

## ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В ПОЧКАХ ПОСЛЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

<sup>1</sup>Байбурина Г.А., <sup>1</sup>Нургалева Е.А., <sup>2</sup>Башкатов С.А., <sup>3</sup>Шибкова Д.З.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Россия (450000, Уфа, ул. Ленина, 3), e-mail: bsmunauka@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия (450076, ул. З. Валиди, 32) e-mail: rector@bsunet.ru

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный педагогический университет», Челябинск, Россия (454080 г. Челябинск, пр. Ленина, 69), e-mail: postbox@cspu.ru

Эксперимент выполнен на самцах неинбредных белых крыс, разделенных на 4 группы по устойчивости к гипоксии. 5-минутную аноксию моделировали под общим эфирным наркозом интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца с последующей реанимацией. Период наблюдения составлял 35 дней. В гомогенатах тканей почек определяли содержание глутатиона восстановленного, каталазы, ТБК-реагирующих продуктов. Морфологию почек изучали методом световой микроскопии окраской гематоксилином и эозином. Установлено, что развитие и исход ишемического повреждения почек обусловлены индивидуальными физиолого-биохимическими характеристиками животных. У крыс, высокоустойчивых и среднеустойчивых к гипоксии, отмечались исходно высокие показатели антиоксидантной защиты при относительно низкой активности ПОЛ. У животных неустойчивых на фоне недостаточности антиоксидантной защиты наблюдалась высокая активность процессов липопероксидации. Установлены нарушения структуры почечной ткани в постреанимационном периоде на протяжении всего исследования, которые к концу периода наблюдения в почках проявляются развитием необратимых повреждений в виде гломерулосклероза и гиалиноза клубочкового аппарата.

Ключевые слова: почки, гипоксия, ишемия, реперфузия, крысы, перекисное окисление липидов, резистентность к гипоксии.

## CHANGE THE STRUCTURE AND LIPID PEROXIDATION IN KIDNEY AFTER ISCHEMIA-REPERFUSION IN RAT WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

<sup>1</sup>Bayburina G.A., <sup>1</sup>Nurgaleeva E.A., <sup>2</sup>Bashkatov S.A., <sup>3</sup>Shibkova D.Z.

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, Russia (450000, Ufa, street Lenin, 3), e-mail: bsmunauka@mail.ru

<sup>2</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia (450076, street Z. Validi, 32) e-mail: rector@bsunet.ru

<sup>3</sup>Chelyabinsk State Pedagogical University, Chelyabinsk, Russia (454080, Chelyabinsk, pr. Lenin, 69) e-mail: postbox@cspu.ru

The experiment was performed on male noninbred albino rats, which were divided into 4 groups of resistance to hypoxia. 5-minute anoxia was simulated under general ether anesthesia by intratoracal vascular clamping beam of heart followed by resuscitation. The observation period was 35 days. In kidney tissue homogenates the content of the restored glutathione was determined, catalase, TBA-reactive products. The morphology of the kidney was studied by light microscopy, hematoxylin and eosin stain. It was found that the development and outcome of ischemic renal injury was caused by individual physiological and biochemical characteristics of animals. In high-stable and middle-stable rats initially high levels of antioxidant protection at relatively low activity of lipid peroxidation were observed. In animals unstable in deficiency of antioxidant defense high activity of lipid peroxidation was observed. Found a violation of the structure of muscle tissue in the postoperative period throughout the study, which by the end of the observation period in the development of kidney manifested in the form of irreversible damage glomerulosclerosis and glomerular hyalinosis machine.

