

© Н.В.Мотина, В.М.Брюханов, Я.Ф.Зверев, С.В.Талалаев, В.В.Лампатов, А.Ю.Жариков, Ю.Г.Мотин, 2011
УДК 616.61-003.7-08.272]-092.4

*Н.В. Мотина¹, В.М. Брюханов², Я.Ф. Зверев², С.В. Талалаев¹,
В.В. Лампатов², А.Ю. Жариков², Ю.Г. Мотин¹*

БЛАГОПРИЯТНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ НА СТРУКТУРНУЮ ПЕРЕСТРОЙКУ ПОЧКИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА

*N.V. Motina, V.M. Bruykanov, Ya.F. Zverev, S.V. Talalaev, V.V. Lampatov,
A.Yu. Zharikov, Yu.G. Motin*

BENEFICIAL EFFECT OF ANTIOXIDANT THERAPY ON RENAL STRUCTURE OF THE RATS WITH EXPERIMENTAL CALCIUM OXALATE NEPHROLITHIASIS

¹Кафедра гистологии, ²кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Для оценки влияния антиоксидантной терапии на структуру почки проведено морфологическое исследование почек крыс с индуцированным экспериментальным оксалатным нефролитиазом. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** У крыс с индуцированным экспериментальным оксалатным нефролитиазом оценивали структурные изменения мозгового вещества почки, особенности распределения соединений кальция и их размер. Иммуногистохимическими методами определяли выраженность экспрессии показателей оксидативного повреждения (малоновый диальдегид) и антиоксидантной защиты (митохондриальная супероксиддисмутаза). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** При моделировании экспериментального оксалатного нефролитиаза в почках крыс на светооптическом уровне отмечаются признаки патогистологической перестройки органа, наличие в канальцевой системе почки и в элементах интерстиция соединений кальция, а также выявляются морфологические признаки активации процессов оксидативного повреждения тканей и клеток и ослабления функционирования системы ферментной антиоксидантной защиты. В условиях применения α -токоферола в качестве средства антиоксидантной терапии отмечено определенное снижение выраженности структурной перестройки почек, оксидативного повреждения тканей и клеток и сохранение системы ферментной антиоксидантной защиты. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, применение антиоксиданта оказывает благоприятное воздействие на морфоструктурную перестройку почек у животных с индуцированным нефролитиазом.

Ключевые слова: экспериментальный нефролитиаз, морфология почки, антиоксиданты, свободно-радикальное окисление.

ABSTRACT

THE AIM. To assess the effect of antioxidant therapy on renal structure in rats with experimentally induced calcium oxalate nephrolithiasis. **MATERIAL AND METHODS.** In rats with experimentally induced calcium oxalate nephrolithiasis evaluated structural changes in renal medulla, particularly the distribution of calcium compounds and their size. The oxidative damage (malonic dialdehyde) and antioxidant (mitochondrial superoxide dismutase) markers expression were determined by immunohistochemistry. **RESULTS.** There are picture of pathohistological restructuring of the renal tissue. Calcium compounds in the tubular system and interstitial space was noted. The morphological signs of activation of oxidative stress and the weakening of the antioxidant defense took place. In α -tocopherol use as antioxidant therapy was noted a certain reduction of expression of the structural adjustment renal oxidative damage to tissues and cells and maintaining a system of enzymatic antioxidant defense. **CONCLUSION.** Thus, the use of antioxidants has a beneficial effect on morphological structural restructuring kidney in animals with induced nephrolithiasis.

Key words: experimental nephrolithiasis, kidney morphology, antioxidants, free radical oxidation.

ВВЕДЕНИЕ

До сих пор нет единого мнения о причинах и механизмах формирования почечных камней. Не-

смотря на тот факт, что у здоровых людей в почках и в начальных отделах мочевыводящих путей постоянно протекают процессы формирования кристаллов, у большинства камней не образуется. Это обусловило появление целого ряда гипотез относительно патогенеза развития нефролитиаза [1].

