

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПОЧКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕФРОЛИТИАЗЕ

Мотин Ю. Г.¹, Бгатова Н.П.², Лепилов А.В.³, Жариков А.Ю.⁴, Мотина Н.В.¹, Крючкова Н.Г.³

INFLUENCE OF ANTIOXIDANT THERAPY ON THE ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF RENAL CELL ELEMENTS IN EXPERIMENTAL NEPHROLITHIASIS

MOTIN Yu.G., BGATOVA N.P., LEPILOV A.V., ZHARIKOV A.Yu., MOTINA N.V., KRYUCHKOVA N.G.

¹Кафедра гистологии (зав. кафедрой – профессор С.В. Талалаев); ³кафедра патологической анатомии с секционным курсом (зав. кафедрой – профессор В.В. Климачев); ⁴кафедра фармакологии (зав. кафедрой – профессор В.М. Брюханов) ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул; ²лаборатория ультраструктурных исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», г. Новосибирск.

С целью оценки патогистологической перестройки тканевых элементов на начальных этапах литогенеза проведено морфологическое исследование почек крыс с экспериментальным оксалатным нефролитиазом. Оценивали структурные изменения мозгового вещества почки, особенности распределения депозитов кальция и их размер, ультраструктурную перестройку эпителиоцитов канальцевой системы почки. Иммуногистохимическими методами определяли выраженность экспрессии показателей оксидативного повреждения (малоновый диальдегид) и антиоксидантной защиты (митохондриальная супероксиддисмутаза). На модели экспериментального оксалатного нефролитиаза в почках крыс на светооптическом уровне показано развитие признаков патогистологической перестройки органа, отложение солей кальция, морфологические признаки активации процессов оксидативного повреждения и ослабления функционирования системы ферментной антиоксидантной защиты. На электронномикроскопическом уровне выявлено повреждение мембранных структур эпителиоцитов почечных канальцев, нарушения в структуре митохондрий, апоптозные изменения клеток. В условиях применения а-токоферола в качестве средства антиоксидантной терапии отмечено определенное снижение выраженности морфологических и ультраструктурных изменений, оксидативного повреждения тканей и клеток, сохранение системы ферментной антиоксидантной защиты, а также снижение количества и размеров

образующихся депозитов кальция.

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

To assess the histopathological changes of renal cell elements, a morphological and ultrastructural study of 60 rat kidneys with experimental oxalate nephrolithiasis were conducted. Structural changes were assessed in the kidney medulla, particularly the distribution and size of the calcium deposits. Using immunohistochemistry, the expression of the severity indices of oxidative damage (malondialdehyde) and antioxidant defenses (mitochondrial superoxidizedismutase) were determined. On the model of experimental oxalate nephrolithiasis in the rat kidney at the level of light-optical microscopy, signs of histopathological alterations were revealed in the organ, along with the presence of calcium compounds in the kidney tubular system and interstitial cells. Also, the morphological symptoms of activation of the oxidative damage to the tissues and cells, reducing the antioxidant protective mechanisms of the enzymes was noted. Ultrastructural examination of tubular epithelium cells revealed cell membrane and mitochondria injury, presence of apoptotic cells. Usage of a-tocopherol revealed a definite reduction in the severity, in terms of the structural adjustment to renal oxidative damage of the tissues and cells, and preservation of the activity of the antioxidant defense system, as well as a reduction in the number and size of the calcium deposits formed.

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

Введение. В развитии оксалатного нефролитиаза существенную патогенетическую роль играет повреждение клеток и тканей. Установлено, что повреждение уротелия способствует формированию первичного очага литогенеза на бляшках Рэндалла в интерстиции, прилежащем к тонкому отделу петли Генле, с последующим пенетрированием в просвет собирательных трубок,

где происходит окончательное формирование камней. При этом повреждение эпителиоцитов канальцев почки при оксалатном нефролитиазе напрямую связано с активацией процесса свободно-радикального окисления (СРО) в почке [1]. При моделировании экспериментального нефролитиаза наблюдаются характерные признаки оксидативного стресса в почках, сопровождающиеся отложением в зоне почечного сосочка кальций-позитивных депозитов [2].

