

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ  
АКАДЕМИЯ»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

ИСЛАЕВ АЛТЫНБЕК АЗРАТКУЛОВИЧ

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ НЕФРОПАТИЙ.

Направление подготовки: 06.06.01 Медико-биологические науки  
Направленность (специальность): 03.03.01. Физиология

Научный доклад

Научный руководитель доктор медицинских наук, профессор  
Брин Вадим Борисович

ВЛАДИКАВКАЗ 2019

На сегодняшний день в медицине становится все более актуальной проблема почечных патологий. С каждым годом наблюдается положительный прирост числа различных нефропатий, характеризующихся повреждением клубочкового и канальцевого аппарата почек. Грозным осложнением нефропатий является почечная недостаточность. Свой вклад в усугубление почечного поражения вносит неблагоприятная экологическая обстановка. Особое значение имеет загрязненность тяжелыми металлами, в том числе и соединениями свинца. Являясь органами выделения, почки повреждаются соединениями свинца, что на фоне развившейся нефропатии приводит к значительному нарушению их функции.

Следует отметить, что важную роль в патогенезе развития почечного повреждения играет перекисное окисление липидов мембран эпителиоцитов почек. При нефропатиях развивающаяся воспалительная реакция является источником свободных радикалов, вызывающих окислительную деструкцию канальцев. Нарастающий лизис нефроцитов вызывает высвобождение активных форм кислорода и усугубляет процессы липопероксидации. Свинец также обладает пероксидативным эффектом. Такое воздействие тяжелого металла связано как с его способностью вызывать повреждение эндотелия сосудов, питающих нефроны, так и оказывать токсическое действие на сами клетки почек. В результате образуется большое количество свободных радикалов. Оксидативное повреждение почечной ткани при липопероксидации обусловлено развивающимся окислительным стрессом, который обусловлен ингибированием антиоксидантной системы. Соединения свинца обладают гипоксическим эффектом, что усиливает процессы перекисного окисления липидов.

Учитывая вышесказанное, актуальным является применение препаратов, уменьшающих оксидативное повреждение. Таким препаратом является ацизол – мощнейший противогипоксант, обладающий антиоксидантными свойствами. Однако остаются неизученными результаты

его применения на фоне нефропатий при сочетании с интоксикацией тяжелыми металлами.

Цель работы:

Выявить физиологические механизмы нормализации функции почек с помощью антиоксиданта ацизола в условиях рабдомиолиз-индуцированного и ишемически-реперфузионного повреждения почек на фоне интоксикации ацетатом свинца.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние экспериментальной рабдомиолиз-индуцированной нефропатии на мочеобразовательную функцию почек;
2. Изучить влияние экспериментального ишемически-реперфузионного повреждения почек на функцию мочеобразования;
3. Изучить влияние ацетата свинца на фоне рабдомиолиз-индуцированной и ишемически-реперфузионной нефропатии на функцию почек;
4. Изучить влияние ацизола на параметры мочеобразования на фоне экспериментальных моделей нефропатий;
5. Изучить влияние ацизола на фоне сочетания экспериментальных нефропатий с интоксикацией ацетатом свинца.

Материалы и методы исследования.

Исследования проведены на 240 крысах-самцах линии Вистар средней массой  $267 \pm 13$  г, которые были поделены на 11 групп: 1 группа – фоновая (интактные крысы), 2 группа – животные с экспериментальной моделью глицеринового повреждения почек, 3 группа – животные с внутрижелудочным введением препарата ацизол при моделировании токсической почечной недостаточности, 4 группа – животные с ишемически-

реперфузионной нефропатией, 5 группа – животные с внутрижелудочным введением ацизола на фоне ишемически-реперфузионного повреждения почек, 6 группа – ложнооперированные животные, 7 группа – животные с экспериментальной свинцовой нефропатией, 8 группа – животные с введением ацетата свинца на фоне рабдомиолиз-индуцированного поражения почек, 9 группа – животные с введением ацетата свинца на фоне ишемически-реперфузионной нефропатии, 10 группа – животные с сочетанным введением ацизола и ацетата свинца на фоне рабдомиолиз-индуцированной нефропатии, 11 группа – животные с сочетанным введением ацетата свинца и ацизола на фоне ишемически-реперфузионного повреждения почек. Эксперименты проводились в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных (1985), 11-й статьёй Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (2016).

