

**Э.Ф.Баринов
Х.В.Григорян
О.Н.Сулаева**

Донецкий национальный
медицинский университет
им. М.Горького

Ключевые слова: eNOS,
аллоксан, диабетическая
нефропатия.

*Надійшла: 12.10.2007
Прийнята: 10.12.2007*

УДК 599.323.4-461.2:591.26

РОЛЬ eNOS В ПАТОМОРФОЗЕ СОСУДИСТЫХ КЛУБОЧКОВ ПОЧЕК КРЫС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы «Изучить роль внутриклеточных сигнальных систем при реализации воспалительно-восстановительных процессов в органах, обеспечивающих гомеостаз организма» (№ государственной регистрации 0106U01840).

Резюме. С целью оценки роли NO в гломерулярных нарушениях при сахарном диабете (СД) через 14 суток, 1, 2 и 3 месяца после моделирования аллоксанового диабета в почках крыс с нормальной и сниженной исходной резервной активностью eNOS оценивали удельный объем нормальных, гипертрофированных и склерозированных почечных телец (ПТ). Показано, что дефицит продукции NO при СД повышает вероятность развития гломерулопатии и скорость ее прогрессирования. Коэффициент отношения удельного веса измененных (склерозированных и гипертрофированных) и нормальных ПТ может использоваться для прогнозирования течения диабетической нефропатии (ДН). Оценка резервной мощности eNOS позволяет разработать индивидуализированную тактику прогнозирования течения ДН.

Морфология.– 2008.– Т. II, №1.– С.29-32

© Э.Ф.Баринов, Х.В.Григорян, О.Н.Сулаева, 2008

Barinov E.F., Grigoryan H.V., Sulayeva O.N. The eNOS role in glomerular pathomorphosis in rat kidneys under diabetes mellitus.

Summary. To investigate the role of NO in glomerular alteration at diabetes mellitus the quantitative analysis of normal, hypertrophic and sclerotic renal corpuscles (RC) was performed in rats with normal and decreased eNOS activity after 14 days, 1, 2 and 3 months after alloxane administration. It was shown that NO deficient increase the rate of diabetic glomerulopathy development and progression. The Relation between altered (hypertrophic and sclerotic) and normal RC reflects the amount of nephrons involved in the pathogenic changes and can be used to prognoses of diabetic nephropathy (DN) development. Analysis of eNOS reserve activity allows to perform the individual strategy of DN diagnostics and treatment.

Key words: eNOS, alloxane, diabetic nephropathy.

Введение

Диабетическая нефропатия (ДН) является одной из причин длительного нарушения функции почек и развития хронической почечной недостаточности у больных сахарным диабетом (СД) (Ossman S.S., 2006). Использование морфологических методов диагностики в клинической и экспериментальной нефрологии позволило установить значимость и морфологические проявления гломерулярных нарушений при СД (Wei P. et al., 2004). Тем не менее, накопленный фактический материал не позволил приблизиться к объективной оценке степени нарушения структурно-функционального состояния почки и установлению прогностически значимых количественных и качественных показателей состояния почечных телец (ПТ). Выход из положения видится в разработке патогенетически обоснованной системы морфометрических критериев для диагностики ренальных дисфункций и прогнозирования скорости их прогрессирования. В качестве предмета исследования целесообразно использовать ПТ, учитывая их уязвимость к дейст-

вию патогенетических факторов СД и роль гломерулярного эндотелия в патогенезе диабетической нефропатии (Шишкин А.Н. 2005; Ossman S.S., 2006). Установлено, что NO, продуцируемый эндотелием, модулирует не только сосудистый тонус, но также пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и секреторную активность клеток, входящих в состав ПТ (Komers R., Anderson S., 2003). Закономерно, что дефицит продукции NO повышает риск вовлечения ПТ в патологический процесс при СД, однако механизмы и объективные морфометрические критерии глубины поражения ПТ в условиях различной исходной активности eNOS неизвестны. В этом контексте морфологические исследования целесообразно дополнять оценкой функционального состояния эндотелия.

