

© Э.Ф.Баринов, О.Н.Сулаева, 2008
УДК 616.617-08:611.84/.88-008.313]-092.4

Э.Ф. Баринов¹, О.Н. Сулаева¹

НЕФРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ БЛОКАДЫ AT₁ РЕЦЕПТОРОВ ПОСЛЕ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ УРОДИНАМИКИ

E.F. Barinov, O.N. Sulaeva

NEPHROPROTECTIVE EFFECT OF BLOCKADE OF AT₁ RECEPTORS AFTER ACUTE DEGRADATION OF URODYNAMICS

¹ Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии Донецкого Национального медицинского университета им. М. Горького, Украина

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ является конкретизация морфогенетических механизмов реализации нефропротекторного эффекта блокады AT₁ рецепторов у крыс после нарушения уродинамики, которое воспроизводили в модели острой обструкции мочеточника. **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** В 1-ю группу вошли животные без фармакологической коррекции (n=30). Крысы 2-й группы (n=30) получали Лозартан (10 мг/кг в день) в течение 2 недель после восстановления уродинамики. Морфологическое состояние почки с использованием количественных критериев исследовали через 7, 14 и 30 суток. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Через 7 дней во 2-й группе отмечена оптимизация гломерулярного и перитубулярного кровотока при снижении степени альтерации канальцев коркового и наружного мозгового вещества соответственно на 26,41% и 48,51%. Удельный объем (УО) инфильтратов в коре, наружной и внутренней медулле почки КВ, НМ и ВМ органа при блокаде AT₁ рецепторов был соответственно на 36,57%, 40,34% (p<0,01) и 17,42% ниже (p<0,05), чем в 1-й группе. Через 14 суток в корковом и наружном мозговом веществе постобструктивной почки крыс 2-й группы выявлено снижение интенсивности воспалительной инфильтрации, нормализация состояния перитубулярных капилляров, усиление репаративных процессов в почке: УО канальцев с нормальным строением и признаками регенерации был на 9,67% (p<0,05) и 59,26% (p<0,01) выше, а УО канальцев с признаками альтерации – на 60,19% ниже, чем в 1-й группе (p<0,01). К 30-м суткам выявлено ограничение фиброзирования в постобструктивной почке: УО интерстиция был на 21,43%, 25,53 и 17,65% ниже, чем в 1-й группе соответственно в корковом, наружном и внутреннем мозговом веществе. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Блокада AT₁ рецепторов способствует восстановлению структурно-функционального состояния коркового вещества, завершению воспалительно-репаративного процесса и ограничению фиброза в мозговом веществе постобструктивной почки.

Ключевые слова: почка, острая обструкция мочеточника, AT₁ рецепторы.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation is concrete definition of morphogenetic mechanisms of realization of nephroprotective effect of AT₁ receptor blockade in rats after degradation of urodynamics which was produced in the model of acute obstruction of the ureter. **MATERIAL AND METHODS.** The first group (n=30) included animals without pharmacological correction. Rats of the second group (n=30) were given Losartan (10 mg/kg a day) during 2 weeks after restoration of urodynamics. The morphological state of the kidney was investigated in 7, 14 and 30 days using quantitative criteria. **RESULTS.** In 7 days in the second group of animals there was optimization of the glomerular and peritubular blood flow with the decreased degree of alteration of the tubules of the cortical and external medullary substance by 26.41% and 48.51% respectively. The specific volume (SV) of infiltrates in the cortex external and internal medulla of the kidney with AT₁ receptor blockade was respectively 36.57%, 40.34% (p<0.01) and 17.42% lower (p<0.05) that in the first group. Within 14 days in the cortical and external medullary substance of the postobstructive kidney of the 2 group rats there was decreased intensity of the inflammatory infiltration, normalization of the state of peritubular capillaries, intensification of the reparative processes in the kidney: SV of the tubules with normal structure and regeneration signs was 9.67% (p<0.05) and 59.26% (p<0.01) higher, and SV of the tubules with the signs of alteration – 60.19% lower than in the first group (p<0.01). By the 30th day restriction of fibrosing in the postobstructive kidney was revealed: the interstitium SV was 21.43%, 25.53% and 17.65% lower than in the first group respectively in the cortical, external and internal medullary substance. **CONCLUSION.** AT₁ receptor blockade facilitates the restoration of the structural-functional state of the cortical substance, completion of the inflammatory-reparative process and limitation of fibrosis in the medullary substance of the postobstructive kidney.

