

© А.Н.Горшков, И.В.Марусов, О.Д.Ягмуров, Ю.Д.Игнатов, Н.А.Кузнецова, Ю.А.Петрова, 2013
УДК [615.276:616.61]-06-092.4

*А.Н. Горшков¹, И.В. Марусов², О.Д. Ягмуров¹, Ю.Д. Игнатов²,
Н.А. Кузнецова¹, Ю.А. Петрова¹*

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕФРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

*A.N. Gorshkov, I.V. Marusov, O.D. Yagmurov, Yu.D. Ignatov,
N.A. Kuznetsova, Yu.A. Petrova*

MORPHOLOGIC ASPECTS OF NONSTEROIDAL ANTIFLAMMATORY DRUGS NEPHROTOXIC EFFECT

¹Кафедра судебной медицины и правоповедения, ²кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Целью исследования явилось изучение морфологической картины повреждений почек, развивающихся при воздействии токсической дозы парацетамола при субхроническом введении, а также изучение потенциального протективного действия блокатора CysLT1 рецепторов – монтелукаста в отношении нефротоксичности парацетамола. **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДЫ.** Экспериментальное исследование проводилось на 30 беспородных половозрелых крысах-самцах, разделенных на три группы. Первой группе животных (10 крыс) парацетамол вводился энтерально через желудочный зонд в дозе 1000 мг/кг, что соответствует приблизительно 30–50% от LD50 этого препарата. Контрольной группе животных в количестве 10 крыс аналогично первой группе однократно энтерально вводили изотонический солевой раствор в объеме 1 мл. В третьей группе животным энтерально вводился блокатор пептидолейкотриеновых рецепторов монтелукаст в дозе 40 мг/кг и через 1 ч – парацетамол в дозе 1000 мг/кг. Гистологические исследования проводились на срезах 5 мкм. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показано, что введение субтерапевтических доз парацетамола оказывает нефротоксическое действие на все компоненты стромально-паренхиматозного звена гистогематического барьера нефрона и вызывает развитие выделительного некронефроза, сочетающегося с признаками гломерулита. Предварительное введение антилейкотриенового препарата (монтелукаст) оказывает протективное влияние. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Признаки повреждения паренхимы и стромы почек крыс, появляющиеся при экспериментальном воздействии парацетамола, отражают нарастающую структурно-функциональную деградацию органа с риском развития недостаточности почек. Блокаторы CysLT1 рецепторов, использованные в ходе эксперимента, уменьшают и нивелируют нефротоксическое действие ингибиторов циклооксигеназы типа 2.

Ключевые слова: эксперимент, нестероидные противовоспалительные средства, почки, морфология.

ABSTRACT

THE AIM. The aim of research to study of kidney morfologic injury pattern developing at paracetamol toxic dose effect at subchronic administration and also studying of potential protective effect of CysLT1 receptor blocker – montelukast in respect of paracetamol nephrotoxicity. **MATERIALS AND METHODS.** Experimental study was carried out on 30 outbred male rats males divided into three groups. First group (10 rats) received paracetamol orally by gastric tube in dose 1000 mg/kg, which is equivalent nearly 30-50% of LD50 of this drug. Control group (10 rats) received orally single dose 1 ml of isotonic saline solution. Third group received orally peptide-leukotriene receptor blocker montelukast in dose 40 mg/kg and 1 hour later – paracetamol in dose 1000 mg/kg. Histological research was carried out on 5 µm slices. **RESULTS.** It is shown that administration of paracetamol at subtherapeutic had nephrotoxic effect on all components of kidney tissue and causes development of excretory necronephrosis with glomerulitis. Pre-administration of antileukotriene medication (montelukast) have protective effect. **CONCLUSION.** Signs of rat kidneys parenchyma and stroma damage which occur during paracetamol reflect increasing structural functional degradation of organ with risk of kidney failure development. CysLT1 receptor blockers used during experiment reduce and neutralize nephrotoxic effect of cyclooxygenase 2 inhibitors.

Key words: experiment, nonsteroidal antiinflammatory drugs, kidneys, morphology.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, для установления нефротоксического воздействия лекарственных препаратов

и их комбинаций необходима морфологическая верификация с определением структурного эквивалента конкретного повреждающего фактора, способного манифестировать и модулировать те или иные патологические процессы почек [1, 2].