Целью данной работы стала морфометрическая оценка состояния почечных телец у крыс с различной активностью eNOS в динамике развития ренальной дисфункции при моделировании сахарного диабета.

Материалы и методы

Работа выполнена на белых крысах самцах массой 220 ± 25 г, содержащихся в режиме свободного доступа к воде и пище. Для оценки мощности eNOS применяли ингибиторный анализ, модуляции АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в тесте *in vitro* ингибитором и стимулятором eNOS, соответственно L-NAME и L-аргинин. Для получения тромбоцитов брали кровь из хвостовой вены в пластиковую пробирку, содержащую кислый цитратдекстрозный антикоагулянт в соотношении его крови 1:6. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 200 g для получения обогащенной тромбоцитами плазмы. После ее удаления проводили дальнейшее центрифугирование в течение 10 мин при 2000 g с целью получения обедненной тромбоцитами плазмы, которую использовали для поддержания стандартного количества клеток на уровне 200 тыс/мкл. Суспензию отмытых тромбоцитов готовили в буферном растворе следующего состава (мкМ): NaCl (138), KCl (3), $MgCl_2$ (1), глюкоза (10), HEPES (10), Na_2PO_4 (0,37), р 7,4. В I-й серии к суспензии тромбоцитов прибавляли 0,1 мл физиологического раствора (контроль). Во II-й серии в пробирки вводили АДФ в концентрации, вызывающую агрегацию 50% тромбоцитов (5 мкМ). В III серии оценивали активность и резервную мощность eNOS путем введения в пробирки агониста с ингибитором (L-NAME) или стимулятором (L-аргинин) фермента соответственно. Об активности фермента судили по степени агрегационного и дезагрегационного эффектов, выраженных в процентах. Крыс распределили на три группы: с низкой, нормальной и высокой резервной мощностью eNOS. Для дальнейших экспериментов в рамках данной работы отбирали крыс с нормальной (1 группа, n=36) и сниженной (2 группа, n=24) резервной мощностью фермента.

После 18-часового голодания моделировали сахарный диабет путем введения аллоксана (16 мк/кг) в хвостовую вену животного. Показателем развития инсулярной недостаточности считали повышение уровня глюкозы в крови в пределах 12-24 ммоль/л на 14 сутки эксперимента. Уровень гликемии определяли глюкозооксидазным методом. Критерием вовлечения в патологический процесс почки считали появление протеинурии, выраженность которой оценивали через 14 суток, 1, 2 и 3 месяца, определяя ее степень (слабая, умеренная и выраженная) по показателям суточной экскреции белка с мочой (мг/сутки). Контролем служили половозрелые интактные крысы (n=10). Для морфологического исследования почки фиксировали в 10% растворе формалина на 0,1% фосфатном буфере (рН 7,4), обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Полученные срезы толщиной 5 ± 1 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по методу ван Гизона, по методу Браше, а также ставили PAS-реакцию.

30

Морфометрический анализ почек проводили с помощью квадратно-узловой тест системы, которую использовали для подсчета удельной площади (УП) ПТ в корковом веществе, а также оценки УП сосудистых клубочков (СК) и мочевого пространства капсулы в составе ПТ. Помимо этого с помощью окуляр-микрометра оценивали диаметр ПТ и СК в их составе. Исходя из диаметра и морфологических признаков (сморщивание, гиперклеточность, дольчатость) все ПТ ранжировали на три подгруппы: нормального размера, гипертрофированные и склерозированные. Подсчитывали удельный вес (УО, в %) каждого вида ПТ [1]. На основании этого рассчитывали коэффициент отношения нормальных и измененных ПТ. Полученные данные обрабатывали статистически.

Результаты исследования

В почке интактных крыс большая часть почечных телец имели нормальное строение. Часть ПТ ($7,7 \pm 0,45\%$) были с признаками склерозирования (снижение диаметра ПТ и СК в их составе, спадение капиллярных петель, гиперклеточность).

