УДК 615.322

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА В ХРОНИЧЕСКОЙ ФАЗЕ

Мондодоев А.Г. [1,2], Николаев С.М.[1,2], Болотов Г.Д.[3], Тармаев Ю.В.[3], Мануева Л.Б.[3]

[1]ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ, e-mail:amonbsc@mail.ru;
[2] ГОУ ВО «Бурятский государственный университет», Медицинский институт, Улан-Удэ;
[3] Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко, Улан-Удэ

Целью настоящей работы явилось исследование влияния «эксабола» сухого экстракта корней и корневищ сабельника болотного – *Comarum palustre* L. (СЭСБ) на функциональное состояние почек, липидный состав крови, активность свободнорадикальных процессов и выраженность иммунных нарушений в хронической фазе экспериментального нефрита Хеймана. Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах обоего пола линии Вистар массой 180–200 г. Экспериментальный гломерулонефрит вызывали по методу Reynolds и Pusey в модификации Мухина (2002). Результаты и обсуждение. Установлено, что хронический гломерулонефрит у животных сопровождается нарушением функционального состояния почек, активацией иммунных нарушений, свободнорадикальных процессов, дислипидемией, патоморфологическими изменениями. Курсовое интрагастральное введение сухого экстракта сабельника болотного лабораторным животным в экспериментально-терапевтической дозе оказывает выраженное нефропротекторное действие, о чем свидетельствует нормализация показателей морфофункционального состояния почек, липидного спектра крови, иммунного статуса и снижение активности свободнорадикальных процессов.

Ключевые слова: гломерулонефрит, эксабол, нефрит Хеймана, иммунные нарушения, дислипидемия, свободнорадикальные процессы.

INFLUENCE OF THE PLANT REMEDY ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS IN THE CHRONIC PHASE

Mondodoev A.G.[1,2], Nikolaev S.M.[1,2], Bolotov G.D.[3], Tarmaev Yu.V.[3], Manueva L.B.[3]

[1]Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, e-mail: amonbsc@mail.ru;
[2]Buryat State University, Medical Institute, Ulan-Ude;
[3]Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, Ulan-Ude

The aim of the present work was to study the influence of "exabol" – the dry extract from the roots and rhizomes of *Comarum palustre* L. on the functional state of kidneys, lipid content of the blood, activity of free radical processes and severity of immune disorders in the chronic phase of Heymann's nephritis. Materials and methods. Experiments were carried out on male and female Wistar rats weighing 180–200 g. Experimental glomerulonephritis was simulated according to Reynolds and Pusey's method modified by Mukhin (2002). Results and discussion. Chronic glomerulonephritis in animals is followed by disorders in the functional state of kidneys, activation of immune disorders and free radical processes, by dyslipidemia and patho-morphological changes. The course intragastric introduction of the dry extract of *Comarum palustre* to the animals in an experimental-therapeutic dose renders a marked nephron-protective effect confirmed by normalization of the indices in morpho-functional state of kidneys, lipid spectrum of the blood, immune status and the decrease of activity in free radical processes.

Keywords: glomerulonephritis, exabol, Heymann's nephritis, immune disorders, dyslipidemia, free radical processes.

Гломерулонефрит (ГН) – неуклонно прогрессирующее иммуноопосредованное воспалительное заболевание почек, приводящее к формированию хронической почечной недостаточности (ХПН). Накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о существенной роли мембранодеструктивных процессов в патогенезе ХПН [7]. Нарушение структурно-функциональной организации мембранных образований клеток данного органа связано с дисбалансом в про- и антиоксидантных системах и происходит за счет активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Нарушения мембран клеток почек могут быть

выражены в различной степени (от незначительной дезинтеграции с развитием их дисфункции до деструкции и гибели клетки), что зависит от состояния эндогенной антиоксидантной системы (АОС), роль которой заключается в защите клеток и тканей от влияния активных форм кислорода (АФК) и других токсических продуктов [1; 3].

