

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНИ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 599.323.4+591.26+616.379-008.64

**СНИЖЕНИЕ МЕЗАНГИАЛЬНОЙ ЭКСПАНСИИ ПРИ
ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ: ЭФФЕКТЫ
ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗЫ С**

Григорян Х.В.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

Резюме. Целью данной работы была морфометрическая оценка почечных телец при диабетической нефропатии в условиях коррекции метаболического статуса ингибитором протеинкиназы С - рубоксистаурином. Проведено морфометрическое исследование сосудистых клубочков почек крыс с различной активностью eNOS, о которой судили по результатам ингибиторного анализа, через 14 суток, 1, 2 и 3 месяца после введения аллоксана. Показано, что ингибирование ПкС корректирует программу гломерулярных изменений при СД. На ранних стадиях это обусловлено снижением степени гипертрофии и пролиферации мезангиальных клеток, а после 2-го месяца – угнетением продукции мезангиального матрикса.

Ключевые слова: диабетическая нефропатия, мезангиальные клетки, протеинкиназа С

Ключевым патогенетическим фактором развития диабетической нефропатии является нарушение фильтрационного барьера и межклеточных взаимоотношений в сосудистых клубочках (СК). Гипергликемия, конечные продукты гликозилирования, свободные радикалы кислорода являются факторами повреждения клеток гломерулы, в первую очередь – эндотелиоцитов и подоцитов, но при этом инициируют каскад изменений в гломерулярном мезангиуме: пролиферацию и секреторную активность мезангиальных клеток [6]. Одним из внутриклеточных регуляторов этих процессов является протеинкиназа С (ПкС), способная снижать активность eNOS, повышая экспрессию iNOS, p38-MAPK и NF-kB [5]. Следствием таких модуляций является инициация воспалительного процесса в гломеруле, сопровождающегося развитием протеинурии, редукцией гломерулярных капилляров и, в конечном итоге, – склерозированием СК. Выяснение роли ПкС привело к разработке новой стратегии молекулярной коррекции патогенетических событий при СД – использованию ингибиторов ПкС. Показано позитивное влияние ингибитора ПкС – рубоксистаурина (LY333531) на проницаемость фильтрационного барьера, что проявляется ограничением протеинурии, модуляцией экспрессии фиброгенных факторов и скорости

прогрессирования диабетической нефропатии в целом [4, 6]. На сегодняшний день в литературе нет информации относительно информативных критериев, характеризующих структурно-функциональное состояние почки при СД, скорость прогрессирования гломерулопатии и эффективность медикаментозной коррекции.

Целью данной работы является морфометрическая оценка почечных телец при диабетической нефропатии при коррекции метаболического статуса ингибитором протеинкиназы С.

Материал 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, основанный на модуляции АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов [2]. Использовали суспензию отмытых тромбоцитов в концентрации 200 тыс клеток в 1 мл. 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 комбинации АДФ 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 (n=52) 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). Животных с низкой исходной резервной мощностью eNOS разделили на две группы: без коррекции (2 группа, n=24) и с введением ингибитора протеинкиназы С – рубоксистаурина в дозе 10 мг/кг (3 группа, n=28; животные получали препарат с 14-х суток после моделирования СД). Контролем служили половозрелые интактные

крысы (n=10). Для морфологического исследования почки фиксировали в 10% растворе формалина на 0,1% фосфатном буфере (рН 7,4), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Полученные срезы толщиной 5 ± 1 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также ставили PAS-реакцию. Морфометрический анализ почек проводили с помощью квадратно-узловой тест системы [1], которую использовали для подсчета удельной площади (УО) ПТ в корковом веществе, а также оценки УО сосудистых клубочков (СК) и мочевого пространства капсулы в составе ПТ. Помимо этого с помощью окуляр-микрометра оценивали диаметр ПТ и СК в их составе. В составе СК определяли УО гломерулярных капилляров и мезангиума. Полученные данные обрабатывали статистически [3].

Результаты и их обсуждение

При моделировании СД у крыс экспериментальных групп изменение морфологии почечных телец отмечалось уже с 14-х суток после введения аллоксана. Это проявлялось увеличением размера ПТ за счет роста УО гломерулярных капилляров вследствие гиперперфузии сосудистых клубочков. В отдельных ПТ гипореактивных крыс на фоне гломерулярной вазодилатации отмечалось набухание цитоплазмы эндотелиоцитов, диапедез нейтрофилов.