У крыс с нормальной активностью eNOS морфометрические признаки вовлечения в процесс почечных телец появлялись лишь через 1 месяц после начала эксперимента. Действие патогенетических факторов СД привело к снижению количества ПТ с нормальным строением и размерами до $81,8 \pm 1,25\%$. Это было обусловлено появлением среди кортикальной популяции нефронов гипертрофированных ПТ, чей УО составил $10,2 \pm 0,67\%$. При этом имелась тенденция к повышению доли склерозированных ПТ.

Через 2 месяца после моделирования аллоксанового диабета УО нормальных ПТ снизился на 12,84% по сравнению с предыдущим сроком. Это было связано преимущественно с нарастанием количества гипертрофированных ПТ, УО которых возрос практически в 2 раза по сравнению с предыдущим показателем, хотя УО склерозированных ПТ изменился лишь на 2,5% ($p > 0,05$).

Динамика морфометрических показателей к концу 3 месяца несколько изменилась: УО нормальных ПТ сократился до $63,5 \pm 4,23\%$, снизившись на 10,93% по сравнению с предыдущим сроком эксперимента ($p < 0,05$). При этом прирост гипертрофированных ПТ оказался ниже, чем в предыдущие месяцы, достигая 27,7% ($p < 0,01$). Интересно, что при этом наблюдалось достоверное повышение УО склерозированных ПТ на 7,3%, по сравнению с предыдущим сроком исследования ($p < 0,05$).

У крыс 2-й группы со сниженной активностью eNOS отмечена иная динамика альтеративных и компенсаторно-приспособительных процессов, развивающихся в СК при СД. Морфологические признаки вовлечения почки в патологический процесс проявлялись уже через 14 суток после введения аллоксана. Они заключались

в изменении кровенаполнения гломерулярных сосудов, появлении в ряде СК признаков диapedeза нейтрофилов, что может свидетельствовать о нарушении целостности эндотелия и развитии внутригломерулярной воспалительной реакции. Но в этот период статистически значимых изменений размеров ПТ не зарегистрировано. Через 1 месяц морфометрический анализ позволил выявить развитие гипертрофических изменений в ПТ преимущественно наружной части коркового вещества почки. УО гипертрофированных ПТ составил $16,2 \pm 0,87\%$, что оказалось на $58,82\%$ ($p < 0,01$) выше, чем у крыс с нормальной активностью eNOS. УО ПТ нормального размера снизился на $13,02\%$, и был на $7,7\%$ ниже, чем у крыс 1-й группы ($p < 0,05$).

Через 2 месяца у крыс со сниженной резервной мощностью eNOS было зарегистрировано вовлечение в патологический процесс более 40% почечных телец. УО нормальных ПТ снизился на $24,23\%$ по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$), и был на $21,96\%$ меньше, чем в 1-й группе ($p < 0,05$). При этом УО гипертрофированных ПТ возрос практически в 2 раза, что было на $76,21\%$ выше, чем в 1-й группе ($p < 0,01$). Знаменательно, что в этот период достоверно возрос УО ПТ со склеротическими изменениями, которые затрагивали от 25% до 50% объема СК. УО склерозированных ПТ составила $10,2 \pm 0,47\%$, что было на $22,89\%$ выше, по сравнению с предыдущим сроком исследования ($p < 0,05$), и превысила показатель в 1-й группе на $24,39\%$ ($p < 0,05$).

Через 3 месяца после моделирования аллоксанового диабета у крыс со сниженной активностью eNOS УО нормальных СК снизился еще более значимо – на $31,29\%$ ($p < 0,01$), в результате чего данный показатель стал на $38,11\%$ ниже, чем в 1-й группе, и на $57,42\%$ меньше, чем в здоровой почке ($p < 0,01$). Это было обусловлено увеличением УО гипертрофированных и склерозированных ПТ. При этом УО гипертрофированных ПТ вырос в меньшей степени, чем за предыдущий месяц (прирост составил $40,4\%$, $p < 0,01$), тогда как прирост УО склерозированных СК оказался максимальным за весь срок исследования, составив $46,08\%$ ($p < 0,01$). В результате этого УО гипертрофированных ПТ превысил показатель в 1-й группе на $65,34\%$, а склерозированных ПТ – на $69,32\%$ ($p < 0,01$).