Цель исследования - оценить ультраструктурные изменения канальцевого эпителия и влияние оксидативного повреждения на процессы литогенеза при экспериментальном оксалатном нефролитиазе и его коррекции α -токоферолом.

Материал и методы исследования. Экспериментальная модель оксалатного нефролитиаза была выполнена на 60 сертифицированных самцах крыс линии Wistar массой тела от 180 до 250г.

Все животные были разделены на три группы по 20 крыс в каждой. Крысы первой группы находились на общевиварном рационе, получали в качестве питья водопроводную воду, мочекаменная болезнь не инициировалась. Данная группа использовалась в качестве контрольной. Животные второй группы на фоне стандартной диеты получали в качестве питья 1% раствор этиленгликоля в течение 42 суток, что индуцировало развитие экспериментальной модели оксалатного нефролитиаза [3]. В третьей группе животных моделировали экспериментальный нефролитиаз в течение 3 недель, последующие 3 недели 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 экспериментальных или других научных целей» (Страсбург, 1986 г.), и Федерального закона Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. На данное исследование получено разрешение этического комитета Алтайского государственного медицинского университета. 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 хлористоводородной кислоты. Оценивали характер отложения и распределения кальциевых

депозитов, их средние размеры, особенности локализации в тканях почки.

Для определения экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы (СОД-2) и малонового диальдегида (МДА) проводили непрямой двухшаговый стрептавидин-биотинный 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 (pH=6,0) в микроволновой печи при мощности 600 Вт 3 раза по 7 минут [4]. 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).

Для электронномикроскопического исследования образцы почки фиксировали в 4% растворе параформа, приготовленном на среде Хенкса, затем в 1% растворе OsO₄ на фосфатном буфере (pH=7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35-45 нм на ультратоме Leica EM UC7, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 при ускоряющем напряжении 80кВ с последующим фотографированием при увеличениях от 6000 до 80000.

Морфометрические исследования проводили с использованием программных пакетов ImageJ 1.43 и AxioVision 3.4LE. Степень экспрессии (в баллах – 1+, 2+, 3+) оценивали по интенсивности окрашивания диаминобензидина (ДАБ). Для удобства интерпретации результатов рассчитывали интенсивность экспрессии по формуле:

$$E\% = 100 - \frac{100 \times D_x}{256}$$

, где E% – интенсивность экспрессии, 256 – максимум интенсивности окраски, D_x – интенсивность окрашивания ДАБ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета R версии 2.12 (лицензия GNU General Public License) для Microsoft Windows®. Оценку межгрупповых различий проводили по критерию Дана. Результаты ра-

боты представлены в виде значений \bar{D} (средняя арифметическая) \pm SD (стандартное отклонение).

Результаты исследования. У животных контрольной группы наблюдали нормальную гистологическую картину строения коркового и мозгового вещества почки. Размер просвета собирательных трубок составил в среднем $15,5 \pm 0,53$ мкм. Кальциевые депозиты у крыс интактной группы гистохимически не верифицированы. Ультраструктурных изменений в эпителиоцитах канальцев и собирательных трубок не выявлялось.

Иммуногистохимическое исследование показало умеренно выраженную (2+) экспрессию СОД-2 в цитоплазме эпителиальных клеток канальцев нефрона и эпителиоцитах собирательных трубок. Экспрессия МДА была слабо выраженной (1+).

После 6 недель моделирования оксалатного нефролитиаза выявлялась выраженная патогистологическая перестройка тканей почки с дистрофическими и некробиотическими изменениями клеток и тканевых структур. Средний размер просвета собирательных трубок значительно увеличивался и составлял $24,9 \pm 0,62$ мкм. Отложения кальция располагались по всей площади почечного сосочка, включая верхушку и, реже, в канальцах коркового вещества, в больших количествах, в среднем $27,4 \pm 3,22$ (с максимальными значениями 57) в поле зрения. Характерным являлось наличие отложений соединений кальция в просвете элементов петли (тонком и в восходящем толстом – прямом дистальном канальце) и в собирательных трубках часто с выраженной инкрустацией их эпителия. Обнаруживаемые кальциевые депозиты были сравнительно крупными, в среднем составляя $11,8 \pm 0,62$ мкм. В 40% наблюдались крупные депозиты кальция (размером до 57,4 мкм), обтурирующие канальцы петли нефрона или собирательные трубки. В зонах отложения кальция выявлялись разрастания соединительной ткани с формированием перитубулярного и периваскулярного фиброза.