Keywords: kidney, renal, hypoxia, ischemia, reperfusion, rats, lipid peroxidation, resistance to hypoxia

Традиционными объектами изучения процессов липопероксидации при различных формах нарушения кровообращения были и остаются сердце и головной мозг. Вместе с тем имеются органы и ткани, в частности почки, которые не менее уязвимы для повреждающих факторов ишемии и реперфузии [10, 12], а нарушение их функций лежит в основе вторичных

нарушений кровообращения, водно-солевого обмена и интоксикации организма после перенесенного терминального состояния [8, 11]. Диапазон генетически детерминированных физиолого-биохимических реакций организма на экстремальные воздействия весьма широк, различия выявляются на системном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях и, безусловно, могут определять выживаемость животных после перенесенного критического состояния и восстановление функций [4, 5]. Хорошо известно, что соотношение «перекисное окисление липидов/антиоксидантные системы в мозге [6], сердце, печени [3]» влияет на чувствительность животных к гипоксии. Однако механизмы, определяющие особенности липопероксидации и устойчивости к ишемическим повреждениям почек, вызванным остановкой системного кровообращения, требуют дальнейшего изучения.

**Цель работы** – выявление особенностей процессов перекисного окисления липидов в почках у крыс с различной резистентностью к гипоксии в длительной динамике после ишемического повреждения, вызванного остановкой системного кровообращения, и их взаимосвязи со структурными повреждениями.

**Материалы и методы.** Серия экспериментов выполнена на 320 половозрелых самцах неинбредных белых крыс массой 150–180 г, содержащихся в виварии на стандартном рационе и свободном доступе к воде, после предварительного тестирования на резистентность к гипоксии [1]. По итогам тестирования все животные были разделены на 4 группы – неустойчивые (HeУ), низкоустойчивые (НизУ), среднеустойчивые (СУ) и высокоустойчивые к гипоксии (ВУ). Группы включали по 70 опытных и 10 контрольных крыс. Через неделю после тестирования под общим эфирным наркозом моделировали 5-минутную аноксию интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца по методу Корпачева В.Г. (1982). Реанимация проводилась с помощью наружного массажа сердца и искусственной вентиляции легких. Контрольная группа крыс после тестирования на устойчивость к гипоксии подвергалась эфирному наркозу без моделирования аноксии. Период наблюдения составлял 35 дней. В гомогенатах тканей почек определяли содержание глутатиона восстановленного G-SH (Patterson et al., в модификации Путилиной Ф.Е., 1982), каталазы (Королюк М.А., 1988), ТБК-реагирующих продуктов (ТБК-рп) [7]. Морфологию почек изучали методом световой микроскопии окраской гематоксилином и эозином в динамике постреанимационного периода на 1-е, 3-и, 5-, 7-, 14-, 21- и 35-е сутки. Результаты статистически обрабатывали параметрическими методами с вычислением средних значений ( $m$ ), стандартных отклонений ( $n$ ). Достоверность различий средних оценивали по t-критерию Стьюдента, отношения между независимыми и зависимыми переменными исследовали с помощью дисперсионного анализа.

### **Результаты и обсуждение**

До моделирования аноксии крысы с разной устойчивостью к гипоксии достоверно отличались по уровню функционирования защитных систем в клетках тканей почек. Так, активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона были выше у ВУ животных в сравнении со СУ соответственно на 11% ( $p < 0,05$ ) и 13% ( $p < 0,05$ ); с НизУ – на 15% ( $p < 0,01$ ) и 20,4% ( $p < 0,01$ ); с НеУ – на 21% ( $p < 0,001$ ) и 28,6% ( $p < 0,001$ ). При этом активность процессов ПОЛ по уровню накопления ТБК-рп во всех группах животных не различалась.

Обработка полученных данных с помощью дисперсионного анализа выявила статистически значимое влияние ( $p < 0,01$ ) устойчивости к гипоксии на уровень ТБК-активных продуктов на 1-е, 5-е и 21-е сутки (рис. 1). На 1-е и 21-е сутки устойчивость к гипоксии уменьшала содержание ТБК-рп, т.е. у устойчивых к гипоксии животных их уровень был ниже, чем у неустойчивых, что свидетельствует о более эффективной работе антиоксидантных систем. Тем не менее на 5-е сутки в группе ВУ наблюдалось снижение адаптационных процессов, поскольку уровень ТБК-рп у них был выше, чем у НеУ и НизУ животных.

