

**СОДЕРЖАНИЕ АМИНОТИОЛОВ У КРЫС С ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫМ
ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПОЧЕК В СОЧЕТАНИИ С РТУТНОЙ НЕФРОПАТИЕЙ**

В.А. ГАДИЕВА^{*,**}, В.Б. БРИН^{*,**}

^{*} ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России,
ул. Пушкинская, д. 40, г. Владикавказ, 362025, РСО-Алания, Россия, e-mail: Gadievava1976@mail.ru
^{**} ФГБУН «Институт биомедицинских исследований» – филиал Владикавказского научного центра РАН,
ул. Пушкинская, д. 47, г. Владикавказ, 362025, РСО-Алания, Россия

Аннотация. Реоксигенизация ишемической почки приводит к дополнительным повреждениям тканей. При этом механизмы, опосредующие клеточное повреждение, вызываемое нефротоксинами и ишемией схожи. Ишемически-реперфузионное повреждение почек моделировали на крысах самцах линии *Wistar* массой 180-320 грамм в 2 группах: первая – 10 крыс без предварительной ртутной интоксикации, вторая – 21 крыса с хроническим ртутным отравлением путем подкожного введения хлорида ртути в дозе 0.01 мг на 100 гр. веса. в течении 6-8 недель. Определение общих аминотиолов плазмы осуществляли по методике разработанной в лаборатории НИИ общей патологии и патофизиологии. Группу контроля составили 5 животных, которым выполняли все этапы операции, до наложения лигатуры. Концентрацию креатинина в моче и плазме крови, общего белка в моче определяли спектрофотометрически. Статистическая обработка результатов исследования, проводилась параметрическими и непараметрическими методами статистики в программе *Microsoft Excel* с надстройкой *AtteStat 12* с применением критериев Крамера-Уэлча и Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова. При сравнении уровня аминотиолов ложнооперированных и животных с ишемией-реперфузией различия по цистеину и глутатиону оказались достоверными. Если содержание общего гомоцистеина отличалось незначительно, то уровень цистеина и глутатиона увеличивался в группе с ишемией-реперфузией по сравнению с ложнооперированными и значительно снижался в группе с ишемией-реперфузией на фоне ртутной нефропатии. Корреляционный анализ взаимосвязи процессов мочеобразования и содержания общих аминотиолов в группе ложнооперированных выявил корреляции между уровнем реабсорбции и содержанием цистеина в плазме (коэффициент корреляции -0,88), между фильтрацией и содержанием гомоцистеина в плазме (0,95). Корреляции этих показателей в группе с ртутной нефропатией не выявлено.

Ключевые слова: аминотиолы, ишемия-реперфузия, ртутная нефропатия.

**CONTENT OF AMINOTHIOLS IN RATS WITH ISCHEMIA-REPERFUSION
KIDNEY DAMAGE IN COMBINATION WITH MERCURY NEPHROPATHY**

V.A. GADIEVA^{*,**}, V.B. BRIN^{*,**}

^{*} FSBEI of HE "North Ossetian State Medical Academy" of the Ministry of Health of Russia,
Pushkinskaya Str., 40, Vladikavkaz, 362025, RNO-Alania, Russia, e-mail: Gadievava1976@mail.ru
^{**} FSBI "Institute of Biomedical Research" - Branch of the Vladikavkaz Scientific Center of the Russian
Academy of Sciences, Pushkinskaya Str., 47, Vladikavkaz, 362025, North Ossetia-Alania, Russia

Abstract. Reoxygenation of the ischemic kidney leads to additional tissue damage. However, the mechanisms that mediate cellular damage caused by nephrotoxicity and ischemia are similar. Ischemic-reperfusion kidney damage was modeled on male *Wistar* rats weighing 180–320 grams in 2 groups: the first was 10 rats without prior mercury intoxication, the second was 21 rats with chronic mercury poisoning by subcutaneous administration of mercury chloride at a dose of 0.01 mg per 100 g. weight in 6-8 weeks. Determination of total plasma aminothiols was carried out according to the method developed in the laboratory of the Research Institute of General Pathology and Pathophysiology. The control group consisted of 5 animals, in which all stages of the operation were performed, before the ligature was applied. The concentration of creatinine in the urine and blood plasma, total protein in the urine was determined by spectrophotometry. Statistical processing of the research results was carried out using parametric and non-parametric statistical methods in *Microsoft Excel* with the *AtteStat 12* add-on and the Kramer-Welch and Mann-Whitney, Kolmogorov-Smirnov criteria. In sham-operated animals and animals with ischemia-reperfusion, comparison of the level of aminothiols showed differences in cysteine and glutathione. The content of total homocysteine differed slightly, but the level of cysteine and glutathione increased in the group of animals with ischemia-reperfusion compared with the group of sham-operated animals. The same level significantly decreased in the group of animals with ischemia-reperfusion on the background of mercury nephropathy. A correlation analysis of the relationship between urine formation processes