В комплексе неиммунных факторов, влияющих на прогрессирование заболеваний почек, большое значение имеют метаболические нарушения липидного обмена – дис- и гиперлипидемии. Основное повреждающее действие липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) объясняется их способностью связываться с базальной мембраной клубочка и вызывать нарушение ее проницаемости. Атерогенные фракции липопротеидов способны проникать в мезангий клубочков и потенцировать пролиферацию мезангиальных клеток, что, в конечном итоге, приводит к формированию гломерулосклероза. Фактором, противодействующим отложению липидов, являются липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), обладающие способностью связывать холестерин и удалять его из почечной ткани [2; 10].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния «эксабола» сухого экстракта сабельника болотного – *Comarum palustre* L. (СЭСБ) на функциональное состояние почек, липидный состав крови, активность свободнорадикальных процессов и выраженность иммунных нарушений в хронической фазе экспериментального нефрита Хеймана.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах обоего пола линии Вистар массой 180–200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при одинаковом уходе и питании, световом и температурном режиме, со свободным доступом к воде. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики и приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». Экспериментальные исследования проводились в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Экспериментальный гломерулонефрит вызывали по методу Reynolds и Pusey в модификации И.В. Мухина (2002) [4]. Лабораторным животным в 2 точки у хвоста вводили полный адьювант Фрейнда, а также 50 % тканевый антиген коркового слоя почек здоровой крысы, через неделю после первого введения, инъекцию смеси повторяли в той же дозе. Животные первой опытной группы получали внутрижелудочно водный раствор СЭСБ в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг 1 раз в сутки, в течение 2 месяцев с момента последнего введения антигенного комплекса. В качестве референтного препарата использовали канефрон, в объеме 1,5 мл/кг, который вводили животным второй опытной группы по аналогичной схеме. Крысы контрольной группы получали

эквиобъемное количество воды дистиллированной. С целью оценки функционального состояния почек измеряли диурез и скорость клубочковой фильтрации (СКФ), проводили общий анализ мочи. В сыворотке крови определяли концентрацию креатинина, мочевины и липидный спектр на биохимическом анализаторе «DIANA» с использованием готовых наборов фирмы «Cormay» (Польша). Об интенсивности перекисного окисления липидов судили по концентрации малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови и гомогенате коркового слоя почек. Состояние эндогенной антиоксидантной системы организма оценивали по активности каталазы [9] и содержанию восстановленного глутатиона в крови [8]. Выраженность иммуновоспалительных процессов определяли по уровню циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови [5]. Для патоморфологических исследований гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином, а также по Массону и ШИК-реакцией. Морфометрические исследования проводили с использованием компьютерной программы «Motic Image 2000». Определяли количество клеток в клубочке, площадь почечного клубочка, капилляров клубочка и полости капсулы клубочка [6]. Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента. Различие считали достоверным при $P \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что на фоне олигурии у крыс контрольной группы отмечается нарушение экскреторной функции почек и выраженная протеинурия. Так, диурез снижается на 47 %, СКФ в 4,0 раза, содержание белка в моче увеличивается в 3,8 раза по сравнению с таковыми показателями у интактных животных.

Таблица 1

Влияние СЭСБ на функциональное состояние почек у белых крыс при хроническом гломерулонефрите (60-е сутки наблюдения)

Показатели	Группы животных			
	Интактная n = 8	Контрольная (ХГН+H_2O), n = 14	Опытная 1 (ХГН+ СЭСБ), n = 14	Опытная 2 (ХГН+канефрон),n = 12
Диурез, мл/100г/час	0,62±0,01	0,33±0,01	0,83±0,02*	0,73±0,01
СКФ, мл/ 100г/ час	2,9±0,08	0,7±0,02	1,5±0,03*	1,3±0,02
Белок в моче, г/л	1,2±0,03	4,6±0,05	2,1±0,04*	2,5±0,01

Примечание: * – здесь и далее, различие достоверно в группах контроль-опыт при $P \leq 0,05$

Курсовое введение животным СЭСБ и канефрона приводит к улучшению показателей функционального состояния почек: диурез увеличивается в 2,5 и 2,2 раза, СКФ

– в 2,1 и 1,8 раза, протеинурия снижается на 55 % и 46 %, по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы.