Key words: kidney, acute obstruction of the ureter, AT₁ receptors.

ВВЕДЕНИЕ

Установлено, что повышенная реакция регуляторных систем, в частности, ренин-ангиотензиновой (РАС), в ответ на острое нарушение уродинамики может быть причиной нарушения функций

почки [1, 2]. Ключевыми морфогенетическими процессами при этом являются апоптоз эпителиоцитов канальцев, воспалительная инфильтрация и склероз интерстиция [3, 4]. Реализация указанных событий связана с активацией AT₁ рецепторов к ангиотензину II (АнгII). Данный феномен обусловлен широкой экспрессией AT₁ рецепторов в почке,

Баринов Э.Ф. 83003, Донецк, Украина, пр.Ильича, 16. Донецкий национальный медицинский университет.

которые обнаружены на поверхности эндотелия и гладких миоцитов сосудистой стенки, фибробластов и интерстициальных клеток стромы, мезангиальных клеток и подоцитов сосудистых клубочков, клеток эпителия канальцев нефронов и собирательных трубок [5]. Можно предположить, что раннее нивелирование патогенетических эффектов избыточного уровня Ангио-II путем блокады AT_1 рецепторов обеспечит восстановление структурно-функционального состояния почки, что требует проведения комплексного морфологического анализа структуры почки в постобструктивном периоде с использованием объективных критериев. Целью работы является конкретизация морфогенетических механизмов реализации нефропротекторного эффекта блокатора AT_1 рецепторов у крыс после ООМ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 70 крысах самцах линии Вистар исходной массой 220 ± 15 г. У 60 крыс моделировали одностороннюю ОМ в условиях гексеналового наркоза. Выполняли срединную лапаротомию, выделяли из окружающих тканей мочевой пузырь, рассекали стенку и в устье левого мочеточника вводили ангиокатетер. Свободный конец катетера выводили на шею и присоединяли к пластиковой пробирке для сбора мочи. Брюшную стенку послойно ушивали. ОМ воспроизводили через двое суток после операции, для чего катетер закрывали на 48 ч, после чего восстанавливали отток мочи из левой почки. Контрольную группу составили 10 ложнооперированных крыс. Экспериментальных животных разделили на две группы. В 1-ю группу вошли животные без фармакологической коррекции ($n=30$). Крысы 2-й группы ($n=30$) получали лозартан, который назначали животным сразу после устранения ООМ в дозе, не оказывающей гипотензивного эффекта (10 мг/кг в день), на протяжении двух недель [6].

Морфологическое состояние почки исследовали через 7, 14 и 30 суток после устранения ООМ; срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Браше, толудиновым синим, по методу Ван-Гизон, с помощью ШИК-реакции. Морфометрический анализ проводили с использованием квадратно-узловой тест-системы [7]. Подсчитывали удельный объем (УО) перитубулярных капилляров и лейкоцитарных инфильтратов в корковом веществе (КВ), наружной (НМ) и внутренней (ВМ) медулле почки. Для анализа состояния канальцевого аппарата нефронов и собирательных трубок (СТ) оценивали УО тубулярных профилей с нормальным строением, альтеративными изменениями (десквамация щеточной каемки, вакуолизация цитоплаз-

мы, некроз клеток), а также канальцы с признаками регенерации (фигуры митоза или увеличение внутриклеточного уровня РНК, оцененного с помощью метода Браше). Полученные результаты обрабатывали статистически [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

