

УДК 616.613-003.7:616.151-07

## БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕЧНЫХ ТКАНЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОКСАЛАТНОМ НЕФРОЛИТИАЗЕ

<sup>1</sup> Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул<sup>2</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, г. НовосибирскЯкушев Н.Н.<sup>1</sup>, Мадонов П.Г.<sup>2</sup>, Атабаева О.Ш.<sup>1</sup>

*Целью исследования явилось изучение динамики активности  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и концентрации циклооксигеназы-1 в моче и динамики концентрации малонового диальдегида в почечной ткани крыс при экспериментальном оксалатном нефролитиазе.*

*Эксперименты проведены на 15 самцах крыс сток Вистар возрастом 2-3 месяца и весом 180-220 г. Оксалатный нефролитиаз моделировался на протяжении 6 недель в соответствии с общепринятой этиленгликолевой моделью. До начала эксперимента, а также по прошествии 3 и 6 недель производился сбор мочи, в которой определялась активность  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТ) и концентрация циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1). По завершении 6 недель в гомогенате почечной ткани определяли концентрацию тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП). Результаты экспериментов показали, что активность ГГТ в моче после 6 недель моделирования нефролитиаза увеличилась в 6,6 раза, концентрация ТБРП в гомогенате почек относительно уровня здоровых крыс увеличилась в 1,3 раза, а также наблюдалась тенденция к росту концентрации в моче ЦОГ-1 в 1,7 раза.*

*При экспериментальном оксалатном нефролитиазе наблюдается рост активности биохимических маркеров литогенеза – ГГТ и ТБРП. Это свидетельствует о развитии повреждающего фактора в почках, в основе которого лежит активация перекисного окисления липидов.*

**Ключевые слова:** оксалатный нефролитиаз,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, малоновый диальдегид, циклооксигеназа-1.

*The aim of the research was to study the dynamics of  $\gamma$ -glutamyltransferase activity and cyclooxygenase-1 concentration in urine and the dynamics of malonic dialdehyde concentration in rat kidney tissue under experimental oxalate nephrolithiasis.*

*Experiments were performed on 15 male Wistar rats aged 2-3 months and weighing 180-220 g. Oxalate nephrolithiasis was modeled for 6 weeks in accordance with the generally accepted ethylene glycol model. Prior to the start of the experiment, and after 3 and 6 weeks, urine collection was performed, in which  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) activity and cyclooxygenase-1 (COX-1) concentration were determined. At the end of 6 weeks in the homogenate of renal tissue, the concentration of thiobarbiturative products (TPBP) was determined. The results of the experiments showed that the activity of GGT in the urine after 6 weeks of nephrolithiasis simulation increased 6.6-fold, the concentration of TBP in the kidney homogenate relative to the level of healthy rats increased 1.3-fold, and there was a tendency to increase the concentration in the urine of COX-1 in 1.7 times. Experimental oxalate nephrolithiasis shows an increase in activity of biochemical markers of lithogenesis - GGT and TPBP. This indicates the development of a damaging factor in the kidneys, which is based on the activation of lipid peroxidation.*

**Key words:** oxalate nephrolithiasis,  $\gamma$ -glutamyltransferase, malonic dialdehyde, cyclooxygenase-1.

Мочекаменная болезнь по-прежнему остается одним из наиболее распространенных и тяжелых заболеваний мочевыделительной системы. Эпидемиология нефролитиаза охватывает каждого 10-го жителя развитых стран [1]. Современные представления о патогенезе нефролитиаза указывают на иницирующую роль в процессе камнеобразования так называемого «повреждающего фактора» – деструктивных изменений в структуре и функции эпителия канальцев почки, в результате которых происходит преципитация кристаллического материала из мочи на определенном участке и формируется первичный очаг литогенеза [2]. В этой

связи принято считать, что определенные сигнальные молекулы, указывающие на развитие повреждающего фактора, могут являться биохимическими маркерами литогенеза. Это может иметь важное значение не только при изучении патогенеза нефролитиаза, но и при оценке эффективности разрабатываемых способов медикаментозного лечения мочекаменной болезни.

Результаты ряда исследований свидетельствуют, что каскад реакций, провоцирующих развитие повреждающего фактора, начинается с деструкции клеточных мембран нефроцитов под влиянием движущих сил кристаллизации

[3]. Поэтому нас заинтересовало изучение динамики активности и/или содержания в почках при экспериментальном нефролитиазе  $\gamma$ -глутамилтрансферазы, малонового диальдегида и циклооксигеназы 1 типа. Как известно,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза – мембраносвязанный фермент, в большом количестве присутствующий в почках [4]. Малоновый диальдегид – основной продукт перекисного окисления мембранных фосфолипидов [5]. Циклооксигеназа-1 – фермент, участвующий в катаболизме мембранных фосфолипидов на этапе превращения арахидоновой кислоты в простагландины [6]. Эти сигнальные молекулы в значительном количестве содержатся в почках, в связи с чем потенциально могут являться биохимическими маркерами развития оксалатного нефролитиаза.