Через 1 месяц после введения аллоксана отмечены выраженные межгрупповые различия в морфологии ПТ. Так, абсолютный объем ПТ у крыс с низкой исходной резервной мощностью eNOS был на 15,21% больше, чем у нормореактивных крыс ($p < 0,05$). При этом УО капилляров в СК крыс 2-й группы, несмотря на выраженный прирост до $46,2\pm 1,8\%$, оказался на 16,46% ниже, чем у нормореактивных животных ($p < 0,05$). В этих условиях фактором, ведущим к столь выраженной гипертрофии у животных 2-й группы оказалась экспансия мезангиума. Так, УО мезангиума в СК гипореактивных крыс в течение 1 месяца после моделирования СД увеличился на 37,23%, тогда как в 1-й группе прирост этого показателя составил 18,79% ($p < 0,01$). При этом активация мезангиума у крыс 1-й группы была связана с гипертрофией мезангиальных клеток, тогда как во 2-й группе имело место сочетание процессов гипертрофии и пролиферации клеток мезангиума. У гипореактивных крыс, получавших ингибитор ПкС, выраженность гипертрофии ПТ оказалась сравнимой с таковой у крыс 1-й группы, при этом абсолютный объем ПТ был на 11,32% ниже, чем у животных 2-й группы. При выяснении механизмов этого действия ингибитора ПкС было выяснено, что данный эффект в первую очередь связан со

снижением пролиферации мезангиальных клеток. Так, УО мезангиума оказался на 9,28% ниже, чем во 2-й группе ($p < 0,05$) и не имел достоверных отличий от показателя в 1-й группе. При этом УО капилляров в СК крыс 3-й группы был на 13,93% ниже, чем у нормореактивных животных ($p < 0,05$).

Через 2 месяца после инъекции аллоксана у крыс 1-й группы размер ПТ достигал максимального значения, отличаясь от контроля на 56,74% ($p < 0,01$). При этом УО капилляров снижался на 17,18% по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$), хотя и оставался на 7,76% выше показателя в контроле ($p < 0,05$). При выяснении причинно следственных механизмов данного феномена было выяснено, что редукция гломерулярных капилляров сопровождается мезангиальной экспансией. Так, УО мезангиума вырос за прошедший месяц на 21,49% ($p < 0,05$), превысив аналогичное значение у интактных животных на 44,32% ($p < 0,01$). Эти изменения сопровождались развитием феномена гиперклеточности СК, что свидетельствует о пролиферации мезангиальных клеток. Во 2-й группе в данный срок исследования отмечалась тенденция к снижению среднего размера ПТ. Это было обусловлено развитием мезангиосклероза в ряде СК, что проявлялось редукцией гломерулярных капилляров. Так УО капилляров снизился на 21,86% ($p < 0,05$) по сравнению с предыдущим сроком исследования и оказался на 15,05% ниже, чем в контроле ($p < 0,05$). При этом УО мезангиума за истекший месяц возрос на 24,14% ($p < 0,01$) и на 65,96% ($p < 0,01$) превышал показатель у интактных крыс. В 3-й группе за прошедший месяц средний размер ПТ статистически значимо не менялся. При этом УО капилляров снизился на 16,39%, а УО мезангиума возрос на 19,98% ($p < 0,05$). При сравнении с данными во 2-й группе оказалось, что ингибирование ПкС снижает редукцию гломерулярных капилляров на 10,24% а мезангиальную экспансию на 12,39%. Это, вероятно связано с нивелированием патогенетических эффектов гипергликемии, ангиотензина II, эндотелина-1 и других факторов, оказывающих цитотоксическое действие на эндотелий и подоциты, но стимулирующих активность и пролиферацию мезангиальных клеток [4, 6].