Зверев Я.Ф. 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40, Алтайский государственный медицинский университет. Тел.: (3852) 26-08-35; E-mail: zver@asmu.ru

Почечные камни могут различаться по химическому составу, но наиболее часто они представлены кальциевой солью щавелевой кислоты [2]. Установлено, что кристаллы оксалата кальция способны индуцировать тканевые реакции в эпителии дистальных отделов почечных канальцев и собирательных трубок [3]. Возникающие при этом воспалительные изменения являются следствием прямого повреждающего воздействия кристаллов. В последние годы сформировалось мнение, согласно которому повреждение эпителиоцитов канальцев почки при оксалатном нефролитиазе напрямую связано с активацией процесса свободно-радикального окисления (СРО) в почке [4].

Хорошо известно, что мощными антиоксидантными свойствами обладает α -токоферол (витамин Е). Он способен защищать от воздействия свободных радикалов клетки организма, снижать уровень оксидативного повреждения, предупреждать морфологические изменения. Помимо антиоксидантной активности, α -токоферол обладает достаточно выраженными противовоспалительными свойствами [5, 6].

Цель исследования – определить выраженность экспрессии показателей оксидативного повреждения (малоновый диальдегид) и антиоксидантной защиты (митохондриальная супероксиддисмутаза) при этиленгликолевой модели оксалатного нефролитиаза и в условиях применения α -токоферола.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель оксалатного нефролитиаза была воспроизведена на 60 самцах беспородных крыс массой тела от 180 до 250 г.

Все животные были разделены на три группы по 20 крыс. Крысы первой группы находились на общевиварном рационе, получали в качестве питья водопроводную воду, мочекаменная болезнь не инициировалась. Данная группа оставалась интактной и использовалась в качестве контрольной. Животные второй группы на фоне стандартной диеты получали в качестве питья 1% раствор этиленгликоля в течение 6 нед, что индуцировало развитие экспериментального оксалатного нефролитиаза [7]. В третьей группе животных моделировали экспериментальный нефролитиаз в течение 3 нед, последующие 3 нед на фоне продолжающегося приема этиленгликоля животные получали с пищей α -токоферол в дозе 300 мг/кг.

Для гистологического исследования животных декапитировали путем дислокации шейного позвонка под эфирным наркозом с соблюдением требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для эксперименталь-

ных или других научных целей» (Страсбург, 1986), и Федерального закона Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Материалом исследования послужила 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.

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

Для определения биосинтетической активности и общей функциональной жизнеспособности клеток использовали полихромную методику окраски сафранином-О (Т) по А.Н. Яцковскому, дающую возможность судить о клеточной активности по степени конденсации хроматина.

Для выявления соединительнотканых элементов и оценки степени зрелости соединительной ткани использовали окраску на фибрин по MSB-методу (Marcius-Scarlett-Blue) в модификации Д.Д. Зербино.

Для определения экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы (СОД-2) и малонового диальдегида (МДА) проводили непрямой двухшаговый стрептавидин-биотиновый метод с контролем специфичности реакции. После стандартной процедуры депарафинизации и регидратации выполняли блокирование эндогенной пероксидазы согласно рекомендациям производителя антител («Santa Cruz», USA).

Восстановление антигенной специфичности производилось с помощью предварительной обработки срезов, погруженных в цитратный буфер (рН 6,0), в микроволновой печи при мощности 600 Вт, три раза по 7 мин [8].

В качестве первичных антител использовали антитела к СОД-2 (G-20: sc-18504), 1:100 и антитела к МДА (F-25: sc-130087), 1:30 фирмы «Santa Cruz» (USA).

Продукт реакции визуализировали с помощью системы Goat ABC Staining system: sc-2023 («Santa Cruz») и диаминобензидина (ДАБ).

Морфометрические исследования проводили с использованием программных пакетов ImageJ 1.43 и AxioVision 3.1. Степень экспрессии (в баллах – 1+, 2+, 3+) оценивали по интенсивности окрашивания ДАБ с применением программы анализа изображений ImageJ 1.43. Для удобства интерпретации результатов полученные данные рассчитывали по

формуле: $E\% = 100 - \frac{100 \times D_x}{256}$, где $E\%$ – процент экспрессии, 256 – максимум интенсивности окраски, D_x – интенсивность окрашивания ДАБ.

Результаты работы представлены в виде значений $\bar{X}$ (средняя), m (ошибка средней), $p < 0,05$. Оценку межгрупповых различий проводили по критерию Данна и Манна–Уитни (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. Кальциевые депозиты у крыс интактной группы гистохимически не верифицированы.