У животных, получавших блокатор AT_1 рецепторов, через 7 суток после устранения ООМ при гистологическом исследовании отмечено ограничение отека интерстиция и лейкоцитарной инфильтрации. УО инфильтратов в строме КВ, НМ и ВМ органа в сравнении с 1-й группой был соответственно на 36,57%, 40,34% ($p < 0,01$) и 17,42% ниже ($p < 0,05$). В корковом веществе крыс 2-й группы почечные тельца характеризовались неравномерным кровенаполнением гломерулярных капилляров. В некоторых ПТ отмечалась реакция мезангиальных клеток. Перитубулярная капиллярная сеть была умеренно расширена: УО сосудов КВ на 14,29% превысил контрольное значение ($p < 0,05$). Данная величина была на 11,11% ниже, чем у крыс без блокады AT_1 рецепторов ($p < 0,05$). В эпителии канальцев определялись набухание цитоплазмы клеток, явления вакуолизации, деструкции щеточной каемки в ПК, пролабирования ядер в просвет. При этом уровень альтерации канальцев в КВ был на 26,41% ниже, чем в аналогичной зоне крыс 1-й группы ($p < 0,01$). Степень альтеративных процессов была меньше в канальцах суперфициальных и кортикальных нефронов, что, вероятно, связано с различным уровнем ишемического повреждения структур КВ у животных 1-й и 2-й групп.

Морфометрическая оценка мозгового вещества почки позволила выявить защитный эффект блокады AT_1 рецепторов на структуры НМ. Так, количество канальцев с нормальным строением в НМ крыс 2-й группы было на 21,75% выше, а УО тубулярных структур с признаками альтерации оказался на 48,51% ниже, чем в 1-й группе ($p < 0,01$). УО сосудов в НМ на 21,43% превышал данный показатель в контроле ($p < 0,01$), хотя и был на 10,55% ниже, чем у крыс без коррекции ($p < 0,05$). УО инфильтратов в данной зоне был на 40,34% меньше, чем у крыс без коррекции лозартаном ($p < 0,01$). Во ВМ крыс 2-й группы через 7 суток после восстановления уродинамики блокада AT_1 рецепторов ограничивала альтерацию канальцев (их УО уменьшился на 20,59%; $p < 0,01$) и способствовала снижению воспалительной реакции (УО инфильтратов снизился на 17,42%; $p < 0,05$). Отчасти это было обусловлено восстановлением микроциркуляции в ВМ. Если у крыс 1-й группы УО сосудов на 37,14% превышал контроль ($p < 0,01$), то во 2-й

группе этот показатель на 25,71% отличался от нормы ($p < 0,05$). Эти изменения сопровождались повышением интенсивности репаративных процессов: отмечена пролиферация интерстициальных клеток, УО канальцев с признаками регенерации эпителия увеличился на 50,72% по сравнению с таковым в 1-й группе ($p < 0,01$).

Через 14 суток после устранения ООМ в корковом веществе почки выявлено выраженное снижение интенсивности воспалительной инфильтрации и отёка, нормализация состояния перитубулярных капилляров. Блокада AT_1 рецепторов способствовала повышению эффективности течения репаративных процессов в почке. Так, в КВ почек крыс 2-й группы, УО канальцев с нормальным строением и признаками регенерации был на 9,67% ($p < 0,05$) и 59,26% ($p < 0,01$) выше, а УО канальцев с признаками альтерации – на 60,19% ниже, чем в 1-й группе ($p < 0,01$). Репарация в КВ почек крыс 2-й группы происходила на фоне разрешения воспалительного процесса, о чем можно судить по динамике УО инфильтратов: за прошедшую неделю он снизился на 55,94% ($p < 0,01$), и был на 59,03% ниже, чем в 1-й группе ($p < 0,01$). При этом гемодинамический эффект блокады AT_1 рецепторов проявлялся снижением уровня перфузии ПТ нефронов и оптимизацией перитубулярной микроциркуляции.

В НМ к 14 суткам после устранения ООМ в почках крыс 2-й группы сохранялось относительное полнокровие перитубулярных капилляров, хотя при этом степень вазодилатации оказалась на 11,63% меньше, чем в 1-й группе ($p < 0,05$). УО инфильтратов снизился на 55,52% по сравнению с предыдущим сроком исследования ($p < 0,01$), и был в 2 раза выше показателя в 1-й группе ($p < 0,001$). Восстановление паренхиматозных структур наружной медуллы происходило также интенсивно, как и в КВ. Отмечено выраженное снижение УО канальцев с альтеративными изменениями – на 54,02% ($p < 0,01$). Данный показатель оказался на 64,57% ниже, чем у крыс 1-й группы ($p < 0,01$). Компенсаторным механизмом, направленным на восстановление целостности структур в НМ, можно считать сохранение высокого уровня регенераторных процессов. Менее выраженные темпы восстановления были зарегистрированы во ВМ постобструктивной почки крыс 2-й группы через 14 суток после ООМ. Здесь УО канальцев с нормальным строением вырос лишь на 5,95% по сравнению с 7-ми сутками ($p < 0,05$) и на 8,98% превысил показатель в 1-й группе ($p < 0,05$). УО сосудов снизился на 5,68% ($p < 0,05$), но тем не менее превышал показатель в контроле на 18,57% ($p < 0,01$). УО инфильтратов уменьшился на 33,63% по сравнению с пре-