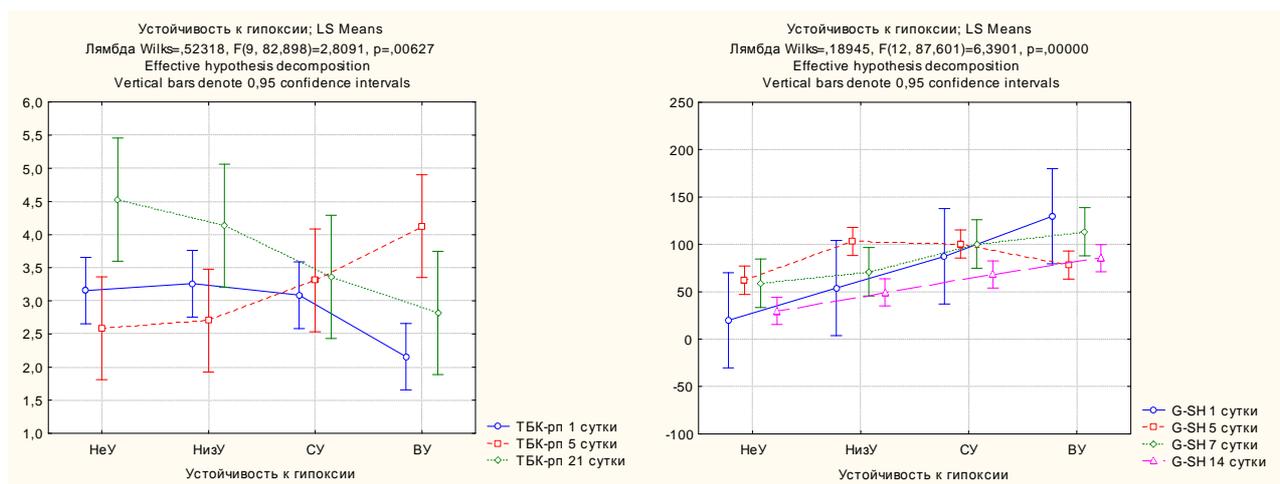


Рис. 1. Влияние устойчивости к гипоксии на уровень ТБК-рп в гомогенате почек

Рис. 2. Влияние устойчивости к гипоксии на содержание восстановленного глутатиона в гомогенате почек

На рисунке 2 хорошо видно, что уровень глутатиона повышается по мере возрастания показателя устойчивости к гипоксии ( $p < 0,001$ ), и самый низкий его уровень соответствует группе НеУ. Однако на 5-е сутки у животных, высокоустойчивых к гипоксии, очевидно, эффективность адаптационно-компенсаторных механизмов, оцениваемых по данному показателю, значительно снижается. Истощение ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты, возможно, связано с более высокой активностью в этой группе (ВУ) процессов липопероксидации.

Влияние устойчивости к гипоксии на уровень каталазы демонстрирует рисунок 3. Различия между средними значениями показателя в разных группах достоверны во все сроки

наблюдения: чем больше резистентность животных к гипоксии, тем выше у них уровень каталазы. Хотя каталаза является ферментом, достаточно устойчивым к нарушениям свободно-радикального гомеостаза [2], тяжелое гипоксическое воздействие на животных с исходно низким уровнем каталазы (НУ и НизУ) вызывает критическое снижение ее активности в тканях почек. На 5-е сутки на фоне снижения каталазы адаптационно-приспособительная реакция у этих крыс осуществляется за счет напряжения неферментативного глутатионового звена. Восстановление активности каталазы в тканях почек до контроля происходило только к 35-м суткам.

