Барскова ВГ, Мукагова МВ. Современные представления о патогенезе и методах коррекции уратного нефролитиаза у больных подагрой. *Современная ревматология* 2011; 5 (4): 39-43 [Barskova VG, Mukagova MV. Sovremenny`e predstavleniia o patogeneze i metodakh korrektcii uratnogo nefrolitiaza u bol`ny`kh podagroi`. *Sovremennaia revmatologiia* 2011; 5 (4): 39-43]

2. Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Лампатов ВВ и др. Методи-

ческие подходы к изучению функции почек в эксперименте на животных. *Нефрология* 2009; 13 (3): 52-62. [Briuhanov VM, Zverev IAF, Lampatov VV i dr. Metodicheskie podhody` k izucheniiu funktcii pochek v e`ksperimente na zhivotny`kh. *Nefrologiia* 2009; 13 (3): 52-62]

3. Жариков АЮ, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ и др. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза. *Нефрология* 2008; 12 (4): 28-35 [Zharikov AIU, Briuhanov VM, Zverev IAF i dr. Sovremenny`e metody` modelirovaniia oksalatnogo nefrolitiaza. Nefrologiia 2008; 12 (4): 28-35]

4. Wu X, Wakamiya M, Vaishnav S et al. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidasedeficient mice (gene targeting/animal model). *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 742-746

5. Stavric B, Johnson WJ, Grice HC. Uric acid nephropathy: an experimental model. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 130: 512-516

6. Holfstein S, Weissmann G. Mechanism of lysosomal enzyme release from leukocites. IV interaction of monosodium urate crystals with dogfish and human leukocytes. *Arthritis Rheum* 1975; 18: 153-165

7. Mazzali M, Kanellis J, Han L et al. Hyperuricemia induces a primary renal arteriolopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F992-F997

8. Simon G, Peterson S. Pathophysiology of increased urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in human hypertension: effect of cilazapril therapy. *Clin Exp Hypertens* 1988; 10 (5): 767-777

9. Титов ВН, Дмитриев ВА, Гущина ОВ и др. Физико-химическая активность мочевой кислоты. Гиперурикемия – нарушение биологических функций эндоэкологии и адаптации, биологических реакций экскреции, воспаления и гидродинамического артериального давления. *Успехи современной биологии* 2011; 131 (5): 483-502 [Titov VN, Dmitriev VA, Gushchina OV. i dr. Fiziko-himicheskaia aktivnost` mochevoi` kisloty`. Giperurikemiia – narushenie biologicheskikh funktcii` e`ndoe`kologii i adaptatcii, biologicheskikh reaktcii` e`kskretcii, vospaleniia i gidrodinamicheskogo arterial`nogo davleniia. *Uspehi sovremennoi` biologii* 2011; 131 (5): 483-502]

10. Álvarez-Lario B, Macarròn-Vicente J. Uric acid and evolution. *Rheumatology* 2010; 49 (11): 2010-2015

Сведения об авторах:

Перфильев Вячеслав Юрьевич
Россия, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии. Тел. +7 (3852) 24-18-59, +7 (923) 566-52-45, E-mail 1991PS@mail.ru.
Perfilev Y. Vyacheslav,
Affiliations: Russia, 656038, Barnaul, Lenin Avenue 40, Altai State Medical University, Department of Pharmacology. Phone: +7 (3852) 24-18-59, +7 (923) 566-52-45, E-mail 1991PS@mail.ru.

Проф. Зверев Яков Федорович
Россия, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии. Тел. +7 (3852) 24-18-68
Prof . Yakov F. Zverev DMedSci.,
Affiliations: Russia, 656038, Barnaul, Lenin Avenue 40, the Altai State Medical University, Department of Pharmacology. Phone: +7 (3852) 24-18-68, E-mail zver@asmu.ru.

Проф. Брюханов Валерий Михайлович
Россия, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии. Тел. +7 (3852) 24-18-68
Prof . Valery M. Bryukhanov, DMedSci
Affiliations: Russia, 656038, Barnaul, Lenin Avenue 40, the Altai State Medical University, Department of Pharmacology. Phone: +7 (3852) 24-18-68

Доц. Черданцева Татьяна Михайловна,
Россия, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский государственный медицинский университет, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, морфологическая лаборатория Центральной научно-исследовательской лаборатории. Тел. +7 (3852) 24-19-71
Associate professor Tatyana M. Cherdantseva, DMedSci.,
Affiliations: Russia, 656038, Barnaul, Lenin Avenue 40, Altai State Medical University, Department of histology, embryology, cytology, Morphological Laboratory of Central Research Laboratory. Phone: +7 (3852) 24-19-71

Бобров Игорь Петрович,
Россия, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский государственный медицинский университет, морфологическая лаборатория Центральной научно-исследовательской лаборатории. Тел. +7 (3852) 24-19-71
Bobrov P. Igor MD
Affiliations: Russia, 656038, Barnaul, Lenin Avenue 40, Altai State Medical University, Morphological Laboratory of Central Research Laboratory. Phone: +7 (3852) 24-19-71

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 10.02.2016 г.
Принята в печать: 12.05.2016 г.