дыдущим сроком исследования ($p < 0,01$), и был на 39,11% ниже, чем у крыс без коррекции ($p < 0,01$).

Через 1 месяц после устранения ООМ у крыс 2-й группы отмечена нормализация структуры коркового вещества постобструктивной почки. Важно отметить, что УО интерстиция в КВ был на 21,43% ($p < 0,01$) ниже, чем в 1-й группе, и не имел достоверных отличий от контроля. В НМ также были выявлены выраженные восстановительные процессы паренхиматозных структур органа, хотя в отдельных профилях тубулярных структур определялись дистрофические изменения. Местами имело место расширение перитубулярных капилляров, сохранялись мелкие локальные инфильтраты, определялась пролиферация фибробластов. При этом в условиях блокады AT_1 рецепторов УО канальцев с признаками дистрофии был практически в 5 раз ниже показателя у животных 1-й группы. УО сосудов в НМ крыс 2-й группы снизился на 7,94% по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$) исследования и на 9,38% отличался от такового у животных без коррекции ($p < 0,05$). УО интерстиция в НМ был на 25,53% ниже такового у крыс 1-й группы ($p < 0,01$). Во ВМ сохранялась картина неравномерного кровенаполнения сосудов и умеренная инфильтрация интерстиция. УО канальцев с дистрофическими изменениями за прошедшие 2 недели снижался в почках животных 2-й группы на 41,73% ($p < 0,01$) и был в 2,48 раза ниже, чем у крыс без коррекции. Пролонгирование воспалительно-репаративного процесса во ВМ сопровождалось активацией фиброгенеза, однако его распространенность была менее выражена, чем у животных без коррекции. Во 2-й группе УО интерстиция во ВМ к концу месяца после ООМ был на 17,65% ниже по сравнению с таковым у животных 1-й группы ($p < 0,05$).

Следовательно, блокада AT_1 рецепторов способствует восстановлению структурно-функционального состояния структур коркового вещества почки, завершение воспалительно-репаративного процесса и ограничение фиброза в наружном мозговом веществе органа, а также снижению выраженности тубуло-интерстициальных нарушений во внутренней медулле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты данной работы, блокада AT_1 рецепторов предотвращает развитие постобструктивной нефропатии. Необходимо отметить первичный цитопротекторный эффект блокады AT_1 рецепторов. Исследования [1, 3] продемонстрировали, что главным фактором развития постобструктивной нефропатии является выраженность апоптоза клеток тубулярного эпителия. Блокирование апоп-

тоза на ранних этапах после обструкции мочеточника предотвращает прогрессирование ренальных дисфункций и развитие нефросклероза в отдаленные сроки после восстановления уродинамики [9]. Предлагаются разные концепции, объясняющие механизмы индукции апоптоза при ООМ. Осново-полагающей является гипотеза о триггерной роли высокой концентрации Анг II [1]. Установлено, что уже через 7 дней после ООМ содержание Анг II в почке достигает критического уровня, запуская гибель клеток канальцев нефрона [2]. Применение блокаторов AT_1 рецепторов или ингибиторов АКФ предотвращает апоптоз клеток тубулярного эпителия [9]. Отчасти это связано с блокадой прооксидантного эффекта Анг II, реализуемого посредством AT_1 рецепторов. Кроме того, важным фактором повреждения тубулярного эпителия является поддержание микроциркуляторных нарушений при действии высоких доз Анг II и провоспалительная активация клеток канальцев, сопровождающаяся экспрессией хемокинов (MCP-1, RANTES, остеоопонтина, M-KCФ), инициирующих миграцию лейкоцитов из периферической крови [10]. Оптимизация почечной гемодинамики, зарегистрированная в рамках данной работы в корковом и наружном мозговом веществе при блокаде AT_1 рецепторов можно расценивать как фактор ограничения ишемического повреждения канальцев, где осуществляется энергозависимый транспорт электролитов.

