

## ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПОЧЕК КРЫС НА ФОНЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

С.М. Зиматкин<sup>1</sup>, д.б.н., профессор; Е.А. Конюх<sup>2</sup>  
УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Проведено исследование влияния антиоксидантов мелатонина и цистеина на формирование морфологических изменений в почках при экспериментальном гломерулонефрите. Установлено, что прием цистеина и мелатонина препятствует формированию выраженных патологических изменений почечных телец.*

**Ключевые слова:** антиоксидантная терапия, гломерулонефрит.

*The influence of melatonin and cysteine antioxidants on the formation of morphological changes in the kidneys at experimental glomerulonephritis has been studied. It is established that cysteine and melatonin intake interferes with the formation of marked pathological changes of nephrons.*

**Key words:** antioxidant therapy, glomerulonephritis.

### Введение

В клетках живого организма постоянно происходит образование активных форм кислорода (АФК). В физиологических условиях АФК вырабатываются в небольших количествах, выступают в роли медиаторов химических реакций и являются элементами неспецифической защитной системы организма [2]. В организме млекопитающих АФК образуются активированными нейтрофилами, макрофагами/моноцитами, а также эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, в почках – гломерулярным эпителием и мезангиальными клетками [10]. Активаторами клеток служат бактерии, дрожжи, пептиды, антитела, активные компоненты комплемента, цитокины. При избыточном образовании АФК чрезвычайно опасны для клетки, так как они инициируют реакции свободнорадикального окисления. Кроме того, образование АФК сопровождается высвобождением провоспалительных цитокинов, что усиливает выработку оксидантов [8]. Таким образом, АФК способны защитить живой организм от инфекционных и опухолевых процессов, однако при избыточной нагрузке их мишенью могут стать нормальные клетки. В основе сохранения нормальной жизнедеятельности клеток лежит баланс между образованием и инактивацией АФК. Устойчивость равновесия обеспечивается состоянием системы антиоксидантной защиты (АОЗ) [2]. Избыточное, неконтролируемое окисление при несовершенстве или нестабильности в системе АОЗ способно приводить к изменениям энергетических процессов и метаболическим сдвигам в клетках, что, в свою очередь, способствует нарастанию патологической активности и хронизации воспалительных заболеваний.

Одним из самых мощных и доступных эндогенных антиоксидантов, регуляторов иммунной системы и поглотителем свободных радикалов является мелатонин (Mel) [11]. Он также способен подавлять выработку избыточного количества оксида азота – предшественника гидроксильного радикала, который обладает мощным повреждающим действием на клетки и усугубляет воспаление [12]. Доказано, что Mel тормозит процессы клеточного апоптоза, стимулированного повышенным уровнем гомоцистеина – независимого фактора развития сосудистых осложнений при хронических заболеваниях [6].

В последнее время широко изучается также антиоксидантное действие цистеина (Cys), который представля-

ет собой условно незаменимую аминокислоту, поступающую с пищей или синтезируемую из метионина [3]. Следует отметить, что Cys является предшественником глутатиона – главного эндогенного антиоксиданта клеток животных и человека [5].

Прогрессирование заболеваний почек в настоящее время является медицинской и социальной проблемой. Установлено, что важную роль в патогенезе хронических болезней почек играет дисбаланс между нагрузкой избыточного количества АФК и их инактивацией, причем эти нарушения выявляются на самых ранних стадиях развития хронического процесса [4]. Деструкция клеточных мембран приводит к значительным структурно-функциональным нарушениям почечных телец, а нагрузка избыточного количества АФК (в том числе и измененными клетками самих почек) поддерживает и усугубляет гистоморфологические изменения. В этой связи антиоксиданты могут уменьшить выраженность патологических изменений. Цель работы: определить влияние антиоксидантов мелатонина и цистеина на формирование морфологических изменений почечной ткани при экспериментальном гломерулонефрите.

### Материал и методы

Исследование выполнено на 37 белых беспородных неполовозрелых крысах обоего пола массой 32-64 г. Экспериментальную группу составили 30 животных (n=30), интактную – 7 крыс (n=7).

У животных экспериментальной группы моделировали гломерулонефрит типа нефрита Neumann в модификации А.В. Сукало [1]. Иммунизацию проводили гомогенизатором 20% эмульсии коркового слоя гомологичной почки и полного адьюванта Фрейнда в соотношении 1:1 однократно в пять точек (паховые и подмышечные области, внутрибрюшинно). Доза иммунизирующего раствора составляла 0,7-1,0 мл на 1 животного.