Рабдомиолиз-индуцированное поражение почек инициировали внутримышечным введением 50 % раствора глицерина. В соответствии с данными литературы была принята расчетная доза в 0,8 мл на 100 г веса экспериментального животного. Ишемически-реперфузионное повреждение почек моделировалось интраоперационно путем билатерального лигирования почечной ножки через забрюшинный доступ. Лигатура накладывалась на 60 мин, после чего восстанавливалось кровоснабжение почки. Наркоз осуществлялся с помощью 2% тиопентала натрия в дозе 40 мг на 1 кг веса животного. У ложнооперированных животных также производился забрюшинный доступ к почкам, но без последующего пережатия сосудистой ножки органа. «Ацизол» вводился с помощью внутрижелудочного зонда в дозировке 30 мг/кг 1 раз в сутки с первого дня моделирования нефропатии в течение 14 и 30 дней. По истечении 14-х и 30-х суток у животных экспериментальных групп проводили забор крови и сбор мочи. Мочу собирали в течение 6 часов в условиях спонтанного диуреза.

Для оценки процессов перекисидации липидов определяли концентрацию в крови гидроперекисей (ГП) по методу В. Б. Гавриловой с соавт. и малонового диальдегида (МДА) по методу, основанному на его взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой. Также было изучено состояние антиоксидантной системы (АОС), для чего была определена активность каталазы по методу E. Beutler и активность супероксиддисмутазы (СОД). В крови и моче спектрофотометрически с помощью диагностических наборов «Ольвекс» определяли содержание эндогенного креатинина и белка. Концентрацию Na и K в крови измеряли с помощью анализатора электролитов АЭК-01, а в моче – с помощью пламенного фотометра ПФА-378. На основании полученных данных были рассчитаны: объем диуреза (мл/ч/100 г), скорость клубочковой фильтрации (СКФ, мл/ч/100 г), относительная канальцевая реабсорбция воды ( $R_{H_2O}$ , %), фильтрационный заряд (ФЗ) натрия, калия и кальция (мкмоль/ч/100 г), их экскреция ( $E_x$ , мкмоль/ч/100 г) и относительная реабсорбция натрия и кальция ( $R_x$ , %). Статистическая обработка результатов с применением непараметрического U-критерия МаннаУитни была проведена с помощью программы GraphPad Prism 6.01. О наличии значимых различий и факторных влияний судили при критическом уровне достоверности (p) меньшем 0,05.

Результаты и их обсуждение.

### **Влияние ацизола на фоне рабдомиолиз-индуцированной (глицериновой) нефропатии.**

При исследовании состояния перекисного окисления липидов у животных с введением ацизола уровень малонового диальдегида был достоверно ниже, чем у животных второй группы с глицериновым поражением почек. Содержание гидроперекисей, повышенное при нефропатии, на фоне введения ацизола восстанавливалось до фоновых значений. При применении ацизола активность каталазы и на 14-е, и на 30-е сутки токсической нефропатии была достоверно выше, чем в

четырёхнедельный срок. Активность другого фермента антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы – у животных третьей группы соответствовала фоновым значениям. Таким образом, можно полагать, что ацизол снижает ПОЛ, активируя механизмы антиоксидантной защиты, что подтверждалось и в других работах.

Глицериновое поражение сопровождалось изменением водовыделительной функции почек. На фоне применения ацизола в течение 2 недель отмечалось трехкратное повышение 6-часового спонтанного диуреза в сравнении со значениями интактных животных. Полиурия была обусловлена резким увеличением скорости клубочковой фильтрации, тогда как реабсорбция воды восстанавливалась до уровня фоновых значений. На 30-е сутки было обнаружено снижение объема 6-часового диуреза в сравнении с показателями на 14-е сутки, но в то же время диурез был достоверно выше фона. Данное изменение объема диуреза, как и через 2 недели, было обусловлено изменениями скорости клубочковой ультрафильтрации. Возрастание скорости клубочковой фильтрации и, как следствие, увеличение диуреза на фоне введения ацизола, предположительно, может быть связано с повышением почечного кровотока. Вероятно, препарат нивелирует действие выделяемых при рабдомиолизном поражении вазоконстрикторов, что отчасти подтверждается другими работами, где ацизол вызывал снижение общего периферического сопротивления сосудов. Степень почечного повреждения отражает и содержание белка в моче. При введении ацизола содержание белка в моче в двухнедельный срок снижается до значений, полученных на 30-е сутки у животных с нефропатией. На 4-й неделе эксперимента у крыс с моделью нефропатии, получавших ацизол, концентрация белка в моче восстанавливалась до исходных значений. Следовательно, применение ацизола уменьшает степень почечного повреждения, что отражает снижение уровня протеинурии. Глицериновая нефропатия проявлялась нарушениями и электролитовыделительной функции почек. Применение ацизола у животных с почечным повреждением