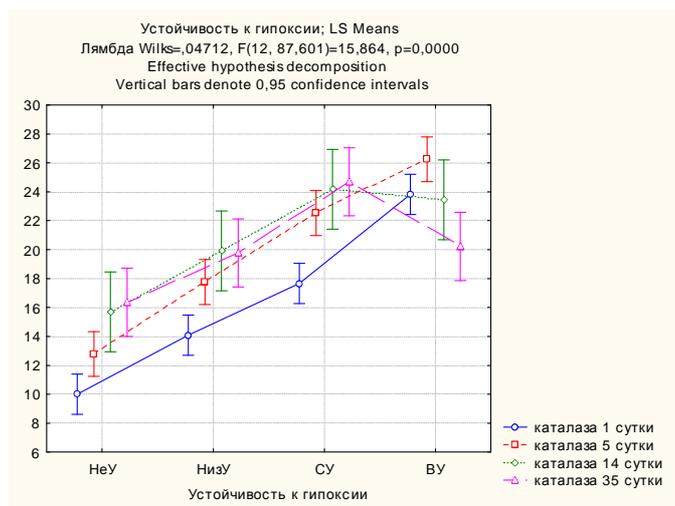
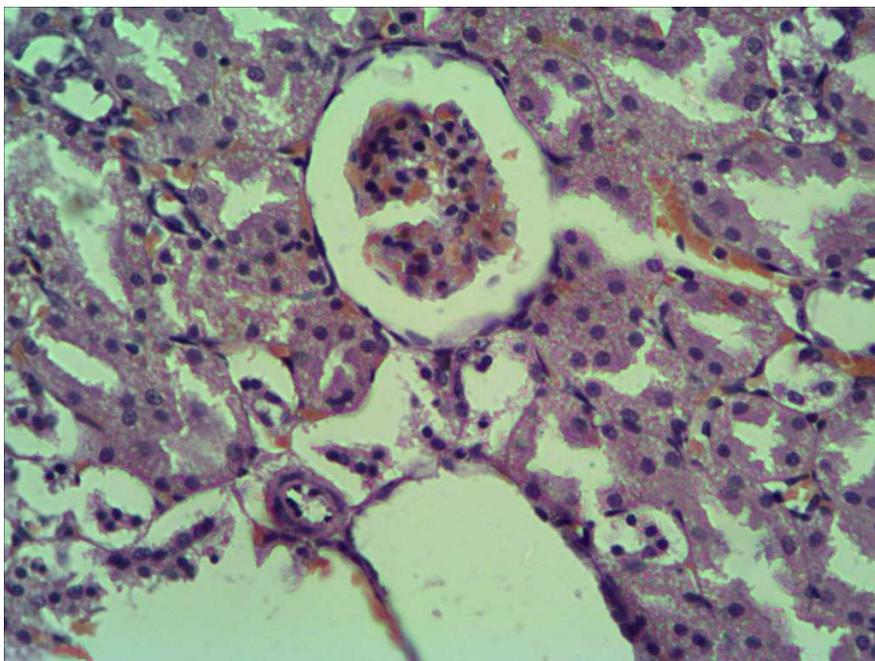


Рис. 3. Влияние устойчивости к гипоксии на активность каталазы в гомогенате почек