Исследуемые животные были разделены на пять групп: 1-я группа (n=7) – интактные крысы той же популяции, содержащиеся в тех же условиях вивария, что и опытные животные. 2-я группа (n=7) – животные с экспериментальным гломерулонефритом (ЭГ), в качестве питья получали питьевую воду. 3-я группа (n=8) – ЭГ, в воде для питья растворяли препарат «Вита-мелатонин» (производства ОАО «Киевский витаминный завод», Украина; форма выпуска: таблетки 0,003, действующее вещество – мелатонин) из расчета 10 мг препарата/100 мл

воды [7]. 4-я группа (n=8) – ЭГ, в воде для питья растворяли препарат «Ацецекс-Фарма» (производства ООО «Фармтехнология», Беларусь; форма выпуска: порошок 0,1, действующее вещество – ацетилцистеин) из расчета 150 мг препарата/кг массы тела животного [9]. 5-я группа (n=7) – ЭГ, в качестве питья животные получали питьевую воду с добавлением «Вита-мелатонина» (10 мг/100 мл) + «Ацецекс-Фарма» (150 мг/кг). Объем воды для питья рассчитывался исходя из объема жидкости, выпитой за истекшие сутки. Антиоксидантную терапию животные получали в течение 25 суток. За этот период времени формируется модель ГН, но животные не успевают достигнуть половой зрелости.

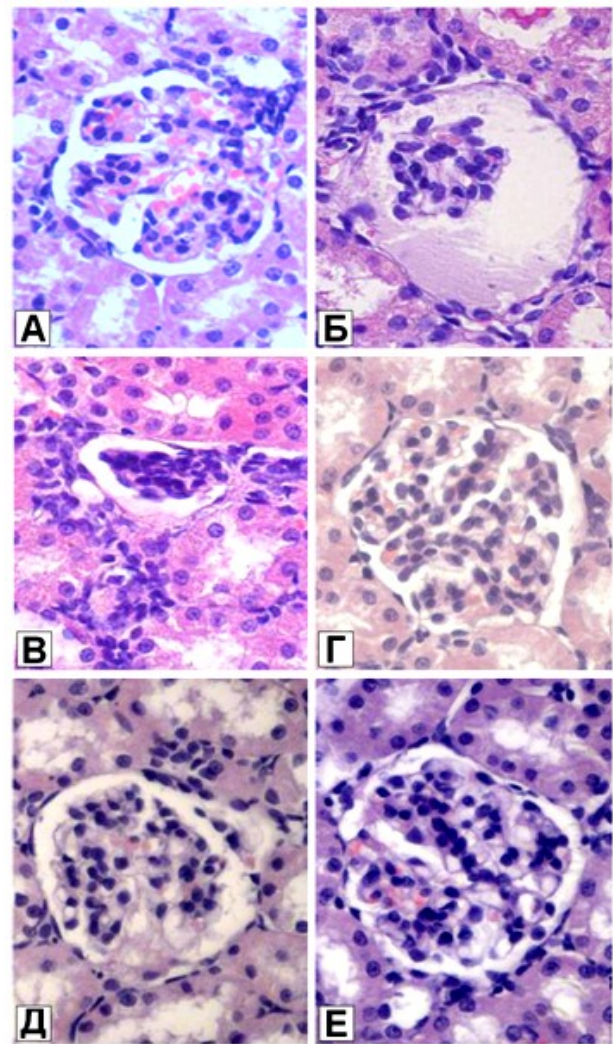
Забой животных осуществляли стандартно во всех сериях путем мгновенной декапитации. У животных вскрывали брюшную полость и забирали правую почку для морфологического исследования. Стандартные кусочки почки фиксировали в 4% нейтральном параформальдегиде, а затем обезвоживали и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные гистологические препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия) с цифровой видеокамерой при разных увеличениях объектива микроскопа. Для количественной оценки степени повреждения почечных телец в каждом гистологическом препарате в 10 полях зрения в корковом веществе почек подсчитывали относительное число нормальных, умеренно поврежденных, сильно поврежденных и погибших почечных телец.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных статистических программ STATISTICA 6.0 для Windows. Для оценки полученных данных использовали методы параметрической статистики с указанием  $M \pm s$ . Сравнение групп проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Достоверными считали различия при значениях  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Результаты гистологического исследования показали, что микроскопическое строение коркового и мозгового вещества почек у крыс 1-й группы соответствовало возрасту животных (рисунок 1А). От 75% до 93% почечных телец были нормальными. Среди почечных телец в этой группе животных встречалось небольшое количество (от 7% до 25%) клубочков с умеренными изменениями, что можно объяснить возрастными и индивидуальными особенностями исследуемых крыс.