Электронномикроскопическое исследование выявило ультраструктурные изменения эпителиоцитов канальцевой системы почки и собирательных трубок, затрагивающие клеточные органеллы, ядра и клеточные мембраны. Видимые светооптические изменения эпителиоцитов по типу гидропической дистрофии проявлялись расширением цистерн гранулярной эндоплазматической сети (грЭПС) и формированием вакуолей различного размера. Содержимое большинства из них было электронносветлым, на поверхности мембран определялись одиночные, неравномерно расположенные рибосомы. Отмечалось набухание митохондрий, с нарушением целостности

внутренней мембраны: нарушением расположения крист, их сглаженностью, фрагментацией, разрушением. Цитоплазма клеток и отдельные увеличенные в размерах митохондрии содержали мелкие электронноплотные депозиты кальция. Эндоплазматическая сеть таких клеток была значительно расширена. Ядра отдельных клеток были сморщенными, отмечалось фрагментация кариолеммы, кариорексис и кариолизис; в цитоплазме определялись лизосомы с ламеллярным содержимым, аутофагосомы, часто содержавшие остатки митохондрий. Отмечалось разрыхление базальной мембраны.

Иммуногистохимическое исследование показало уменьшение экспрессии (1+) СОД-2 эпителиоцитами собирательных трубок. Во внутренней зоне мозгового вещества этот показатель оказался существенно сниженным, на 5,7% уступая значениям соответствующего показателя интактных почек. В эпителиоцитах собирательных трубок, обтурированных мочевым камнем, снижение экспрессии СОД-2 достигало максимума и было на 7,5% ниже контрольных показателей. При этом, в области отложения соединений кальция отмечалось выраженное увеличение экспрессии МДА (3+) как в цитоплазме клеток, так и в интерстиции.

В условиях применения в эксперименте атокоферола определялась значительно меньшая выраженность патогистологической перестройки структур почки. В эпителиоцитах собирательных трубок коркового и мозгового вещества отмечались признаки гиалиново-капельной дистрофии. Просвет собирательных трубок характеризовался относительной равномерностью в различных полях зрения, составляя в среднем $16,40 \pm 1,56$ мкм. В просвете некоторых собирательных трубок располагались одиночные слущенные эпителиоциты, белковые цилиндры.

В мозговом веществе почки определялось умеренное количество (до $17,6 \pm 2,39$ в поле зрения) отложений кальция, располагавшихся относительно равномерно по всей площади почечного сосочка, преимущественно в составе эпителия собирательных трубок и в их просвете среди слущенных эпителиоцитов. Кальциевые депозиты были мелкими, их средний размер составил $5,40 \pm 0,28$ мкм. Крупных соединений кальция, обтурировавших просвет канальцев и собирательных трубок, или инкрустации их эпителия не обнаруживалось.

Электронномикроскопическое исследование показало умеренную выраженность ультраструктурных изменений эпителиоцитов канальцевой системы почки. Отмечалось умеренное расширение гранулярной эндоплазматической сети, набухание митохондрий с увеличением их размеров, просветлением матрикса и сглаженностью крист, имели место немногочисленные лизосомы