Через 3 месяца во всех группах отмечено развитие склеротических процессов в СК. При этом максимальная выраженность гломерулосклероза была зарегистрирована у крыс 2-й группы. У них объем ПТ снижался на 22,91% по сравнению с предыдущим сроком и был на 13,95% ниже, чем у нормореактивных крыс ($p < 0,05$). При этом УО капилляров снижался на 16,62% а УО мезангиума возрастал на

21,36% ($p < 0,05$). Данні показателі оказались відповідно на 29,42% нижче ($p < 0,01$) і 101,4% вище контролю ($p < 0,001$) на 22,67 і 16,39% отличались от аналогічних показателів у нормореактивних крыс ($p < 0,05$). Введення інгібітора ПкС предотвращало столь выраженное изменение структуры СК. Так, абсолютный объем ПТ у крыс 3-й группы был на 18,92% ($p < 0,05$) ниже, чем у животных 2-й группы и не отличался статистически значимо от показателя в 1-й группе. При этом УО гломерулярных капилляров был на 17,61% выше, чем во 2-й группе, на 8,29% ниже, чем у нормореактивных крыс ($p < 0,05$). Эти изменения были связаны со снижением мезангиальной экспансии: так УО мезангиума был на 19,19% и 5,94% ниже, чем во 2-й и 1-й группах соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, інгібіторование ПкС корригує програму гломерулярних змін при СД. На ранніх стадіях це обумовлено зниженням ступені гіпертрофії і проліферації мезангіальних кліток, а після 2-го місяця – угнетением продукції мезангіального матрикса. Вияснення механізмів саногенетических ефектів інгібування ПкС дозволить удосконалити тактику лічення нефропатій різного генеза.

ЛІТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина.– 1991. – 382 с.
2. Баринов Э.Ф., Романенко В.Н., Бондаренко Н.Н., Барина М.Э., Ковальчук Н.В., Свистунов И.В. Использование теста агрегации тромбоцитов *in vitro* для оценки адренореактивности организма // Лабораторная диагностика.– 1999.– № 4.– С. 39-42.
3. Лях Ю.Е., Гурьянов В.Г., Хоменко В.Н., Панченко О.А. Основы компьютерной биостатистики.– Д., 2006.– 211 с.
4. Feletou M., Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*– 2006. – Vol. 291, № 3.– P. 985 - 1002.
5. Li H., Wallerath T., Munzel T., Forstermann U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs // *Nitric Oxide.*– 2002.– Vol. 7, № 3.– P. 149-164.
6. Ossman S.S. Diabetic Nephropathy: Where We Have Been and Where We Are Going // *Diabetes Spectrum.*– 2006.– Vol. 19. – P. 153-156

ОБМЕЖЕННЯ МЕЗАНГІАЛЬНОЇ ЕКСПАНСІЇ ЗА УМОВ ДІАБЕТИЧНОЇ НЕФРОПАТІЇ: ЕФЕКТИ ІНГІБІТОРА ПРОТЕЇНКІНАЗИ С

Григорян Х.В.

Резюме. Метою даної роботи була морфометрична оцінка ниркових тілець за умов діабетичної нефропатії та корекції метаболічного статусу інгібітором протеїнази С. Проведено морфометричне дослідження судинних клубочків нирок щурів з різною активністю eNOS, про яку судили за результатами

інгібіторного аналізу через 14 діб, 1, 2 і 3 міс після введення аллоксана. Показано, що пригнічення активності ПкС модулює програму гломерулярних змін за умов цукрового діабету. На ранніх стадіях це обумовлено зниженням ступеня гіпертрофії та проліферації мезангіальних клітин, а після 2-го місяця – пригніченням продукції мезангіального матрикса.

Ключові слова: діабетична нефропатія, мезангіальні клітини, протеїнкіназа С

REDUCTION OF MESANGIAL EXPANSION UNDER THE DIABETIC NEPHROPATHY: EFFECTS OF PROTEIN KINASE C INHIBITION

Grigoryan H.V.

Summary. The aim of this work was to estimate the morphofunctional state of kidney glomeruli during diabetic nephropathy under the correction of metabolism by protein kinase C inhibitor administration. The morphometric investigation of glomeruli in kidneys of rats with different activity of eNOS, which was estimated by the results of inhibitory analysis, after 14 days, 1, 2 and 3 months after alloxan injection. It was shown that inhibition of protein kinase C modulates the program of glomerular changes under the diabetes mellitus. At the early stage it was due to decrease of mesangial cells hypertrophy and proliferation, and after 2nd month effect was related with inhibition of mesangial matrix production.

Key words: diabetic nephropathy, mesangial cells, protein kinase C