Иммуногистохимическое исследование показало умеренно выраженную экспрессию СОД-2 в цитоплазме эпителиальных клеток канальцев нефрона, эпителиоцитах собирательных трубок. Экспрессия МДА была слабо выраженной.

Результаты морфологического исследования показали, что уже через 3 нед моделирования оксалатного нефролитиаза в почках наблюдались деформация почечных телец, расширение капиллярных петель сосудистых клубочков, в отдельных случаях – локальное утолщение и деструкция наружного листка капсулы почечного тельца. Отмечались дистрофические изменения эпителия канальцев и собирательных трубок в виде гидропической дистрофии, его десквамация, слущенный эпителий и белковые депозиты в просвете канальцев. Наблюдалось расширение канальцевой системы, просвет собирательных трубок был неравномерен, составляя в среднем $24,8 \pm 0,74$. Аналогичная морфологическая картина, но с более выраженными признаками структурной реорганизации тканей почки, была характерна для крыс, получавших этиленгликоль на протяжении 6 нед.

Отложения соединений 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 поле зрения определялись умеренные количества кальциевых депозитов ($21,4 \pm 3,40$) со средним размером $16,5 \pm 0,60$ мкм. Выявлялась инкрустация эпителия собирательных трубок соединениями кальция. В 10% наблюдений обнаруживались довольно крупные микролиты (размером до 30–35 мкм) с obturацией просвета собирательных трубок. В

областях отложения кальция выявлялись разрастания соединительной ткани с формированием перитубулярного и периваскулярного фиброза. Определялось резкое снижение функциональной активности эпителиоцитов канальцев, содержащих в просвете микролиты.

Иммуногистохимическое исследование почек крыс с экспериментальной моделью нефролитиаза показало в целом статистически значимое уменьшение экспрессии СОД-2 в эпителиоцитах собирательных трубок. Во внутренней зоне мозгового вещества этот показатель оказался существенно сниженным, на 5,3% уступая цифрам интактных почек. В эпителиоцитах собирательных трубок, obturированных камнем, снижение экспрессии СОД-2 достигало максимума и было на 7,5% ниже контрольных показателей (рис.1). В ряде случаев на некотором удалении от obturирующих собирательные трубки камней в эпителиоцитах отмечалось определенное усиление экспрессии СОД-2.

На фоне ослабления антиоксидантной защиты наблюдалось статистически значимое повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), определяемых в эпителиоцитах канальцев нефрона, собирательных трубок, переходного эпителия чашечно-лоханочной системы, элементах интерстиция.

В мозговом веществе отмечались неравномерное расширение просвета собирательных трубок, очаговая интерстициальная и субэпителиальная (под переходным эпителием) лимфогистиоцитарная инфильтрация.

На фоне применения антиоксиданта определялась меньшая выраженность патогистологической перестройки структур почки. В корковом веществе наблюдались умеренно выраженные изменения эпителия проксимальных и дистальных канальцев по типу гиалиново-капельной дистрофии. Переходный эпителий чашечно-лоханочной системы был сохранен. В эпителиоцитах собирательных трубок коркового и мозгового вещества также отмечались признаки гиалиново-капельной дистрофии. Просвет собирательных трубок характеризовался относительной равномерностью в различных полях зрения, составляя в среднем $16,4 \pm 1,6$ мкм. В просвете некоторых собирательных трубок располагались одиночные слущенные эпителиоциты, белковые цилиндры. Отмечалась умеренно выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация интерстиция почечного сосочка.

В мозговом веществе почки определялись многочисленные (до $17,6 \pm 2,4$ в поле зрения) соединения кальция, располагавшиеся относительно равномерно по всей площади почечного сосочка, пре-