Наиболее ярким диагностическим критерием оказался коэффициент отношения между ПТ, вовлеченными в патологический процесс, и ПТ с нормальным строением. У животных с нормальной резервной активностью eNOS через 1 месяц отношение измененных ПТ к нормальным выросло на $69,23\%$ по сравнению с интактными животными ($p < 0,01$). Через 2 месяца прирост составил $63,6\%$ ($p < 0,01$), в течение 3 месяцев – $58,33\%$ ($p < 0,01$). Во 2-й группе динамика вовлечения ПТ в патологический процесс при СД бы-

ла иной. Так, в течение 1-го месяца коэффициент вовлечения ПТ в патологический процесс вырос в $2,13$ раза ($p < 0,001$), что на $45,45\%$ превышало показатель в 1-й группе ($p < 0,01$). В течение 2 месяцев оцениваемый показатель возрос в $2,34$ раза, что в $2,08$ раза превышало показатель у животных с нормальной резервной мощностью eNOS ($p < 0,001$). Через 3 месяца УО гипертрофированных и склерозированных ПТ выросла в $2,05$ раза, превысив показатель в 1 группе в $2,7$ раза ($p < 0,001$). Это позволяет использовать данный критерий в качестве прогностического фактора, позволяющего судить о скорости развития и прогрессирования патологических процессов в почке при СД с учетом дефицита продукции оксида азота.

Обсуждение

Представленные в литературе данные относительно структурно-функционального состояния почки при СД позволяют сформулировать лишь общее представление о закономерностях морфогенетических событий в нефроне (Wei P. Et al., 2004; Galkina E., Ley K., 2006). При этом популярная ныне трактовка роли NO в патогенезе гломерулопатии не привела к конкретизации морфологических критериев, отражающих развитие патологического процесса в ПТ. В данном исследовании были объединены два методических подхода – морфометрическая оценка состояния ПТ и анализ резервной активности eNOS в суспензии тромбоцитов *in vitro*, что позволило впервые установить зависимость прогрессирующей гломерулопатии от степени эндотелиальной дисфункции. Проанализировано два типа изменений ПТ: увеличение – при гипертрофии (отражает развитие компенсаторно-приспособительных процессов в нефроне), и уменьшение – в результате склерозирования при альтерации СК.

У животных со сниженной резервной мощностью eNOS морфологические изменения ПТ носили более выраженный характер. При низкой продукции NO имела место прогрессирующая гипертрофия ПТ с вовлечением в патологический процесс значительной части нефронов. Одним из возможных механизмов увеличения размеров СК в ранние сроки развития ДН является изменение гломерулярной гемодинамики, когда в условиях дефицита NO и высокого уровня АнгII, повышается внутригломерулярное давление возрастает перфузия гломерулярных капилляров (Ossman S.S., 2006). В тоже время дисбаланс уровней вазоконстрикторов (Ангиотензина II, эндотелина-1, адреналина и пр.) и NO увеличивает вероятность повреждения фильтрационного барьера. Известно, что высокая концентрация АнгII является фактором токсичности для эндотелия фильтрационного барьера. Этот эффект обусловлен как прямым действием гормона на эндотелиоциты через AT_1 рецепторы, так и каскадом опосредованных событий, сопровождающихся повышением продукции ФАТ и TxB_2 , активацией ФлС, увеличением внутриклеточного

Ca²⁺ и стимуляцией окислительных процессов через НАДФ-Н-оксидазу (Wei P. et al., 2004).