Таким образом, цель исследования – изучить динамику активности  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и концентрации циклооксигеназы-1 в моче и динамику концентрации малонового диальдегида в почечной ткани крыс при экспериментальном оксалатном нефролитиазе.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на 15 самцах крыс сток Вистар возрастом 2-3 месяца и весом 180-220 г. Исследования проводились согласно требованиям «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные на протяжении всего исследования находились в индивидуальных метаболических клетках, приспособленных для сбора мочи. Оксалатный нефролитиаз моделировался в соответствии с общепринятой этиленгликолевой моделью, согласно которой крысам на протяжении 6 недель предоставлялся в качестве питья в свободном доступе 1%-ный раствор этиленгликоля (ЭГ) [7].

До начала эксперимента, а также по прошествии 3 и 6 недель производился сбор мочи, в которой определялась активность  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГТТ) и концентрация циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1). Активность ГТТ (U/мг креатинина в сутки) определяли оптимизированным кинетическим методом на полуавтоматическом анализаторе Vitalon 400. Под действием  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в реакции переноса L- $\gamma$ -глутамил-3-карбокси- $\beta$ -нитроанилида на глицилглицин образуется окрашенный 5-амино-2-нитробензоат. Скорость увеличения оптической плотности пробы при длине волны 405 нм пропорциональна активности ГТТ в анализируемом образце. Для количественного определения циклооксигеназы-1 в моче методом иммуноферментного анализа использовали набор для определения простагландин-эндопероксид-синтетазы 1 (PTGS 1) фирмы Cloud-Clone Corp.

По завершении 6 недель моделирования нефролитиаза животных подвергли эвтана-

зии под эфирным наркозом, извлекали обе почки, одна из которых служила для определения концентрации тиобарбитуратреактивных продуктов, основным представителем которых является малоновый диальдегид, а также для проведения морфологических исследований для подтверждения процессов камнеобразования. Концентрацию тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП) в гомогенате почечной ткани определяли колориметрическим методом, измеряя интенсивность окраски раствора в ходе химической реакции ТБРП с тиобарбитуровой кислотой. Для проведения морфологических исследований почки фиксировались в 10%-ном растворе формалина, обрабатывались по стандартной методике, и изготавливался поперечный срез толщиной 6 мкм через почечный сосочек. Полученные срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Кальциевые депозиты идентифицировались гистохимическим методом Косса, и при помощи компьютерной программы на снимках подсчитывалось количество кальциевых депозитов в поле зрения и определялся их размер. Морфометрические исследования проводили с использованием программных пакетов ImageJ 1.43 и AxioVision 3.1.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерной программы «Statistica 12.0». Результаты представлены медианой (M) и интерквартильным размахом (25%, 75%) для ГТТ, ЦОГ-1 и ТБРП, а также средним значением и стандартной ошибкой среднего ( $M \pm m$ ) для морфометрических показателей. Статистические сравнения зависимых выборок проводились с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Результаты признавались достоверными при значении показателя достоверности  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов установлено, что активность ГТТ в моче к исходу 3-й недели опыта увеличилась относительно исходного уровня в 5,0 раза. В дальнейшем рост значения описываемого показателя продолжился, вследствие чего по завершении 6 недель оно уже превышало исходные цифры в 6,6 раза. На этом фоне концентрация ЦОГ-1 в моче к исходу 6-й недели периода наблюдений увеличилась относительно исходного уровня в 1,7 раза. Это изменение не было статистически достоверным и проявлялось лишь в виде тенденции (табл. 1).

Как следует из рисунка 1, концентрация ТБРП в гомогенате почечной ткани крыс с шестинедельным экспериментальным нефролитиазом составила 7,6 (7,23 ; 7,65) мкмоль, что было в 1,3 раза больше, чем у здоровых крыс – 6,1 (5,37 ; 6,91) мкмоль ( $p=0,00428$ ).