Как правило, слабо метаболизирующиеся

Кузнецова Н.А. 197089, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6/8, СПбГМУ, кафедра судебной медицины и правоповедения, корп. 30; тел. 234-55-50, e-mail: Vasilisa.kot@mail.ru

лекарственные вещества абсорбируются и распределяются в отдельных компонентах гистогематического барьера (ГГБ) нефрона в соответствии с их физико-химическими свойствами, а затем или подвергаются постепенной утилизации, оказывая токсическое повреждение структурным элементам почек, или «складируются», обильно засоряя гломерулярный фильтр [1–5].

Некоторые лекарственные вещества, напротив, быстро метаболизируются и приводят к образованию нефротоксичных промежуточных продуктов – метаболитов, в большом количестве накапливающихся в почечной ткани, разрушая ее структурные компоненты [5, 6].

Кумулятивные эффекты продолжительной или повторной экспозиции лекарственных веществ в ткани почек, как правило, извращают процессы утилизации и компенсаторные возможности органа, тем самым также приводят к грубым структурным деформациям нефрона.

К таким лекарственным препаратам относятся нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), ингибирующие циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2) и снижающие синтез простагландинов. Острые отравления ацетаминофеном, также известного под названием «парацетамол», в том числе летальные, занимают одну из лидирующих позиций по частоте регистрируемых лекарственных интоксикаций [7]. Широко известна потенциальная гепатотоксичность ацетаминофена при острых передозировках, в то время как внепеченочные варианты его токсичности, особенно патогенез структурных изменений ГГБ почек при длительных неконтролируемых употреблении парацетамола, изучены недостаточно.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение морфологической картины повреждений почек, развивающихся при воздействии токсической дозы парацетамола (на уровне 30–50% от LD50) при субхроническом введении, а также изучение потенциального протективного действия блокатора CysLT1 рецепторов монтелукаста в отношении нефротоксичности парацетамола в экспериментах на крысах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проводилось на 30 беспородных половозрелых крысах-самцах с исходной массой 170–200 г. В процессе эксперимента животные содержались в чистых пластмассовых клетках с регулировкой температуры и влажности. Экспериментальные животные получали стандартный пищевой рацион в условиях

соблюдения дневного и ночного циклов. Использование животных и протокол эксперимента соответствовали требуемым правилам международного стандарта по использованию лабораторных животных и утверждены комитетом по этике СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Первой группе животных (10 крыс) парацетамол вводился энтерально через желудочный зонд в дозе 1000 мг/кг, что соответствует приблизительно 30–50% от LD50 этого препарата. Контрольной группе животных в количестве 10 крыс аналогично первой группе однократно энтерально вводили изотонический солевой раствор в объеме 1 мл. В связи с существующим предположением, что антилейкотриеновые препараты (блокаторы CysLT1 лейкотриеновых рецепторов), такие как монтелукаст, могут потенциально уменьшать токсичность ингибитора циклооксигеназы типа 2 (ЦОГ-2) – парацетамола, нами в третьей группе животных энтерально вводился блокатор пептидолейкотриеновых рецепторов монтелукаст в дозе 40 мг/кг и через 1 ч вводили парацетамол в дозе 1000 мг/кг.

Препараты вводили в течение 14 дней. Выведение животных из эксперимента осуществлялось методом декапитации через 24 ч (по 4 животных из каждой группы), на 7-е (по 3 животных) и 14-е сутки (по 3 животных), а также при появлении судорожных подергиваний мышц, нарастания одышки и принятия крысами бокового положения.

Для гистологического исследования кусочки тканей почек после фиксации в 10% формалине заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и ШИК (PAS)-реакцией с Шифф-йодной кислотой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительное гистологическое исследование ткани почек крыс контрольной группы не выявило каких-либо патологических изменений. Микроскопическое изучение структурных компонентов ГГБ нефрона выявило сохранность нормальной морфологии почечной паренхимы с хорошо различимыми клубочками и канальцами (рис. 1).