Не менее важным патогенетическим фактором, влияющим на исход диабетической нефропатии, является гипертрофия мезангиальных клеток (МКл), развивающаяся в результате гипергликемии, действия продуктов гликозилирования и изменения баланса регуляторов (Шишкин А.Н., 2005). В условиях гиперперфузии, повреждения эндотелия и подоцитов происходит обнажение БМ, возрастает экспрессия молекул клеточной адгезии, усиливается продукция хемокинов и провоспалительных цитокинов, индуцирующих пролиферацию МКл (Galkina E., Ley K., 2006). В свою очередь, МКл продуцируя повышенный уровень простагландинов, вмешиваются в локальную внутригломерулярную регуляцию и контроль секреции ренина. Его результатом является гиперпродукция ренина и дальнейшее повышение уровня АнгII, обладающего провоспалительным, проагрегационным и проапатотическим эффектами, что неминуемо ведет к нарушению гломерулярной микроциркуляции и инициации воспалительного процесса в СК (Galkina E., Ley K., 2006). АнгII и эндотелин-1, усиливая тубулогломерулярную обратную связь, повышают сопряженность между степенью повреждения СК и канальцевого аппарата нефрона, что способствует реализации программы его самоуничтожения. При дефиците NO исключается возможность

ограничения негативных эффектов АнгII, эндотелина и катехоламинов на нефрон (Herrera M., Garvin J.L., 2005). Кроме того, NO оказывает ингибирующее влияние на экспрессию TGFβ, являющегося мощным фиброгенным стимулятором (Ossman S.S., 2006). Повышение уровня TGFβ в условиях дефицита NO и высокой концентрации АнгII, а также воздействие продуктов гликозилирования ведет к гиперпродукции мезангиальными клетками ГАГ и коллагена I-типа, накоплению мезангиального матрикса, сдавлению капилляров и потере подоцитов. Результатом этих событий является гломерулосклероз и уменьшение размеров, как СК, так и в целом ПТ.

Выводы

Таким образом, дефицит продукции NO при СД повышает вероятность развития гломерулопатии при СД и скорость ее прогрессирования. Использованный в работе подход количественной оценки состояния ПТ при ДН с учетом исходной резервной мощности eNOS позволяет разработать индивидуализированную тактику прогнозирования течения ДН.

Перспективы дальнейших исследований связаны с изучением ультраструктурных характеристик состояния почечных телец у крыс с различной активностью eNOS в динамике развития ренальной дисфункции при моделировании сахарного диабета.

Литературные источники

Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1991. – 382 с.

Шишкин А.Н. Дисфункция эндотелия у пациентов с прогрессирующими заболеваниями почек // Нефрология. – 2005. – Т.9, №2. – С.16-23.

Galkina E., Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy // J. Am. Soc. Nephrol. – 2006. – Vol.17. – P.368-377.

Glomerular structural and functional changes in a high fat diet mouse model of early stages Type 2 diabetes / Wei P., Lane P.H., Lane J.T., Padanilam

B.J. // Diabetologia. – 2004. – Vol.47. – P.1541-1549.

Herrera M., Garvin J.L. Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney // Hypertension. – 2005. – Vol.45. – P.1062-1070.

Komers R., Anderson S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2003. – Vol.284. – P.1121-1137.

Ossman S.S. Diabetic Nephropathy: Where We Have Been and Where We Are Going // Diabetes Spectrum. – 2006. – Vol.19. – P.153-156.

Баринев Е.Ф., Григорян Х.В., Суласва О.М. Роль eNOS в патоморфозі судинних клубочків нирок щурів за умов цукрового діабету.

Резюме. З метою оцінки ролі NO у розвитку гломерулярних порушень за умов цукрового діабету (ЦД) через 14 доби, 1, 2 і 3 місяці після моделювання алоксанового діабету в нирках щурів з нормальною (1 група) і зниженою (2 група) резервною активністю eNOS оцінювали питому вагу нормальних, гіпертрофованих і склерозованих ниркових тілець (НТ). Показано, що дефіцит продукції NO зі умов ЦД підвищує імовірність розвитку гломерулопатій та швидкість її прогресування. Коефіцієнт відносини питомої ваги змінених (склерозованих і гіпертрофованих) і нормальних НТ може використовуватися для прогнозування перебігу ДН. Оцінка резервної потужності eNOS дозволяє розробити індивідуалізовану тактику прогнозування перебігу та результату діабетичної нефропатії.

Ключові слова: eNOS, алоксан, діабетична нефропатія.