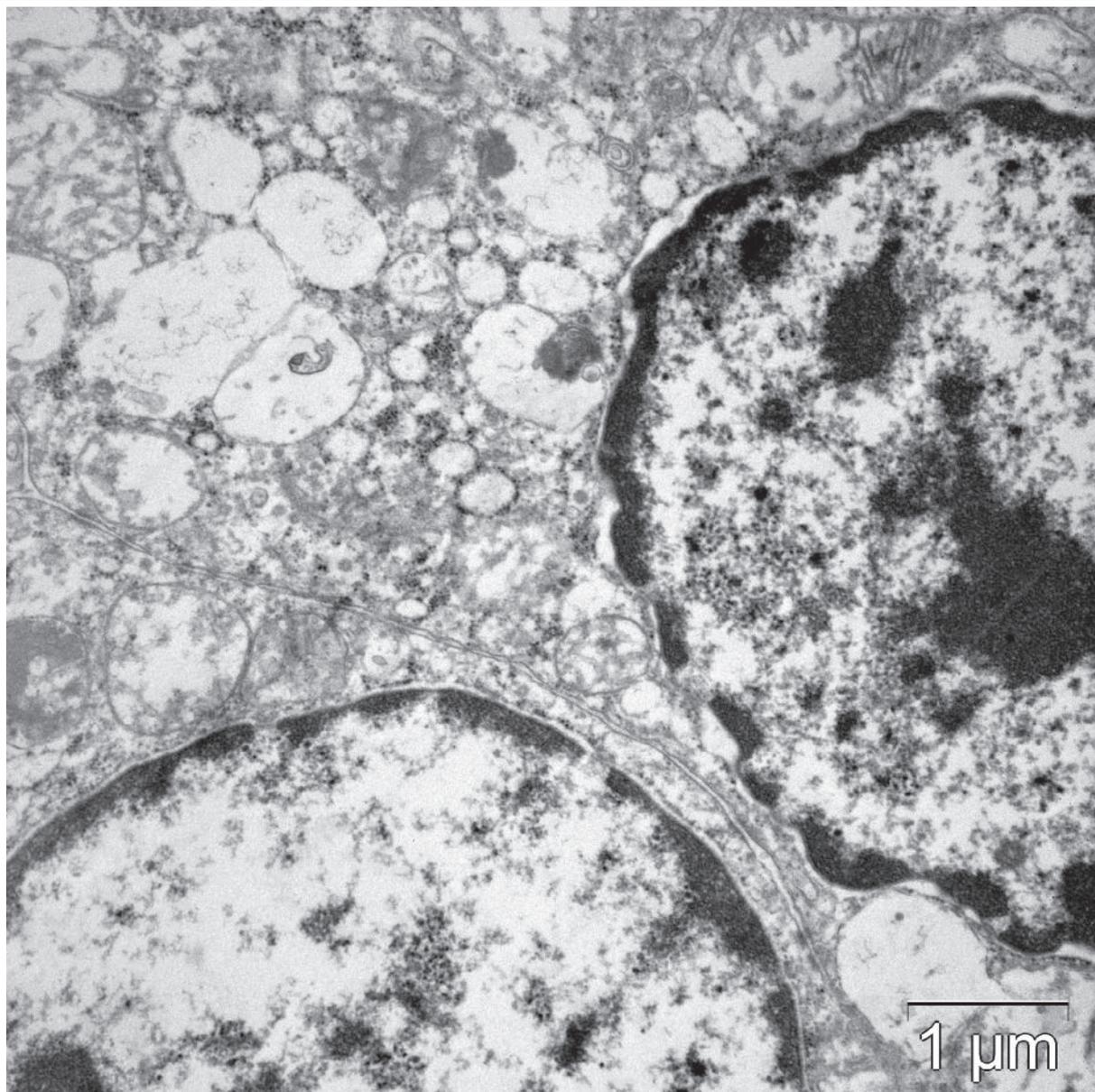


Рис. 1. Ультраструктура эпителиоцитов собирательной трубки почки крысы при экспериментальном оксалатном нефролитиазе (42 сут.). Пикнотические изменения ядра, расширение цистерн грЭПС, набухание и деструкция митохондрий с просветлением матрикса, фиксацией солей кальция на кристах. Электронограмма. Ув. 20000.

с ламеллярным содержимым. Ядра отдельных эпителиоцитов были пикнотичны, кариорексиса не отмечалась.