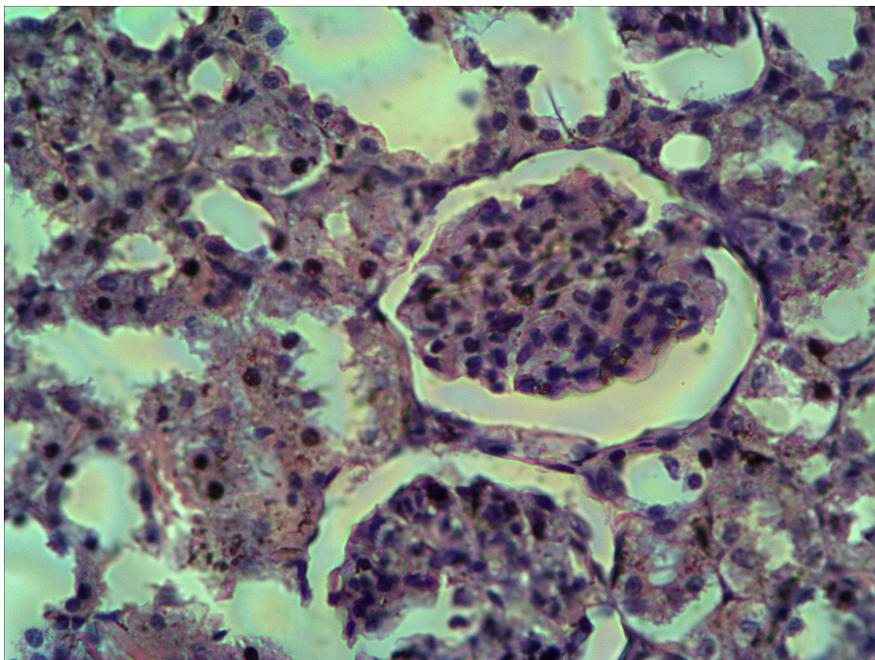
Анализ структурных изменений, происходящих в тканях почек, показал следующую динамику. На 1–3-и сутки постреанимационного периода у крыс ВУ в тканях коркового и мозгового вещества почек наблюдалось неравномерное кровенаполнение: на фоне выраженного полнокровия сосудов стромы со значительным числом кровоизлияний (рис. 4) отмечалось малокровие клубочков, которые выглядели спавшимися, а просветы клубочка были значительно расширены. Подобная картина могла свидетельствовать о шунтировании кровотока в обход клубочков, что существенно ухудшало процессы клубочковой фильтрации [9]. На этом фоне эпителий канальцев находился в состоянии зернистой и гиалиново-капельной дистрофии, что косвенно указывает на расстройства фильтрационной функции почек и наличие в первичной моче белка, который по механизму инфильтрации мог проникать в нефротелий. В гистологических препаратах НизУ и НУ крыс на 1–3-и сутки после оживления отмечалось малокровие почек: сосудистые клубочки спавшиеся, их размеры уменьшены (рис. 5). Капсулы клубочков и канальцы нефронов несколько расширены, однако клеточность не нарушена.

На 5–7-е сутки в группе ВУ и СУ к умеренному полнокровию сосудов стромы присоединялись органические изменения сосудистых стенок в виде их утолщения за счет эпизодов плазморрагии, плазматического пропитывания и продуктивной тканевой реакции,

что укладывалось в картину эндомикроваскулита. В сосудистых клубочках кровенаполнение восстанавливалось, размеры их не отличались от исходных параметров. В то же время эпителий канальцев представлялся набухшим, с признаками зернистой дистрофии. Эти изменения происходили параллельно с усилением процессов липопероксидации, что проявлялось повышенным накоплением ТБК-РП и снижением глутатиона у ВУ животных, что было расценено нами как срыв адаптационно-компенсаторных механизмов.



*Рис. 4. Полнокровие сосудов мозгового вещества почек со значительным числом мелких кровоизлияний через сутки после оживления. Группа крыс, высокоустойчивых к гипоксии. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофотография. Увел. X100*



*Рис. 5. Малокаровые спавшиеся сосудистые клубочки на 1-е сутки после опыта. Группа крыс, неустойчивых к гипоксии. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофотография. Увел. X400*

В препаратах почек НизУ и НУ крыс на 5–7-е сутки постреанимационного периода сохранялось низкое кровенаполнение как в клубочках, так и в сосудах стромы. Четко прослеживались значительные дистрофические изменения канальцев нефрона по типу зернистой дистрофии, набухания клеток. В просвете части канальцев наблюдались зернистые эозинофильные массы белкового происхождения (НУ). Кроме этого, в

межуточной ткани отмечались множественные лейкоцитарные инфильтраты, что свидетельствует о нарастании интерстициального нефрита. Картина интерстициального нефрита сохранялась вплоть до 14 суток (НУ и НизУ).