Результаты исследований азотистого обмена показали (табл. 2), что через 2 месяца от момента последнего введения антигенного комплекса у животных контрольной группы наблюдается повышение концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови в 2,0 и 3,0 раза соответственно, по сравнению с данными у животных интактной группы. На фоне курсового введения СЭСБ и канефрона, у животных опытных групп содержание креатинина и мочевины в сыворотке крови снижается в среднем на 35 % и 44 % соответственно по сравнению с данными у животных контрольной группы.

Таблица 2

Влияние СЭСБ на показатели азотистого обмена у белых крыс при хроническом гломерулонефрите (60-е сутки наблюдения)

Показатели	Группы животных			
	Интактная, n = 8	Контрольная (ХГН+H_2O), n = 14	Опытная 1 (ХГН+СЭСБ), n = 14	Опытная 2 (ХГН+канефрон), n = 12
Креатинин, мкмоль/ л	66,0±1,91	132,2±3,04	87,1±2,47*	96,0±2,10
Мочевина, ммоль/л	5,1±0,42	15,3±1,63	8,7±0,98*	9,9±0,59

Развитие хронической стадии экспериментального нефрита сопровождается гипер- и дислипидемией (табл. 3). Так, у животных контрольной группы в сыворотке крови содержание общего холестерина (ОХ) увеличивается на 33 %, триацилглицеридов (ТГ) – на 95 %, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) – на 65 %, липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) – в 3,0 раз, и содержание липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) снижается на 47 %, а коэффициент атерогенности увеличивается в 3,8 раза по сравнению с данными у крыс интактной группы.

Таблица 3

Влияние СЭСБ на липидный состав крови у белых крыс при хроническом гломерулонефрите (60-е сутки наблюдения)

Показатели	Группы животных			
	Интактная (n = 8)	Контрольная (ХГН+H_2O) (n = 14)	Опытная 1 (ХГН+СЭСБ) (n = 14)	Опытная 2 (ХГН+канефрон) (n = 12)
ОХ, ммоль/л	2,18±0,10	2,90±0,13	2,30±0,09*	2,21±0,11
ТГ, ммоль/л	1,02±0,02	1,99±0,11	1,50±0,10*	1,31±0,03
ЛПНП, ммоль/л	1,01±0,06	1,67±0,10	0,80±0,02*	0,88±0,11
ЛПОНП, ммоль/л	0,16±0,002	0,49±0,020	0,38±0,003*	0,34±0,020
ЛПВП, ммоль/л	1,02±0,13	0,54±0,03	0,79±0,06*	0,66±0,04

Коэффициент атерогенности	1,13	4,3	1,9	1,8

Курсовое введение СЭСБ и препарата сравнения приводит к снижению содержания ОХ на 21 и 24 %, ТГ 25 и 34% и ЛПНП 53 и 48 %, ЛПОНП снижаются на 23 и 31% соответственно, повышается содержания ЛПВП в среднем на 46% по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы. У животных, получавших испытуемый фитоэкстракт, коэффициент атерогенности был ниже, чем в контрольной группе, на 56 %. Гиполипидемическое действие СЭСБ сопоставимо с таковым препарата сравнения, хотя СЭСБ в большей степени снижает уровень ЛПНП, а канефрон более выражено снижает содержание ТГ и связанные с ним ЛПОНП.