Основные изменения определялись в группе крыс, подвергшихся экспериментальному воздействию парацетамола. Были выявлены значительные структурные изменения, касающиеся всех компонентов стромально-паренхиматозного звена ГГБ нефрона. Наиболее яркие изменения наблюдались в интерстициальной ткани и тубулярном аппарате нефрона. В этих структурах уже к концу 1-х суток определялись признаки токсического воздействия. В строме почек можно было наблюдать выражен-

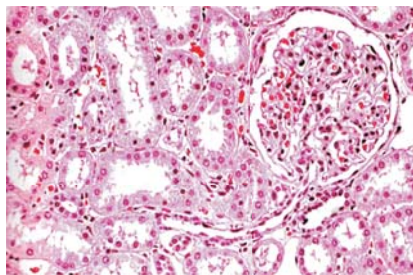


Рис. 1. Контрольная группа, микропрепарат: почка. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 400.

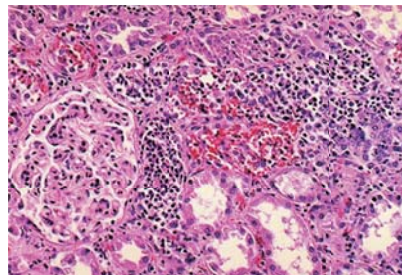


Рис. 2. Эксперимент (24 ч). Микропрепарат: почка; отек стромы, очаговые диапедезные кровоизлияния, скопления лимфомакрофагальных клеток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 400.

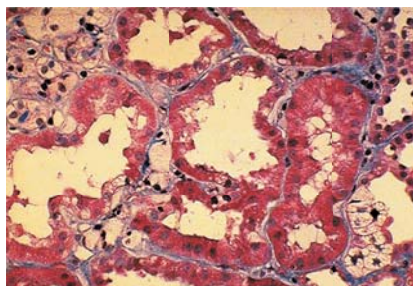


Рис. 3. Эксперимент (24 ч). Микропрепарат: почка; белковая дистрофия, грануло-вакуолярные изменения эпителия извитых канальцев. Окраска по Ван Гизону. Ув. 600.

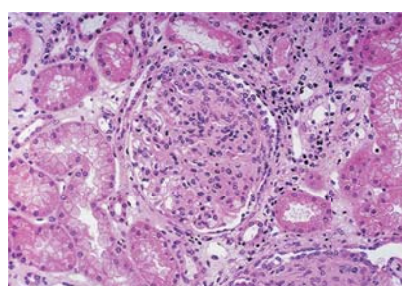


Рис. 4. Эксперимент (24 ч). Микропрепарат: почка; сужение просвета капилляров, спазм и коллапс клубочков. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 400.

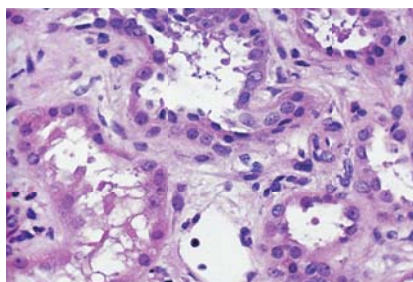


Рис. 5. Эксперимент (7-е сутки). Микропрепарат: почка; белковая и жировая дистрофия эпителия канальцев, тубулярный некроз. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 600.

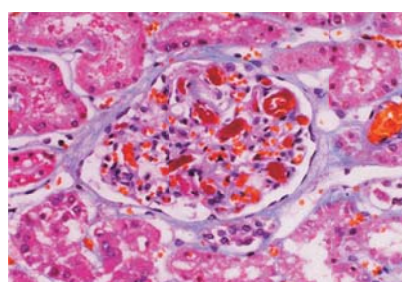


Рис. 6. Эксперимент (7-е сутки). Микропрепарат: почка; полнокровие клубочков, белковый выпот в мочевое пространство капсулы. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 600.

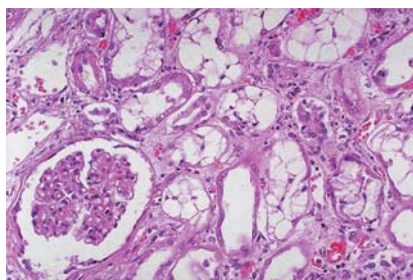


Рис. 7. Эксперимент (14-е сутки). Микропрепарат: почка; некроз извитых и прямых канальцев; белковые массы, гиалиновые цилиндры и миоглобин в просвете канальцев. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 400.