К 10–14-м суткам постреанимационного периода у ВУ и СУ крыс в морфологической картине отмечалась положительная динамика. В клубочках кровенаполнение было близко к нормальному, капсула клубочка не изменена (ВУ), в строме оставались небольшие признаки слабости и неравномерности кровенаполнения (СУ). Основные же расстройства обнаруживались в канальцах нефрона, где имелись признаки зернистой дистрофии, особенно выраженные в проксимальном отделе. Просвет канальцев выглядел неровным из-за неравномерного набухания клеток, которые выглядели неравномерно прокрашенными. В просвете канальцев прослеживались розовые массы с единичными слущенными клетками и зернистыми эозинофильными массами, что свидетельствовало о формировании цилиндров.

На 21-е сутки постреанимационного периода морфологическая картина почек вновь резко ухудшилась, особенно в группе ВУ и СУ. На фоне неравномерного кровенаполнения сосудов стромы появлялись многочисленные участки с кровоизлияниями, как и в ранние сроки после оживления, хотя в меньшем количестве и менее выраженные. Со стороны клубочкового аппарата отмечалось утолщение стенок парагломерулярных артериол вследствие отека и продуктивной реакции по типу эндovasкулита. В канальцах продолжали отмечаться изменения по типу зернистой дистрофии, клетки канальцев оставались увеличенными, набухшими, что приводило к сужению просвета канальцев.

К концу периода наблюдения морфологическая картина несколько улучшалась, нормализовалось кровенаполнение сосудистых клубочков. В то же время уровень кровенаполнения стромальных областей оставался пониженным, а со стороны канальцев нефрона по-прежнему выявлялась зернистая дистрофия. Эпителий канальцев нефрона оставался таким же набухшим, а в их просветах выявлялись зернистые цилиндры со слущенными клетками эпителия. Таким образом, полной нормализации гистоструктуры почек не произошло в этих группах животных и на 35-е сутки постреанимационного периода.

В препаратах почек НизУ и НУ к концу 21-х суток впервые появляется некоторая положительная морфологическая динамика. Кровенаполнение сосудов остается еще слабым, однако кровь в них обнаруживается. Наряду с нормальными почечными тельцами встречаются спавшиеся, подтянутые клубочки, с расширенными капсулами. Со стороны единичных почечных телец можно отметить явления очагового гломерулосклероза. Эпителий канальцев дистрофирован, размеры клеток в пределах нормы. В ряде препаратов отмечается выраженное полнокровие сосудов стромы мозгового вещества с

кровоизлияниями и участками геморрагического пропитывания. К концу периода наблюдения (35-е сутки) в большинстве препаратов значимых патологических изменений не обнаруживается. Степень кровенаполнения сосудов нормализовалась. Сами сосуды внешне без изменений, однако в некоторых участках почек обнаруживаются сосуды с явлениями гиалиноза стенок артериол. В целом паренхима почек имеет нормальный вид. Просвет канальцев свободен. Сохраняются слабовыраженные дистрофические изменения канальцев, эпителий уплощен.

Таким образом, в ранние сроки после оживления (1–3-и сутки) у животных превалировали нарушения микроциркуляции, зависящие от уровня устойчивости к гипоксии и приводящие к дистрофическим изменениям как клубочков, так и канальцев. В последующем кровенаполнение клубочков в той или иной степени улучшалось, а основные расстройства обнаруживались в канальцах нефронов (10–14-е сутки). Следует подчеркнуть, что улучшение морфологической картины у животных НУ и НизУ происходило постепенно, без сколько-либо значимых качественных скачков, в то время как у ВУ периоды восстановления (14-е сутки) сменялись периодами значительного ухудшения (21-е сутки). Полного восстановления структуры почечной ткани так и не произошло ни в одной из групп животных.