Таблица 4

Влияние СЭСБ на перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему организма белых крыс при хроническом гломерулонефрите (60-е сутки наблюдения)

Показатели	Группы животных			
	Интактная n = 8	Контрольная (ХГН+H_2O) n = 14	Опытная 1 (ХГН+СЭСБ) n = 14	Опытная 2 (ХГН+канефрон) n=12
МДА в сыворотке крови, мкмоль/л	1,2±0,01	4,3±0,10	1,8±0,06*	1,9±0,10
МДА ткани почек, нмоль/г	2,2±0,02	4,4±0,08	2,8±0,10*	3,5±0,12
Каталаза, мкат/л	81,4±0,90	15,1±0,80	75,1±1,10*	60,4±0,88
Восстановленный глутатион, ммоль/л	0,88±0,02	0,40±0,02	1,32±0,10*	1,21±0,11

Представленные в таблице 4 данные показывают, что хронический гломерулонефрит сопровождается индукцией свободнорадикальных процессов и снижением активности антиоксидантной системы организма. Так, у животных контрольной группы концентрация МДА в сыворотке крови и гомогенате ткани почек повышается в 3,5 и 2,0 раза, активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона в крови снижаются в 5,3 и 2,2 раза соответственно, по сравнению с аналогичными показателями у животных интактной группы. Курсовое введение СЭСБ и канефрона животным опытных групп оказывает выраженное антиоксидантное действие (табл. 4), на что указывает снижение концентрации МДА в сыворотке крови (в 2,4 и 2,2 раза) и гомогенате ткани почек (в 1,6 и 1,2 раза), а также повышение активности каталазы в сыворотке крови (в 4,9 и 4,0 раза) и содержания восстановленного глутатиона в крови (в 3,3 и 3,0 раза соответственно), по сравнению с данными у животных контрольной группы. При этом СЭСБ обладает более выраженным антиоксидантным действием, чем канефрон.

Таблица 5

Влияние СЭСБ и канефрона на уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови белых крыс с хроническим гломерулонефритом (60–е сутки наблюдения)

Группы животных	ЦИК, усл. ед.
Интактная (n = 8)	25,30±1,16
Контрольная (ХГН+H_2O) (n = 14)	38,90±2,05
Опытная 1 (ХГН + СЭСБ) (n = 14)	25,67±1,14*
Опытная 2 (ХГН + канефрон) (n = 12)	26,84±1,40

На фоне введения СЭСБ и канефрона у животных опытных групп отмечается снижение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) на 34 % и 30 % соответственно по сравнению с таковым у животных контрольной группы (табл.5).

Результаты патоморфологических исследований показали, что при экспериментальном хроническом гломерулонефрите у животных контрольной группы наблюдаются выраженные нарушения микроциркуляции в виде полнокровия сосудов коркового и мозгового слоев почки и стаза эритроцитов в капиллярах. Выявляются диффузные изменения в клубочках в виде увеличения площади и гиперклеточности. Гиперклеточность в большинстве случаев связана с пролиферацией мезангиальных клеток, при этом отмечается увеличение количества эндотелиальных клеток и инфильтрация почечных клубочков лейкоцитами. В клубочках наблюдается очаговое расширение мезангия и накопления мезангиального матрикса. Капиллярные петли у большинства клубочков полнокровны и тесно прилегают друг к другу. Выявляются единичные клубочки, имеющие дольчатый (лобулярный) вид из-за пролиферации мезангиальных клеток и увеличения мезангиального матрикса. Гломерулярные базальные мембраны диффузно утолщены и часто имеют двухконтурный вид, что обусловлено проникновением отростков мезангиальных клеток на периферию капиллярных петель (интерпозиция мезангия) под эндотелием и синтезом ими компонентов внеклеточного матрикса. В результате между мезангиальными клетками и эндотелием формируется как бы дополнительная мембрана. У животных контрольной группы отмечаются выраженные дистрофические и некротические изменения клеток канальцев почек в виде гиалиново-капельной дистрофии, кариопикноза и кариолизиса. Наблюдается слущивание нефроцитов в просвет канальцев. Просветы канальцев сужены и заполнены гиалиновыми цилиндрами.