Иммуногистохимическое исследование почек крыс после применения α-токоферола показало умеренно выраженную (2+) экспрессию СОД-2 эпителиоцитами собирательных трубок, сопоставимую с показателями интактной группы и статистически значимо (на 12,5%) превышавшую показатели животных с экспериментальной моделью оксалатного нефролитиаза.

У животных на фоне блокирования процес-

сов оксидативного повреждения α-токоферолом выявлялось снижение содержания продуктов ПОЛ (1+). Интенсивность экспрессии МДА была сопоставима с таковой в интактной группе и существенно ниже (1+), чем у животных с экспериментальным оксалатным нефролитиазом.

Обсуждение результатов исследования.

Данные современной литературы указывают на то, что важным фактором в формировании мочевых камней является повреждение тканей почек. При этом многочисленные данные свидетельствуют о неизменном возникновении оксидативного стрес-

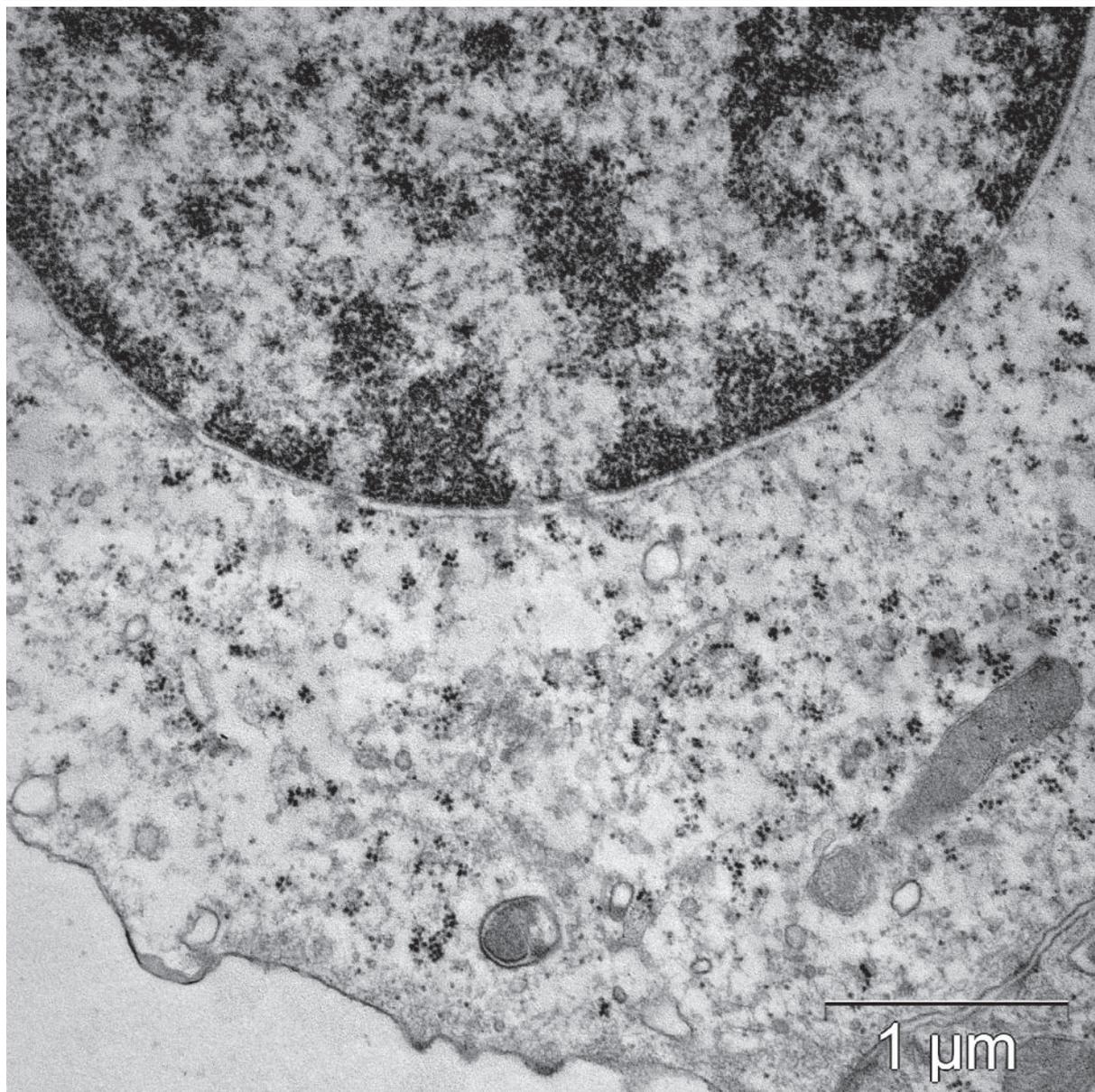


Рис.2. Ультраструктура эпителиоцита собирательной трубки почки крысы в условиях применения α -токоферола. Умеренное расширение цистерн грЭПС. Ув. 20000.

са, вносящего существенный вклад в процесс формирования кальциевых депозитов [1].

Выявленные патоморфологические изменения в виде дистрофии эпителия, его слущивания, расширения просветов канальцев и собирательных трубок могут быть вызваны как повреждающим воздействием метаболитов этиленгликоля, так и реакцией на отложение депозитов кальция. Такая структурная перестройка свидетельствует о роли микроокружения в развитии нефролитиаза. Это подтверждается гистохимическим обнаружением в тканях почки отложений кальция. Данные факты соответствуют литературным данным, согласно которым агрегаты кристаллов кальция

вначале фиксируются на апикальных мембранах эпителиальных клеток, а затем транспортируются в интерстиций и концентрируются в основном на поверхности почечного сосочка, где и происходит последующее формирование мочевых камней [5].

Выявленные ультраструктурные изменения эпителиоцитов канальцевой системы почки и собирательных трубок в виде расширения цистерн гранулярной эндоплазматической сети, увеличения размеров и набухания митохондрий с деструкцией и лизисом крист, кариопикнозом и кариорексисом соответствуют современным литературным данным и отражают изменения клеток при оксидативном повреждении [6]. В