### **Заключение**

Результаты исследований свидетельствуют, что развитие и исход ишемического повреждения почек, вызванного остановкой системного кровообращения, обусловлены индивидуальными физиолого-биохимическими характеристиками животных, которые, очевидно, во многом генетически детерминированы. У крыс, высокоустойчивых и среднеустойчивых к гипоксии, отмечались исходно высокие показатели антиоксидантной защиты, которые тем не менее оказывались недостаточно эффективными в ранние сроки после реанимации (3–е сутки). У животных, неустойчивых к гипоксии, на фоне недостаточности антиоксидантной защиты наблюдалась высокая активность процессов липопероксидации, которая продолжала нарастать, достигая максимальных значений на 21–35-е сутки. Данные процессы взаимообусловлены, поддерживают друг друга, приводя к стойким нарушениям в работе паренхиматозных органов, что к концу периода наблюдения в почках проявляется развитием необратимых повреждений в виде гломерулосклероза и гиалиноза клубочкового аппарата. Поэтому повышение антиоксидантной защиты почек в постреанимационном периоде рассматривается нами как необходимое условие сохранения их структурно-функциональной целостности и активности.

### **Список литературы**

1. Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Шибкова Д.З., Башкатов С.А. Способ определения степени устойчивости к гипобарической гипоксии мелких лабораторных животных // Заявка №20141377/14 с приоритетом от 17.09.2014
2. Жировое перерождение печени и ишемическая болезнь сердца. Гериатрические аспекты / Под ред. Л.П. Хорошиной. — М., 2014. — 346 с.
3. Жукова А.Г., Сазонтова Т.Г., Заржецкий Ю.В., Волков А.В., Мороз В.В. Тканеспецифичность ответа системы про-и антиоксидантов после реанимации // *Общ. реаниматол.* — 2005. — Т. 1, № 3. — С. 46–53.
4. Жукова А.Г., Сазонтова Т.Г., Ю.В. Архипенко, Волков А.В. Половые различия в про- и антиоксидантной системах головного мозга в отдаленном постреанимационном периоде // *Общ. реаниматол.* — 2010. — Т. VI, № 4. — С. 54–57.
5. Зарубина И.В. Молекулярные механизмы индивидуальной устойчивости к гипоксии // *Обзоры клин. фармакол. лек. терапии.* — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 49–51.
6. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессу и гипоксия // *Бюл. эксперим. биол. мед.* — 1994. — № 1. — С. 574–575.
7. Стальная И.Д., Гаришвили Т.И. Определение интенсивности процессов ПОЛ по уровню малонового альдегида // *Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховичи.* — М.: Медицина, 1997. — С. 66–68.
8. Ahmadiasl N., Banaei S., Alihemmati A. Combination Antioxidant Effect of Erythropoietin and Melatonin on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats // *Iran J. Basic Med. Sci.* — 2013. — Vol. 16, № 12. — P. 1209–1216.
9. Hueper K., Gutberlet M., Rong S., Hartung D., Mengel M., Lu X., Haller H., Wacker F., Meier M., Gueler F. Acute kidney injury: arterial spin labeling to monitor renal perfusion impairment in mice-comparison with histopathologic results and renal function // *Radiology.* — 2014. — Vol. 270, № 1. — P. 117–24.
10. Lash L.H., Cummings B.S. Mechanisms of toxicant-induced acute kidney injury // *Comprehensive Toxicology–Renal Toxicology / ed. R.G. Schnellmann.* —Oxford: Elsevier, 2010. — P. 81–116.
11. Rodriguez F., Bonacasa B., Fenoy F.J., Salom M.G. Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury // *Curr. Pharm. Des.* — 2013. — Vol. 19, № 15. — P. 2776–94.
12. Sabbahy E.M., Vaidya V.S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair // *Wiley Interdiscip Rev. Syst. Biol. Med.* — 2011. — Vol. 3, № 5. — P. 606–618.

**Рецензенты:**

Каюмова А.Ф., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Уфа;

Хисматуллина З.Р., д.б.н., доцент, зав. кафедрой физиологии человека и зоологии ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет» МО РФ, г. Уфа.