Таблица 1

Показатели активности ГГТ и концентрации ЦОГ-1 в моче при шестинедельном экспериментальном оксалатном нефролитиазе

Неделя	Активность ГГТ (U / мг креатинина в сутки)	Концентрация ЦОГ-1 (нг/мл)
Исходный уровень	0,25 (0,05 ; 0,85) n=14	3,9 (2,18 ; 5,69) n=15
3-я неделя	1,24 (0,36 ; 2,10) n=14 p=0,0231	Не определялась
6-я неделя	1,64 (0,87 ; 4,63) n=11 p=0,0166	6,6 (6,0 ; 7,4) n=10 p=0,114

Примечание: n – количество проб мочи для анализа; p – показатель достоверности изменений относительно исходного уровня.

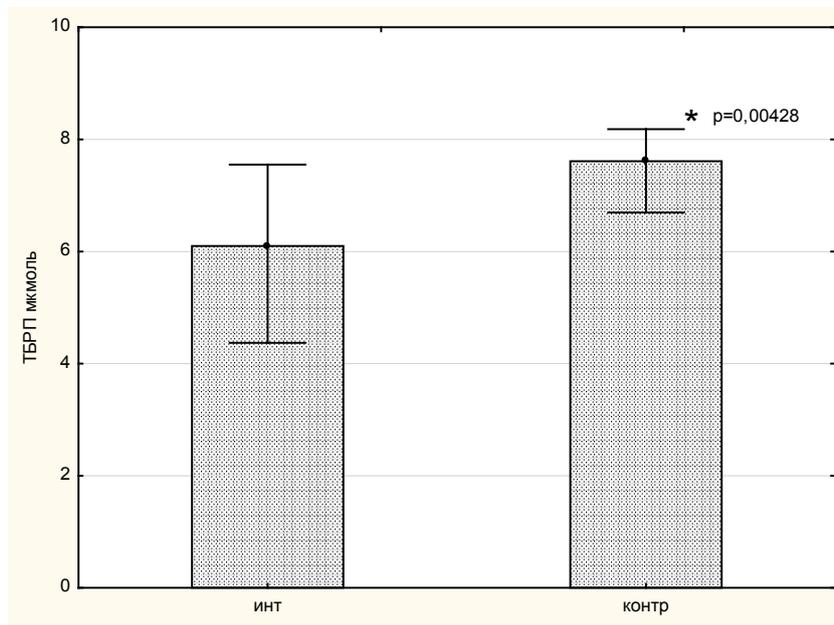


Рисунок 1 – Концентрация ТБП при экспериментальном оксалатном нефролитиазе относительно группы интактных крыс.

Примечание: инт – показатель здоровых крыс; контр – показатель крыс с нефролитиазом.

При гистохимическом окрашивании на кальций по методу Косса в канальцах почек крыс отмечали расположенные поодиночке или группами кристаллы депозитов камней коричнево-черного цвета различной формы и размера (рисунок 2). Число депозитов в просветах канальцев варьировало от 3 до 7 и в среднем составляло  $4,6 \pm 0,2$  в поле зрения при увеличении  $\times 400$ , при модальном значении 4. При проведении компьютерной морфометрии площадь депозитов камней составила от  $31,5 \text{ мкм}^2$  до  $567,9 \text{ мкм}^2$  и в среднем составляет  $171,9 \pm 27,6 \text{ мкм}^2$ .

Обсуждая полученные результаты, отметим, что в условиях смоделированного оксалатного нефролитиаза наиболее выраженному росту подверглась активность ГГТ. Как известно, ГГТ – это мембранный фермент, локализующийся

на наружной стороне мембраны многих клеток организма [4]. Поэтому, с одной стороны, увеличение его активности в моче при нефролитиазе может свидетельствовать о разрушении клеточных мембран нефроцитов и высвобождении фермента в просвет канальцев. С другой стороны, известно, что активность ГГТ – маркер оксидативного стресса в тканях организма [8]. Установлено, что важнейшей функцией ГГТ в организме является поддержание физиологической концентрации глутатиона в цитоплазме клеток, который является главным тиоловым антиоксидантом в организме [8]. Поэтому не исключено, что столь выраженный рост активности ГГТ мог являться компенсаторной реакцией на развивающийся оксидативный стресс в почечной ткани при оксалатном нефролитиазе.

Подтверждением этому можно считать зафиксированный в наших экспериментах рост концентрации ТБРП в гомогенате почечной ткани. Как известно, основным представителем ТБРП

является малоновый диальдегид – главный продукт перекисного окисления мембранных фосфолипидов [5].