У животных 2-й группы выявлено повреждение структуры почечных телец разной степени тяжести: от умеренной до полной гибели. При умеренном повреждении наблюдалось нарушение хода капиллярных петель, их фрагментация, сращение, запустевание отдельных капилляров клубочка. Сильное повреждение (5-20% всех почечных телец) характеризовалось гибелью значительной части сосудистого клубочка, заполнением полости капсулы гомогенной полихроматофильной жидкостью (рисунок 1Б), либо уменьшением размеров клубочка, его гиалинозом и фиброзом, утолщением базальной мембраны, деструкцией эпителия наружного листка капсулы. При этом в строме коркового вещества почки наблюдалось расширение мелких вен, кровь которых содержала повышенное число лимфоцитов, скопления плазматических клеток. В этой группе животных наблюдалась и полная гибель сосудистых клубочков (от 2% до 4%), их гиалиноз, фиброз и сморщивание с полным прекращением циркуляции крови (рисунок 1В).



**Рисунок 1 – Микроскопическое строение типичных почечных телец в разных группах животных**

А – интактная крыса, нормальное почечное тельце; Б – экспериментальный гломерулонефрит без лечения, сильно повреждённый сосудистый клубочек, полость капсулы заполнена полихроматофильной массой; В – ЭГ без лечения, почечное тельце уменьшено в размерах, сосудистый клубочек резко сморщен, циркуляция крови в нём полностью отсутствует; Г – ЭГ с лечением мелатонином, почечное тельце и сосудистый клубочек с незначительными структурными изменениями; Д – ЭГ с лечением АЦЦ, умеренно изменённое почечное тельце с уменьшенной циркуляцией крови в сосудистом клубочке; Е – ЭГ с комбинированным лечением мелатонином и АЦЦ, почечное тельце с незначительными структурными изменениями. Ув.  $\times 400$ . Окраска гематоксилином и эозином. Микрофотография

Результаты морфометрии показали, что у животных с ЭГ без лечения, по сравнению с интактными, происходит значительное уменьшение числа нормальных почечных телец, но увеличение числа умеренно поврежденных, сильно поврежденных, а также погибших почечных телец ( $p < 0,01$ ) (таблица 1).

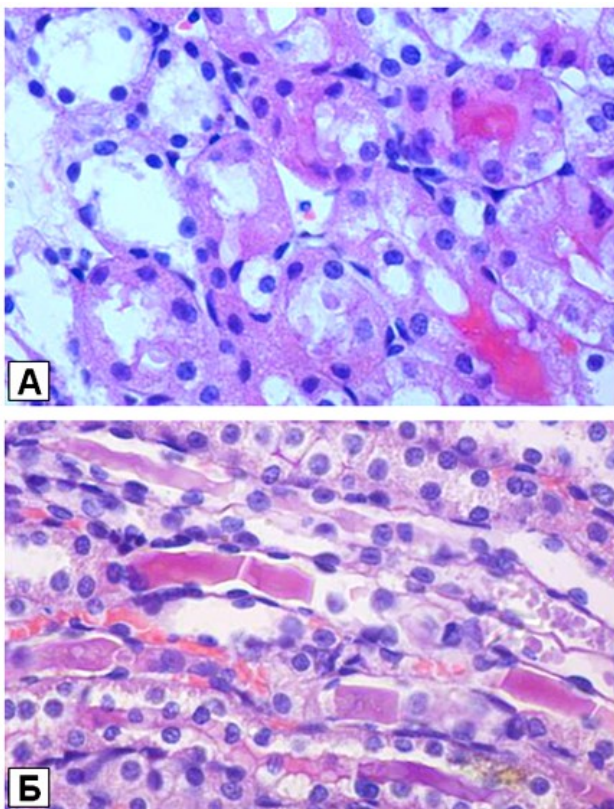
У крыс с ЭГ без лечения выявлены повреждения и в проксимальных извитых канальцах. Однако изменения в них были умеренными и полной гибели выстилающего их эпителия не наблюдалось. Степень повреждения варьировала от вакуолизации и зернистой дистрофии отдель-