значительно увеличивало экскрецию натрия на весь период исследований, хотя на 4-й неделе она становилась меньше, чем через 2 недели эксперимента. Сдвиги экскреции натрия были связаны с изменениями фильтрационного заряда катиона, при том, что относительная канальцевая реабсорбция натрия оставалась на неизменно высоком уровне. Динамика сдвигов фильтрационного заряда, выявленная для натрия при введении ацизола, прослеживается и для калия. Соответственно изменениям фильтрационного заряда при использовании ацизола экскреция калия на 2-й неделе эксперимента была немного повышена в сравнении с фоновыми значениями, тогда как на 4-й неделе не отличалась от фона. Следует отметить, что у животных с нефропатией экскреция К увеличивается на фоне сниженного фильтрационного заряда калия. Можно предположить, что калийурез был результатом выхода калия из клеток при рабдомиолизе и почечном повреждении.

#### **Влияние ацизола на фоне ишемически-реперфузионной нефропатии.**

Изучение изменений концентрации продуктов ПОЛ на фоне реперфузионного синдрома, развившегося после часовой ишемии почек, выявило достоверное увеличение их содержания на всех сроках эксперимента, при этом через месяц отмечалось увеличение в два раза. У ложнооперированных животных продукты ПОЛ были незначительно выше фоновых значений только на 2 неделе опыта. Введение ацизола привело к снижению концентрации МДА и гидроперекисей до интактного уровня. Активность антиоксидантного фермента каталазы была повышена у животных с экспериментальной моделью повреждения почек. Применение препарата повышало активность фермента относительно показателей у животных с ишемией и реперфузией. Активность другого фермента – СОД – наоборот, снижалась у животных с патологией. Профилактика ацизолом у таких животных повышала активность СОД до исходных значений. Ацизол,

проявляя антиоксидантные свойства, уменьшает процессы свободнорадикального окисления.

Повреждение почек при их ишемии с последующей реперфузией, усугубляющееся процессами липопероксидации, проявлялось изменением диуреза. Так, на 2 неделе нефропатии отмечалось уменьшение диуреза с восстановлением к концу эксперимента. Уменьшение диуреза было связано с высоким уровнем канальцевой реабсорбции воды на фоне повышенной скорости клубочковой фильтрации. Восстановление объема выделенной мочи происходило из-за возвращения уровня фильтрации и реабсорбции воды к фоновым значениям. Интрагастральное введение ацизола привело к повышенному выделению мочи как на второй, так и на четвертой неделе исследования. Увеличение диуреза на 2 неделе эксперимента было обусловлено высокой скоростью клубочковой фильтрации несмотря на интенсивное обратное всасывание воды в канальцах. Двухкратный подъем уровня диуреза спустя месяц был обусловлен небольшим снижением канальцевой реабсорбции воды. Ацизол усиливает процесс мочеобразования за счет ускорения клубочковой фильтрации, что, вероятно, было обусловлено его вазодилатирующим эффектом. У ложнооперированных животных показатели водовыделительной функции почек не отклонялись от интактного диапазона. Ишемически-реперфузионное повреждение почек сопровождалось изменениями в их электролитовыделительной функции. Так, через месяц у животных с моделью реперфузионного поражения отмечалось повышение экскреции натрия, связанное со значительным снижением относительной реабсорбции иона. Ацизол вызывал на 14-е сутки у животных с моделью почечной патологии увеличение объема выводимого электролита более чем в два раза на фоне значительной фильтрационной загрузки натрием и интактным уровнем его возврата в циркуляцию. На 30-е сутки экскреция Na была такой же, как и у животных с нефропатией без введения препарата. Это было обусловлено как усилением канальцевой реабсорбции иона, так и снижением его фильтрационного заряда относительно двухнедельных

показателей. Выведение другого иона – калия – менялось в большую сторону лишь спустя 4 недели на фоне введения ацизола, при этом фильтрационный заряд электролита был повышен и на 2 неделе моделирования ишемически-реперфузионного повреждения почек, и на 2 неделе применения ацизола. Еще одним важным маркером поражения почек является уровень белка в моче. Содержание протеинов в моче было значительно повышено спустя 14 дней реперфузии. Через 30 дней после операции концентрация белка в моче несколько снижалась, хоть и оставалась выше фоновых значений. Применение ацизола через 2 недели снижало протеинурию до показателей, которые были у лабораторных животных через месяц после ишемически-реперфузионного повреждения.