Особого внимания заслуживает антифибротический эффект блокады AT_1 рецепторов после ООМ. К морфологическим проявлениям нефросклероза традиционно относят разрастание соединительной ткани и пространственное разобщение канальцев и перитубулярных капилляров, атрофию канальцевого эпителия, что, в итоге, определяет снижение канальцевой реабсорбции, потерю жидкости и электролитов [1]. В настоящее время сделан ряд попыток установить информативные критерии ранней диагностики и прогнозирования развития нефросклероза. Так, выявлена зависимость между развитием склеротических изменений в почке, выраженностью апоптоза и моноцитарно-макрофагальной инфильтрации на ранних этапах нефропатии [2]. Но ключевым фиброгеном считается трансформирующий фактор роста $b1$ ($TGF_{\beta 1}$). Полагают, что основным источником $TGF_{\beta 1}$ являются измененные клетки тубулярного эпителия (особенно атрофированного), а не моноциты-макрофаги [11]. При этом содержание $TGF_{\beta 1}$ в почке при ООМ прямопропорционально активации внутрипочечной РАС [4, 5], а точнее – уровню Анг II и реализации его эффектов через AT_1 рецепторы, активация которых ассоциирована со Smad-системой, контролирующей экспрессию $TGF_{\beta 1}$ [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе удалось впервые конкретизировать сроки проявления основных лечебных эффектов блокады AT_1 рецепторов в почке. В течение 1-й недели восстанавливается адекватная перфузия кортикальных и суперфициальных нефронов, что предотвращает гиперперфузию гломерул и увеличивает перитубулярный кровоток. При этом максимально воспроизводятся противовоспалительный и цитопротекторный эффекты препарата, что ограничивает потерю клеток, способных к функционированию и снижает потребности в репаративной регенерации гломерул и канальцев почки. Через 2 недели отмечено выраженное противовоспалительное действие препарата, что обусловлено не только снижением степени повреждения ренальных структур и профилактикой микроциркуляторных нарушений в органе, но и, вероятно, модуляцией активности лейкоцитов периферической крови, принимающих участие в реализации воспаления. При этом отмечено усиление регенераторных процессов в канальцах коркового и наружного мозгового вещества постобструктивной почки. К 30-м суткам выявляется ограничение фиброобразования стромы в постобструктивной почке. Данный феномен регистрировался спустя 2 недели после окончания приема препарата, что обосновывает целесообразность ранней блокады AT_1 рецепторов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Автандилов Г.Г. *Медицинская морфометрия*. Медицина, М., 1990; 138-147
2. Гланс С. *Медико-биологическая статистика*. Медицина, М., 1999; 129-147
3. Есаян АМ. Тканевая ренин-ангиотензиновая система почки. Новая стратегия нефропротекции. *Нефрология* 2002; 6 (3): 10-14
4. Перевезенцева ЮБ. Апоптоз и его роль в патогенезе заболеваний почек. *Нефрология* 2001; 5 (4): 17-23
5. Becker A, Baum M. Obstructive uropathy. *Early Hum Dev* 2006; 82 (1): 15-22
6. Chevalier RL. Specific molecular targeting of renal injury in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2006; 70 (7): 1200-1210
7. Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA et al. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290 (1): F4-13
8. Manucha W, Carrizo L, Alvarez S, Valles P. Effect of losartan pretreatment on kidney lipid content after unilateral obstruction in rats. *Cell Mol Biol* 2005; 851 (6): 539-545
9. Ruiz-Ortega M. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int* 2002; 82 [Suppl]: 12-22
10. Takefumi M, Cowley AW, Ito S. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: Physiological role of angiotensin II-induced oxidative stress. *Pharmacol Sci* 2006; 100: 2-8
11. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology* 2005; 10 (1): 48-56

Поступила в редакцию 07.02.2008 г.

Принята в печать 17.04.2008 г.