**Таблица 1** – Процентное соотношение нормальных и повреждённых почечных телец у интактных крыс и животных с экспериментальным гломерулонефритом на фоне лечения мелатонином и ацетилцистеином ( $M \pm \sigma$ )

|          | Нормальные              | Умеренно изменённые        | Сильно повреждённые          | Погибшие                     |
|----------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 группа | 84,9±9,7                | 15,09±9,74                 | 0                            | 0                            |
| 2 группа | 37,6±29,2               | 46,24±20,63                | 12,66±12,2                   | 2,74±1,07                    |
| 3 группа | 76,0±11,2* <sup>#</sup> | 20,83±13,22 <sup>@.#</sup> | 4,23±3,25* <sup>#</sup>      | 1,14±1,37 <sup>@.#</sup>     |
| 4 группа | 73,2±8,9* <sup>#</sup>  | 22,54±6,07 <sup>@.#</sup>  | 4,92±2,64* <sup>#</sup>      | 1,22±1,45 <sup>&amp;.#</sup> |
| 5 группа | 80,8±12,2* <sup>#</sup> | 19,12±9,94 <sup>@.#</sup>  | 1,75±4,48 <sup>&amp;.#</sup> | 0 <sup>@.#</sup>             |

Примечание: \* $p < 0,01$  при сравнении с 1-й группой; <sup>#</sup> $p < 0,01$  при сравнении со 2-й группой; <sup>&</sup> $p < 0,05$  при сравнении с 1-й группой; <sup>@</sup> $p > 0,05$  при сравнении с 1-й группой.



**Рисунок 2** – Канальцы почки крысы с экспериментальным гломерулонефритом

*А* – деструктивные изменения в проксимальных извитых канальцах, запустевание одних канальцев и оксифильная масса в просвете других; *Б* – цилиндры в просвете прямых канальцев. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\square$  400. Микрофотография

ных эпителиоцитов до разрушения и отторжения их апикальных частей и щёточной каёмки, когда одни канальцы запустевали, а другие содержали оксифильную массу (рисунок 2А). При этом она хорошо определялась в некоторых прямых канальцах мозгового вещества почки в виде «цилиндров» (рисунок 2Б).

В почках крыс 3-й группы наблюдались менее выраженные гистологические изменения, чем у животных с ЭГ без лечения. В корковом веществе почечные тельца с сильными повреждениями и погибшими сосудистыми клубочками встречались реже (до 8% и 2%, соответственно), преобладали нормальные почечные тельца (67-83%).

Повреждения в проксимальных извитых канальцах были также менее выражены, щёточная каёмка в большинстве из них сохранена, а в просвете прямых канальцев мозгового вещества оксифильная масса («цилиндры») почти не встречалась.

Число нормальных почечных телец у животных при ЭГ с лечением мелатонином достоверно выше, чем при ЭГ без лечения ( $p < 0,01$ ), но остаётся меньше, чем у интактных животных ( $p < 0,01$ ). Число умеренно повреждённых почечных телец уменьшилось и не отличалось от интактной группы ( $p > 0,05$ ), а сильно повреждённых и погибших почечных телец стало достоверно меньше ( $p < 0,01$ ). При сопоставлении с интактной группой установлены достоверные различия в отношении сильно повреждённых почечных телец ( $p < 0,01$ ), количество же погибших почечных телец достоверно не отличалось ( $p > 0,05$ ) (таблица 1).

Анализ гистологической картины почек крыс 4 группы показал, что выраженность патологических изменений в них была меньше, чем у животных с ЭГ без лечения (рисунок 1Д). Так, относительное количество нормальных почечных телец у них было значительно больше, а число повреждённых – достоверно меньше ( $p < 0,01$ ), хотя и не достигало уровня, выявленного у интактных животных ( $p < 0,01$ ) (таблица 1).

В почках крыс 5-й группы гистологические нарушения были выражены меньше, чем у животных с ЭГ без лечения. В корковом веществе встречались лишь единичные почечные тельца с сильными повреждениями (от 0 до 6%) и погибшими почечными клубочками (до 3%), преобладали почечные тельца с умеренными повреждениями (от 5 до 25%) (рисунок 1Е). В проксимальных извитых канальцах выявлялись незначительные повреждения, в них сохранялась щёточная каёмка, а в просвете прямых канальцев мозгового вещества оксифильная масса встречалась редко.