почках первичное отложение кальция происходит в митохондриях и фаголизосомах, обладающих высокой активностью фосфатаз. Показана взаимосвязь между наличием кальция и процессами оксидативного повреждения клеток. Повышение внутриклеточного кальция приводит к активации ряда ферментов, включая стимуляцию образования активных форм кислорода в дыхательной цепи митохондрий. [7]. Имеются данные о совместном действии ионов кальция и активных форм кислорода приводящих к повышению проницаемости внутренней митохондриальной мембраны [8]. Таким образом, наблюдавшееся набухание митохондрий, повреждение их мембран, нарушение правильного расположения, дезорганизация, деструкция крист вероятно обусловлены внутриклеточными депозитами кальция. Фиксация последних на кристах митохондрий сопровождается перестройкой матрикса, дезорганизацией компонентов дыхательной цепи, способствует продукции активных форм кислорода, активации процессов ПОЛ и повреждению клеточных мембран [9].

В местах активного литогенеза зафиксировано снижение интенсивности экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы, что указывает на возможное исчерпание ферментов системы антиоксидантной защиты. Кроме того, не следует исключать возможность снижения экспрессии митохондриальных антиоксидантных ферментов, обусловленное дистрофическими изменениями эпителиоцитов вблизи крупных камней и подавлением их общей функциональной активности, отложением соединений кальция в цитоплазме клеток и внутри митохондрий, ультраструктурными изменениями митохондрий. Увеличение в этой ситуации экспрессии в тканях почек малонового диальдегида указывает на активацию процессов свободно-радикального окисления и ослабление антиоксидантной защиты в почках на ранних сроках моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза, что оказывает повреждающее воздействие на ткани почки, стимулируя таким образом процесс литогенеза.

В условия применения а-токоферола с целью коррекции процессов ПОЛ показатели экспрессии малонового диальдегида и митохондриальной супероксиддисмутазы в целом соответствовали показателям интактной группы. При этом отмечена меньшая степень выраженности структурной перестройки почек и изменения ультраструктуры эпителия по сравнению с группой животных с нефролитиазом. На этом фоне отмечалось значительное замедление процесса литогенеза. Наблюдали выраженное снижение количества кальциевых депозитов в поле зрения, их средний размер на фоне применения антиоксидантов

уменьшался более чем в 2 раза (максимальные значения в 4,4 раза).