Таблица 6

Влияние СЭСБ на морфометрические показатели почек у белых крыс при хроническом гломерулонефрите (60-е сутки наблюдения)

Группы животных	Количество клубочков, %		
	«нормальных»	«пролиферативных»	«дистрофических»
Интактная	100	-	-

Контрольная (ХГН+ H_2O)	23,8	66,5	9,5
Опытная 1 (ХГН+СЭСБ)	38,7	54,7	6,7

На фоне введения СЭСБ количество увеличенных в размере клубочков снижается на 15 % по сравнению с таковым у животных контрольной группы (табл. 6). Отмечается сегментарная пролиферация мезангиальных клеток, умеренное накопление мезангиального матрикса, что ведет к сегментарному расширению мезангия. Наблюдается пролиферация эндотелиоцитов и инфильтрация капилляров лейкоцитами. Встречаются единичные гломерулы с очаговым некрозом капиллярных петель. В сохранившихся капиллярах наблюдается стаз эритроцитов.

Таблица 7

Влияние СЭСБ на морфометрические показатели почечного клубочка у белых крыс при хроническом гломерулонефрите (60-е сутки наблюдения)

Группы животных	Показатели			
	Площадь почечного клубочка, um^2	Площадь капилляров клубочка, um^2	Площадь мочевого пространства, um^2	Количество клеток в клубочке
Интактная	35596,5±738,17	25629,2±519,70	9967,3±365,5	46,5±1,63
Контрольная (ХГН+ H_2O)	37848,9±1717,8	32273,9±1197,2	6816,7±550,5	58,5±2,08
Опытная 1 (ХГН+СЭСБ)	37874,8±1717,8	28705,8±1810,8	9378,9±1039,7*	51,3±2,0*

Результаты морфометрических исследований показали (табл. 7), что на фоне введения СЭСБ площадь капилляров клубочка снижается на 11 %, общее количество клеток в клубочке – на 12 % по сравнению с таковыми показателями у животных контрольной группы. Площадь полости почечного клубочка у животных опытной группы не имеет значительных отличий от таковой у животных интактной группы.

Заключение. Таким образом, курсовое введение СЭСБ при хроническом гломерулонефрите оказывает выраженное нефропротекторное действие, о чем свидетельствует нормализация показателей морфофункционального состояния почек, липидного спектра крови, иммунного статуса и снижение активности свободнорадикальных процессов. Фармакотерапевтическая эффективность СЭСБ сопоставима, а в большинстве случаях превосходит таковую референтного препарата – канефрона.

Список литературы

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. – М., 2001. – 343 с.

2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. – СПб., 1995. – 324 с.

3. Морозов Ю.А., Марченко Т.В. Патофизиологические аспекты острого почечного повреждения // Почки. – 2012. – № 2. – С. 72–77.

4. Мухин И.В. Коррекция дислипидопротеидемии посредством системной энзимотерапии при экспериментальном гломерулонефрите // Пат. физиолог. и эксп. терапия. – 2002. – № 4. – С. 27–28.

5. Настаушева Т.Л., Ситникова В.П., Стешинская Е.В., Стахурлова Л.И. Иммуносупрессивная терапия гломерулонефрита у детей цитостатическими препаратами алкилирующего действия // Нефрология и диализ. – 2000. – № 4. – С. 23–29.

6. Перов Ю.Л. Морфометрическое изучение почки в норме и при патологии: возможности и ограничения // Архив патологии. – 1984. – Т. 46. – № 7. – С. 78–83.

7. Рябов С.И. Нефрология: Руководство для врачей. – СПб., 2000. – 672 с.

8. Akerboom T. P. M., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples // *Methods Enzymol.* 1981. V.**77**. P. 373–382.

9. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // Clinica Chimica Acta, 1991. Vol. 196, no. 2-3. P. 143–152.

10. Kaysen G.A. Lipid and Lipoprotein Metabolism in Chronic Kidney Disease // J. of Renal Nutricion. 2009. Vol. 19, no. 1. P. 73-77.