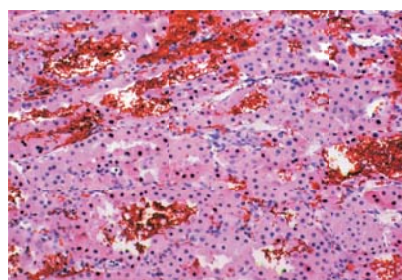


Рис. 8. Эксперимент (14-е сутки). Микропрепарат: почка; полнокровие и очаги кровоизлияний интерстициальной зоны. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 400.

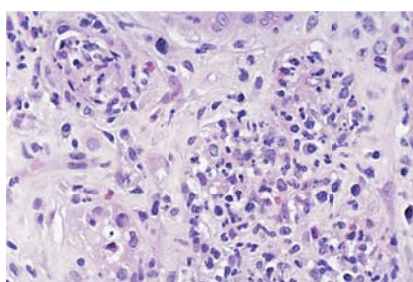


Рис. 9. Эксперимент (14-е сутки). Микропрепарат: почка; скопление макрофагов и лимфоцитов, отек стромы. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 600.

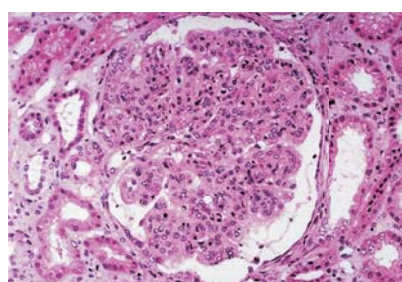


Рис. 10. Эксперимент (14-е сутки). Микропрепарат: почка; гиперклеточность клубочков, расширение мезангиальных пространств. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 600.

ный отек, множественные очаговые диапедезные кровоизлияния, особенно в интермедиарной зоне, и скопления лимфомакрофагальных клеток (рис. 2).

В эпителии извитых канальцев выявлялись белковая дистрофия и набухание отдельных эпителиоцитов с фокальными грануловакуолярными изменениями (рис. 3). В эти же сроки эксперимента в гломерулярном аппарате определялись сужение просвета капилляров и спазм клубочков с их коллабированием (рис. 4).

По мере увеличения продолжительности эксперимента морфологические изменения почек прогрессировали и носили более выраженный характер. Нефротоксическое воздействие изучаемого фактора отмечалось во всех структурных компонентах ГГБ нефрона экспериментальных крыс. К концу 7-х суток белковое и жировое перерождение эпителия канальцев сопровождалось развитием тубулярного некроза, разрушением клеток и их десквамацией в просвет собирательных трубок (рис. 5).

В клубочках наблюдались резкое полнокровие петель капилляров и белковый выпот в мочевое пространство капсулы (рис. 6).

В отдаленные сроки эксперимента (14-е сутки) наблюдаемые изменения не только усугублялись, но и приобретали злокачественное течение. Дистрофические изменения сопровождалась некрозом эпителия не только извитых, но и прямых канальцев. В просвете более чем половины канальцев отмечались белковые массы, часто с примесью эритроцитов, гиалиновые цилиндры и миоглобин. Местами определялись очаги полного некроза эпителия с десквамацией в просвет канальцев (рис. 7).

В строме почек, особенно перитубулярно, развивались резкое полнокровие и очаги кровоизлияний интермедиарной зоны (рис. 8), скопление макрофагальных и лимфоидных элементов, выраженный отек (рис. 9).

В гломерулярном аппарате наблюдались признаки повреждения, в совокупности укладываемые в понятие минимальный гломерулит. При этом острая гиперемия капиллярных петель сопровождалась расширением мезангиальных пространств за счет гиперклеточности и выпотом в полость капсулы клубочков (рис. 10).

У животных третьей группы предварительное введение монтелукаста в дозе 40 мг/кг перед введением парацетамола в дозе 1000 мг/мг вызывало заметное снижение степени структурных повреждений почек. Так, через 24 ч после введения препарата мы наблюдали отсутствие очаговых диапедезных кровоизлияний не только в перитубулярной зоне стромы почек, но и, что важно, в интермеди-