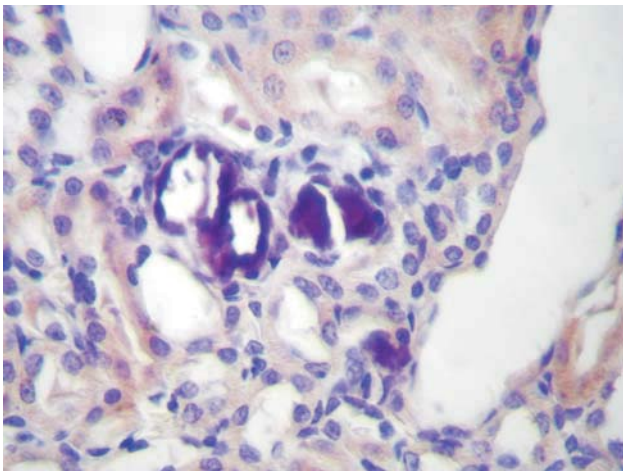


Рис. 1. Экспериментальный нефролитиаз 21 сут. Снижение экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы эпителиоцитами вокруг микролитов. Ув. 400.

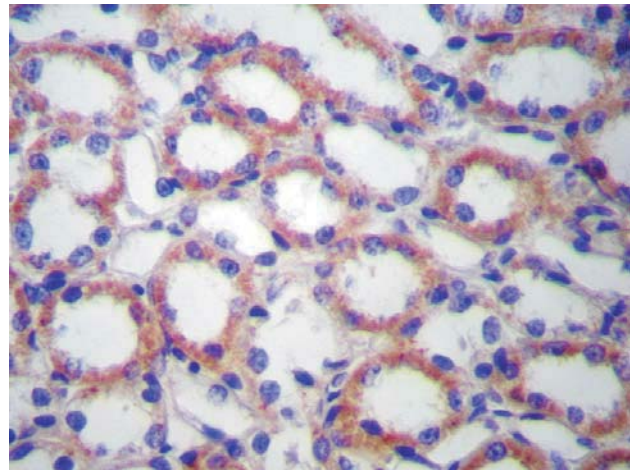


Рис. 2. Применение антиоксиданта. Выраженная экспрессия митохондриальной супероксиддисмутазы эпителиоцитами собирательных трубок. Ув. 400.

имущественно в составе эпителия собирательных трубок и в их просвете, среди слущенных эпителиоцитов. Кальциевые депозиты были мелкие, их средний размер составил $5,4 \pm 0,28$ мкм. Крупных микролитов, обтурировавших просвет канальцев, или инкрустаций их эпителия не обнаруживалось.

Иммуногистохимическое исследование показало умеренно выраженную экспрессию СОД-2 эпителиоцитами собирательных трубок, сопоставимую с показателями интактной группы (рис. 1). Во внутренней зоне мозгового вещества этот показатель оказался даже существенно выше, на 2,2% превышая показатели интактных почек. Определялась слабая экспрессия СОД-2 в переходном эпителии, выстилающем почечную лоханку (рис. 2). Выраженность экспрессии СОД-2 на фоне использования антиоксиданта во всех отделах мозгового вещества статистически значимо (на 12,5%) превышала показатели животных с экспериментальной моделью оксалатного нефролитиаза.

Одновременно в условиях применения антиоксиданта выявлялось снижение содержания продуктов ПОЛ. Несмотря на то, что экспрессия МДА отмечалась в эпителиоцитах канальцев нефрона, собирательных трубок, переходного эпителия чашечно-лоханочной системы, элементах интерстиция, ее выраженность была сопоставима с таковой в интактной группе, но существенно ниже, чем у животных с оксалатным нефролитиазом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Важным фактором формирования мочевых камней являются структурная перестройка и повреждение различной степени выраженности клеток и тканевых структур органа. При этом многочисленные данные свидетельствуют о неизменном возникновении оксидативного стресса, вносящего

существенный вклад в процесс формирования кальциевых депозитов [4].

Как известно, конечным продуктом перекисного окисления липидов (ПОЛ) является малоновый диальдегид. Он служит одним из маркеров оксидативного повреждения клеток и тканевых структур.

Среди множества источников свободных радикалов основным местом их продукции является дыхательная цепь цитохромов внутренней мембраны митохондрий. Более того, митохондрии являются основным источником продуктов ПОЛ – МДА, а локальная система митохондриальной антиоксидантной защиты – важнейшим ограничивающим фактором распространения свободных радикалов и ограничения выхода растворимого цитохрома С в цитоплазму клетки. Первым ферментом в каскаде нейтрализации свободных радикалов в митохондриях является супероксиддисмутаза. Она локализуется в матриксе митохондрий, где превращает супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$) в перекись водорода (H_2O_2).