#### **Влияние ацизола на фоне нефропатий и интоксикации ацетатом свинца.**

Активность процессов перекисного окисления на всех сроках введения ацетата свинца как при рабдомиолиз-индуцированной, так и при ишемически-реперфузионной нефропатии была выше, чем у животных с изолированной моделью почечного повреждения. Это отмечалось значительным повышением продуктов перекисного окисления, при этом на 4 неделе эксперимента их концентрация была выше, чем на 2 неделе. Одновременное введение ацизола и свинца при глицериновой и реперфузионной нефропатии вызывало снижение содержания МДА и ГП в течение всего исследования, но при этом показатели оставались выше фоновых. Активность каталазы была незначительно повышена на 2 неделе введения соли свинца на фоне нефропатий, тогда как супероксиддисмутаза проявляла меньшую активность, чем у фоновых животных. На 4 неделе отмечалось снижение активности обоих ферментов относительно интактных значений. Интоксикация свинцом оказывает ингибирующий эффект на многие ферменты, в том числе и на ферменты антиоксидантной системы. Применение ацизола у животных с экспериментальными моделями нефропатий на фоне введения тяжелого металла привело к повышению

активности каталазы и супероксиддисмутазы на 15 и 30 сутки. Уровень активности ферментов соответствовал результатам, полученным при введении ацизола на фоне экспериментальных нефропатий. То есть ацизол проявлял антиоксидантный эффект в том числе и за счет активации ферментов, нивелирующих неблагоприятные эффекты процессов перекисного окисления.

При изучении водовыделительной функции почек на фоне интоксикации свинцом и экспериментальных нефропатиях отмечались следующие изменения. На 2 неделе эксперимента наблюдалась полиурия. При этом объем выделенной мочи был выше у животных с введением ацетата свинца и ишемически-реперфузионным поражением почек. Увеличение диуреза у животных обеих групп сопровождалось одновременным уменьшением фильтрации и канальцевой реабсорбции. На 4 неделе введения свинца у животных с повреждением почек наблюдалось уменьшение диуреза, при сохраняющемся замедлении фильтрации на фоне сниженного уровня реабсорбции воды. Угнетение обратного всасывания воды было выраженным в течение 4 недель из-за токсического действия свинца на канальцы почек. Применение ацизола в данных условиях привело к значительному увеличению диуреза на 14 сутки, что было обусловлено повышением скорости клубочковой фильтрации, на фоне более слабого угнетения уровня канальцевой реабсорбции. На 30 сутки уровень диуреза снижался в сравнении с 14 сутками, но оставался выше фонового уровня. Данное изменение сопровождалось снижением фильтрационной способности почек при некотором восстановлении реабсорбции воды в канальцах.

Свинцовая интоксикация у животных с экспериментальными нефропатиями нарушала и электролитовыделительную функцию почек. Двухнедельное введение солей свинца повышало экскрецию натрия, что было обусловлено угнетением его реабсорбции вследствие поражения канальцевого аппарата почек при пониженной фильтрационной нагрузке данного электролита. Спустя четыре недели экскреция натрия несколько

снижалась на фоне уменьшения фильтрационного заряда электролита и его реабсорбции. Ацизол приводил к увеличению экскреции Na в течение месяца, что было обусловлено повышением фильтрационной нагрузки катиона. При этом его реабсорбция несколько восстанавливалась. На всех сроках введения соли свинца животным с моделями нефропатий отмечался повышенный калийурез на фоне увеличенного фильтрационного заряда катиона. Применение ацизола стимулировало еще большее выделение калия при сохраняющейся на высоком уровне фильтрационной нагрузке электролита.

Об уровне повреждения почек можно судить по такому показателю, как содержание белка в моче. Так, при отравлении свинцом в условиях имеющейся у животных нефропатии отмечалась значительная протеинурия на всех сроках эксперимента. Концентрация протеина в моче у этих животных была выше, чем у крыс с изолированной нефропатией. Введение ацизола привело к снижению уровня белка в моче, хотя показатели и оставались выше фоновых.

#### Выводы.

При глицериновой и ишемически-реперфузионной нефропатии в целом отмечается уменьшение мочеобразовательной функции почек. Ацизол, оказывая антиоксидантный эффект, уменьшает альтерацию в почечной ткани. В результате уменьшается содержание белка в моче, усиливается фильтрация и восстанавливается реабсорбция воды, что приводит к увеличению объема выделяемой мочи.

Введение ацетата свинца на фоне нефропатий приводит к значительному усугублению нарушений функции почек и наиболее высоким уровнем протеинурии. Это может быть обусловлено большей активностью процессов перекисного окисления липидов и подавлением антиоксидантной защитной системы. Использование ацизола приводит к уменьшению липопероксидации, что сочетается с меньшим нарушением функции почек и снижением выраженности протеинурии.