Число нормальных почечных телец у животных с ЭГ с комбинированным лечением мелатонином и АЦЦ значительно больше по сравнению со 2-й группой ( $p < 0,01$ ) и уже не отличалось от интактной группы ( $p > 0,05$ ). Аналогичная тенденция выявлялась при сравнении умеренно повреждённых и погибших почечных телец. Выявленное значительное уменьшение количества сильно повреждённых почечных телец по отношению к животным с ЭГ без лечения ( $p < 0,01$ ), однако количество их оставалось выше, чем в интактной группе ( $p < 0,05$ ) (таблица 1).

Таким образом, использованный способ моделирования гломерулонефрита у крыс воспроизвёл основные нарушения в почках, характерные для мембранозной нефропатии. Некоторую вариативность строения почечных телец в группе интактных животных, выявляемую при морфометрии, можно объяснить возрастными особенностями почек крыс. Пероральный прием мелатонина и ацетилцистеина уменьшает выраженность гистологических нарушений в почках крыс с ЭГ. При этом мелатонин, и особенно его комбинация с АЦЦ, оказались более эффективными. Это можно объяснить известным антиоксидантным действием АЦЦ, и особенно мелатонина [5, 11]. Обнаруженное нами благоприятное действие препаратов мелатонина и ацетилцистеина при экспериментальном гломерулонефрите, возможно, позволит расширить арсенал средств, применяемых в качестве антиоксидантной терапии при данной патологии, что будет способствовать улучшению клинико-лабораторных проявлений заболевания и уменьшению процессов склерозирования почечной ткани.

*Литература*

1. Сукало, А.В. Первичный гломерулонефрит у детей Беларуси в современных экологических условиях (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дис. ... доктора мед. наук: 14.00.09 / А.В. Сукало; Минск. гос. мед. ин-т. – Минск, 1995. – 32 с.
2. Тугушева, Ф.А. Оксидативный стресс и его участие в иммунных механизмах прогрессирования хронической болезни почек / Ф.А. Тугушева, И.М. Зубина // Нефрология. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 42-48.
3. Bella, D.L. Cysteine metabolism in periportal and perivenous hepatocytes: perivenous cells have greater capacity for glutathione production and taurine synthesis but not for cysteine catabolism / D.L. Bella [et al.] // Amino Acids. – 2002. – Vol. 23, № 4. – P. 453-458.
4. Galle, J. Has the time come to use antioxidant therapy in uraemic patients? / J. Galle, S. Seibold // Nephrol. Dial. Transplant. – 2003. – Vol. 18, № 8. – P. 1452-1455
5. Impact of 30-day oral dosing with N-acetyl-L-cysteine on Sprague-Dawley rat physiology / D. Arfsten [et al.] // Int. J. Toxicol. – 2004. – Vol. 23, № 4. – P. 239-247.
6. Melatonin prevents hyperhomocysteinemia and neural lipid peroxidation induced by methionine intake / Bouzouf M. [et al.] // Curr. Neurovasc. Res. – 2005. – Vol. 2, № 2. – P. 175-178.
7. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats / M. Nava [et al.] // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2003. – Vol. 284, № 3. – P. F447-454.
8. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome / F. Locatelli [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2003. – Vol. 18, № 7. – P. 1272-1280.
9. Pinto, C.F. Hydration and N-acetylcysteine in acute renal failure caused by iodinated contrast medium: an experiment with rats / C.F. Pinto, M. Watanabe, F. Vattimo Mde // J. Nephrol. – 2008. – Vol. 21, № 5. – P. 783-788.
10. Tepel, M. Oxidative stress: does it play a role in the genesis of essential hypertension and hypertension of uremia / M. Tepel // Nephrol. Dial. Transplant. – 2003. – Vol. 18, № 8. – P. 1439-1442.
11. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species / M. Allegra [et al.] // J. Pineal. Res. – 2003. – Vol. 34, № 1. – P. 1-10.
12. Zhang, S. Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages / S. Zhang [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2004. – Vol. 501, № 1-3. – P. 25-30.

Авторы выражают благодарность сотрудникам УО «ГрГМУ»: доценту кафедры биологической химии А.В. Наумову, ассистентам кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Р.Е. Лису, Е.А. Поплавской за помощь в проведении эксперимента.

*Поступила 22.11.2011*