Выявленные признаки структурной перестройки тканей почки в виде дистрофии эпителия, его слущивания, расширения просвета канальцев и собирательных трубок, мононуклеарной инфильтрации интерстиция свидетельствуют о возможности развития процессов нефролитиаза. Это подтверждается гистохимическим обнаружением в канальцевой системе почки и в элементах интерстиция соединений кальция.

В условия блокирования процессов оксидативного повреждения α -токоферолом отмечена меньшая степень выраженности структурной перестройки почек по сравнению с группой животных с нефролитиазом. Так, несмотря на то, что в канальцевой системе органа отмечались признаки гиалиново-капельной дистрофии, просвет собира-

тельных трубок был лишь незначительно расширен и характеризовался относительной равномерностью в пределах почечного сосочка. Хотя количество кальциевых депозитов в поле зрения снижалось не столь значительно по сравнению с экспериментальной группой животных, размер соединений кальция на фоне применения антиоксидантов уменьшался более чем в 3 раза!

Снижение экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы в местах интенсивного литогенеза указывает на возможное истощение ферментов системы антиоксидантной защиты. Кроме того, не следует исключать возможность снижения экспрессии митохондриальных антиоксидантных ферментов, обусловленную дистрофическими изменениями эпителиоцитов вблизи крупных камней и подавлением их общей функциональной активности. Увеличение в этой ситуации экспрессии тканями почек малонового диальдегида указывает на активацию процессов свободно-радикального окисления и ослабление антиоксидантной защиты в почках в ходе моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза.

Полученные данные согласуются с результатами биохимического исследования, проведенного в нашей лаборатории ранее, в котором в результате трехнедельного потребления крысами 1% раствора этиленгликоля было выявлено увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов в 1,8 раза [9].

У животных на фоне блокирования процессов оксидативного повреждения α -токоферолом показатели экспрессии малонового диальдегида и митохондриальной супероксиддисмутазы в целом соответствовали показателям интактной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза в почках крыс отмечаются морфологические признаки активации процессов оксидативного повреждения тканей и кле-

ток и ослабления функционирования системы ферментной антиоксидантной защиты. Более всего эти изменения выражены вблизи микролитов, обтурирующих собирательные трубки, что по своему местоположению соответствует зонам максимальной патогистологической перестройки тканей почки.

Применение антиоксиданта оказывает благоприятное воздействие на морфоструктурную перестройку почек у животных с индуцированным нефролитиазом. В этих условиях отмечено определенное снижение выраженности структурной перестройки почек, оксидативного повреждения тканей и клеток и сохранение системы ферментной антиоксидантной защиты.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Coe FL, Evan AP, Worcester EM, Lingeran JE. Three pathways for human kidney stone formation. *Urol Res* 2010; 38: 147-160
2. Вошула ВИ. Мочекаменная болезнь: этиотропное и патогенетическое лечение, профилактика. ВЭВЭР, Мн., 2006; 286
3. Khan SR. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis and the formation of human urinary stones. *Scanning Microsc* 1995; 9 (1): 89-100
4. Жариков АЮ, Зверев ЯФ, Брюханов ВМ, Лампатов ВВ. Механизм формирования кристаллов при оксалатном нефролитиазе. *Нефрология* 2009; 13 (4): 37-50
5. Tsiakitzis K, Kourounakis AP, Tani E et al. Stress and active oxygen species – effect of alpha-tokopherol on stress response. *Archiv der Pharmazie* 2005; 338 (7): 315-321
6. Булгаков С. Витамин Е – высокоэффективный антиоксидант. *Врач* 2007; (7): 44-47
7. Жариков АЮ, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Лампатов ВВ. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза. *Нефрология* 2008; 12 (4): 28-35
8. Гуревич ЛЕ, Исаков ВА. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности воздействием микроволн на ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин. *Архив патологии* 1999; (2): 48-50
9. Зверев ЯФ, Брюханов ВМ, Талалаева ОС и др. О роли процессов свободно-радикального окисления в развитии экспериментального. *Нефрология* 2008; 12 (1): 58-63

Поступила в редакцию 23.12.2010 г.

Принята в печать 09.02.2011 г.