арной зоне. В этой группе также отсутствовали характерные для группы парацетамола скопления лимфомакрофагальных клеток. На 14-е сутки наблюдения морфологическая картина почек в группе «монтелукаст+парацетамол» практически мало чем отличалась от таковой в норме, а структурные изменения, имеющие место в ранние сроки эксперимента, исчезали и подвергались восстановлению.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что структурные изменения почек, развивающиеся при экспериментальном введении крысам парацетамола, свидетельствуют о сильном нефротоксическом эффекте изученного фактора. Изменения в виде тяжелой дистрофии и кровоизлияний в строме почек, обнаруженные в ходе эксперимента, можно объяснить воздействием биологически активных веществ – метаболитов парацетамола, образующихся в токсикогенной фазе. Обнаруженные морфологические изменения почек свидетельствуют о том, что уже к концу 1-х суток эксперимента развиваются ранние признаки структурной дегенерации нефрона. Дальнейшее прогрессирование структурных изменений по мере увеличения сроков эксперимента, вероятно, связано как с непосредственным токсическим воздействием парацетамола на почечную ткань, так и его метаболитов в связи с биотрансформацией, таких как парааминофенол и др. Одновременно с этим в те же сроки эксперимента макрофаги и лимфоциты стромы начинают пролиферировать и вырабатывать мембраноатакующий комплекс (МАК) – цитокины, способные повреждать и изменять третичную (антигенную) структуру базальной мембраны, вызывать протеинемии и, тем самым, приводя к развитию гломерулита.

Процесс пролиферации стромальных макрофагов и лимфоцитов на поздних стадиях эксперимента, вероятно, обусловлен обратной резорбцией части экскретируемых клетками эпителия высокотоксичных промежуточных продуктов и диффузией их в перитубулярное пространство с быстрым развитием повреждения интерстиция с последующей клеточной инфильтрацией и поражением компонентов ГГБ нефрона.

В свою очередь, вновь образовавшиеся активные клеточные инфильтраты в строме, по видимому, начинают выработку интерлейкинов, стимулирующих пролиферацию гломерулярных клеток с формированием гиперклеточности клубочков и развитием гломерулита.

Снижение степени выраженности морфоло-

гических проявлений парацетамол-вызванной нефротоксичности предварительным введением монтелукаста указывает на то, что одним из дополнительных механизмов повреждения почек высокими дозами ингибиторов ЦОГ-2 может быть увеличение образования лейкотриенов в связи с шунтированием и переходом метаболизма арахидоновой кислоты на 5-липоксигеназный путь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обнаруженные морфологические изменения почек крыс при экспериментальном введении субтерапевтических доз парацетамола свидетельствуют о нефротоксическом воздействии этого ксенобиотика. Морфологическим субстратом нефротоксического эффекта в наших исследованиях явилось развитие так называемого «выделительного некронефроза», сочетающегося с признаками гломерулита.

Кроме того, обнаруженные в ходе эксперимента структурные изменения свидетельствуют об избирательном характере развивающихся повреждений почек экспериментальных животных, зависящих, в свою очередь, от концентрации токсиканта в крови и рецепторов, с которыми взаимодействует парацетамол. В связи с этим признаки тяжелого повреждения паренхимы и стромы почек крыс, по-

являющиеся в поздние сроки экспериментального воздействия парацетамола (соматогенная фаза), вероятно, отражают нарастающую структурно-функциональную деградацию органа с риском развития недостаточности почек. Используемые нами в ходе эксперимента блокаторы CysLT1 рецепторов (монтелукаст) уменьшали и нивелировали нефротоксическое действие ингибиторов ЦОГ-2.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ягмуров ОД. Гистогематический барьер нефрона как биологическая система при патологии почек. *Нефрология* 2003; 7(1): 7-12
2. Штерн ЛС. *Физиология и патология гисто-гематических барьеров*. Наука, М., 1968; 431
3. Клар С, Массри СГ. *Современная нефрология*. Медицина, М., 1984; 681
4. Рябов СИ, Наточин ЮВ. *Функциональная нефрология*. Лань, СПб., 1997; 304
5. Лакин КМ, Крылов ЮФ. Биотрансформация лекарственных веществ. Медицина, М., 1981; 344
6. Лампатов ВВ, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ. Влияние левомицетина на секреторный транспорт рентгеноконтрастных веществ в почках крыс. *Нефрология* 2002; 6(3): 69-71
7. Mazer M, Perrone J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *J Med Toxicol* 2008; 4(1): 2-6

Поступила в редакцию 27.12.2012 г.
Принята в печать 21.01.2013 г.