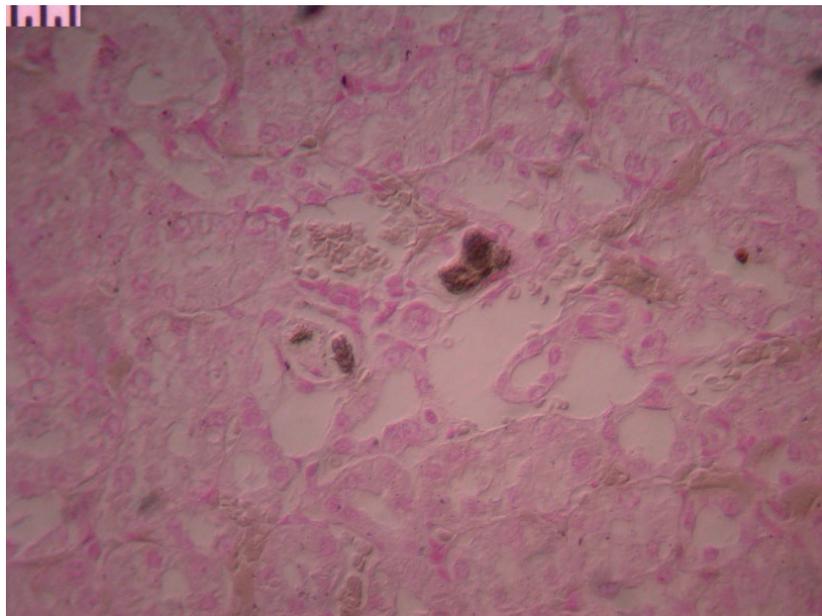


Рисунок 2 – Депозиты в канальцах почек крыс с экспериментальным оксалатным нефролитиазом. Окраска по Коссу. Увеличение  $\times 400$ .

Примечание: в поле зрения кальциевые депозиты коричневого цвета.

В дополнение следует отметить зафиксированную в наших экспериментах тенденцию к росту концентрации ЦОГ-1 в моче. Данный фермент участвует в реакции метаболизма арахидоновой кислоты до простагландина  $H_2$  – промежуточного продукта в синтезе целого ряда простагландинов [6]. Роль циклооксигеназного пути метаболизма мембранных фосфолипидов в патогенезе почечных патологий довольно сложна и многообразна. Существует мнение, что ЦОГ-1 участвует в цитопротекции, наиболее ярким примером которой является регулирование продукции защитной слизи в желудке [6]. Возможно, подобную функцию ЦОГ-1 может иметь и в почках. Однако, несомненно, этот вопрос подлежит дальнейшему углубленному изучению.

Суммируя вышеизложенное, отметим, что в условиях шестинедельного моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза были зафиксированы характерные изменения динамики биохимических маркеров развития патологии. Главным образом об этом свидетельствовал почти 7-кратный рост активности ГТТ в ходе эксперимента и достоверное увеличение концентрации ТБРП в гомогенате почечной ткани на 30%. Подтверждением развития нефролитиаза стали результаты морфологических исследований, которые показали формирование значительного количества кальциевых депозитов в канальцах почек подопытных крыс.

#### Заключение

При экспериментальном оксалатном нефролитиазе наблюдается рост активности биохимических маркеров литогенеза – ГТТ и ТБРП. Это свидетельствует о развитии повреждающего фактора в почках, в основе которого лежит активация перекисного окисления липидов.

#### Список литературы:

1. Scales C.D. Jr., Tasian G.E., Schwaderer A.L. et al. Urinary Stone Disease: Advancing Knowledge, Patient Care, and Population Health. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016. 11(7): 1305-1312.
2. Жариков А.Ю., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Лампатов В.В. Механизм формирования кристаллов при оксалатном нефролитиазе. *Нефрология*. 2009; 13(4):37-50.
3. Khan S.R. Histological aspects of the «fixed-particle» model of stone formation: animal studies. *Urolithiasis*. 2017;45(1):75-87.
4. Castellano I., Merlino A.  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:3381-94.
5. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
6. Li Y., Xia W., Zhao F., Wen Z., Zhang A., Huang S., Jia Z., Zhang Y. Prostaglandins in the

pathogenesis of kidney diseases. *Oncotarget*. 2018;9(41):26586-26602.

7. Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. **Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза.** *Нефрология*. 2008; 12(4): 28-35.

8. Ndrepera G., Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Ann Transl Med*. 2016; 4(24): 481.

#### Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Якушев Николай Николаевич, доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул. 656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126. Тел.: (3852) 566891. E-mail: yakushevnn@mail.ru

#### Информация об авторах

Мадонов Павел Геннадьевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины Новосибирского государственного медицинского университета, г. Новосибирск. 630075, г. Новосибирск, ул. Залесского, 4. Тел.: (3832) 360902.

E-mail: kaffarm@yandex.ru

Атабаева Ольга Шукуруллоевна, к.м.н., доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.

Тел.: (3852) 566891.

E-mail: science@agmu.ru