Заключение. При моделировании экспериментального оксалатного нефролитиаза в почках крыс отмечаются морфологические признаки активации процесса оксидативного повреждения тканей и клеток и ослабления функционирования системы ферментной антиоксидантной защиты, что сопровождается ускорением литогенеза. Ультраструктурные изменения эпителиоцитов канальцевой системы почки и собирательных трубок проявляются расширением цистерн гранулярной эндоплазматической сети, увеличением размеров и набуханием митохондрий с повреждением и лизисом крист, изменениями ядра в виде кариопикноза и кариорексиса. Применение антиоксиданта оказывает благоприятное воздействие на морфоструктурную перестройку почек у животных с индуцированным нефролитиазом, снижает степень оксидативного повреждения клеток и тканей и способствует уменьшению количества и размеров образовавшихся депозитов кальция.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Жариков А.Ю. Механизм формирования кристаллов при оксалатном нефролитиазе. / А.Ю. Жариков, Я.Ф. Зверев, В.М. Брюханов, В.В. Лампатов // *Нефрология*. – 2009. – Т. 13, № 4. – С.37-50.
2. Мотина Н.В. Благоприятное воздействие антиоксидантной терапии на структурную перестройку почки в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза / Н.В. Мотина, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, С.В. Талалаев, В.В. Лампатов, А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин // *Нефрология*. – 2011. – №2. – С.57-61.
3. Green, M.L. Ethylene glycol induces hyperoxaluria without metabolic acidosis in rats // *M.L. Green, M. Hatch, R.W. Freel // Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2005. – Vol.289. – P.536-543.
4. Гуревич, Л.Е. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности воздействием микроволн на ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин / Л.Е. Гуревич, В.А. Исаков // *Архив патологии*, 1999. – №2. – С.48-50.
5. Khan, S.R. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis and the formation of human urinary stones / S.R. Khan // *Scanning Microsc.* – 1995. – Vol. 9(1) – P.89-100.
6. Korolczuk, A. Ultrastructural examination of renal tubular epithelial cells and hepatocytes in the course of chronic cyclosporine A treatment – a possible link to oxidative stress / A. Korolczuk, M. Maciejewski, G. Czechowska, M. Orzet-Pankowska // *Ultrasructural pathology*, 2013. – 37(5). – P.332-339.
7. Гордеева А.В. Взаимосвязь между активными формами кислорода и кальцием в живых клетках

/ А.В. Гордеева, Р.А. Звягильская, Ю.А. Лабас // *Биохимия*. – 2003. – 68(10). – С. 1318-1322.

8. Zoratti, M., *The mitochondrial permeability transition* / M. Zoratti, I. Szabo // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1995. – vol. 1241. – p. 139-176.

9. Vercesi, A.E. *The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition.* / A.E. Vercesi, A.J. Kowaltowski, M.T. Grijalba, A.R. Meinicke, R.F. Castilho // *Biosci. Rep.* – 1997. – v. 17. – p. 43-52.

Авторская справка:

Мотин Юрий Григорьевич - к.м.н., доцент кафедры гистологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России; 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40, (3852) 24-19-62, e-mail: ygmotin@gmail.com

Бгатова Наталия Петровна - д.б.н., профессор, руководитель лаборатории ультраструктурных исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, (383) 333-47-43, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Лепилов Александр Васильевич - д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии с секционным курсом ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России; 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40, (3852) 40-15-44, e-mail: lepilov@list.ru

Жариков Александр Юрьевич - д.б.н., профессор кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России; 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

Мотина Наталья Владимировна - к.м.н., доцент кафедры гистологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России; 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40, (3852) 24-19-62, e-mail: motinan@gmail.com

Крючкова Наталья Геннадьевна - ассистент кафедры патологической анатомии с секционным курсом ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России; 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40, (3852) 40-15-44.