and total aminothiols in a group of sham-operated animals revealed correlations between plasma reabsorption and plasma cysteine (correlation coefficient -0.88), between filtration and plasma homocysteine (0.95). Correlation of these indicators in the group with mercury nephropathy was not detected.

Keywords: aminothiols, ischemia-reperfusion, mercury nephropathy.

Введение. Почки в силу своих анатомо-физиологических особенностей весьма чувствительны к ишемически-реперфузионному повреждению [7, 8]. Ишемия почки с последующим восстановлением кровотока является основной причиной острого почечного повреждения. Данное состояние развивается при травмах, обезвоживании и сепсисе, при кардиохирургических вмешательствах. Когда длительность ишемии превышает определенный порог, запасы внутриклеточного АТФ истощаются, и клетки умирают либо от апоптоза, либо от некроза [5, 6]. В то время как восстановление адекватной почечной перфузии является основной терапевтической целью, быстрая реоксигенизация ишемической почки приводит к дополнительным повреждениям тканей [4, 9]. Механизмы, опосредующие клеточное повреждение, вызываемое нефротоксинами и ишемией схожи. Тяжелые металлы обладают потенциалом к образованию высокореактивных химических образований, таких как свободные радикалы, обладающие способностью вызывать перекисное окисление липидов, повреждение ДНК, окисление сульфгидрильных групп белков [8, 9]. Проявления индуцированной ртутной нефропатии изучались в многочисленных экспериментах [10, 11]. Установлено, что хлорид ртути в первую очередь поражает канальцевый аппарат почек, вызывая тубулярный некроз, гломерулярный склероз и инфильтрацию интерстиция воспалительными клетками. [1]. Известно, что при окислительном стрессе и вызываемой им гибели клеток инициируются, помимо относительно простых биохимических процессов, мощные регуляторные перестройки. Состояние живых клеток полностью зависит от редокс-статуса их внутренней среды. Термин редокс пара обозначает существование в клетке определенного соединения одновременно в окисленном и восстановленном состояниях, причем переход из одного состояния в другое обратим [5, 6]. Важным клеточным редокс-показателем является соотношение окисленной и восстановленной форм серосодержащих аминокислот: цистеина, гомоцистеина и трипептида глутатиона. Многие о точных взаимодействиях редокс-регуляции клетки до сих пор остается неизвестным.

Цель исследования – изучение содержания аминокислот при ишемически-реперфузионном повреждении почек у крыс в сочетании с хронической ртутной нефропатией.

Материалы и методы исследования. Уход за крысами и проведение экспериментов осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики». Анестезиологическое пособие включало: препарат *Zoletil* -100-средство для общей анестезии. Эффект наступал в среднем через 5-7 минут. Продолжительность наркоза составляла 30-60 минут. Препарат вводился внутривенно, в дозе 0,5 мг/кг массы тела крысы. Ишемически-реперфузионное повреждение почек моделировали на крысах самцах линии *Wistar* массой 180-320 грамм в 2 группах: первая – 10 крыс без предварительной ртутной интоксикации, вторая – 21 крыса с хроническим ртутным отравлением. У всех животных была проведена операция по созданию ишемии правой почки с последующей ее реперфузией и нефрэктомия левой почки. Во время операции температура тела поддерживалась на уровне 36,5-37 °C с помощью нагревательной платформы «флогистон». Осуществлялся поясничный доступ с рассечением кожи, подкожно-жировой клетчатки. После раздвижения мышц тупым способом почка становилась доступной для проведения операции. Выделяли сосудистый пучок, на который и накладывалась лигатура. Время ишемии составляло 20 минут, после чего лигатура снималась, и происходило восстановление кровотока в почке. После периода реперфузии, составляющего 25 минут, производили забор крови для определения общих аминокислот плазмы. Пробоподготовку, хранение и анализ с использованием капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии осуществляли по методике разработанной в лаборатории НИИ общей патологии и патофизиологии [3]. Определяли содержание *цистеина* (ЦИС), *гомоцистеина* (ГЦИС) и *глутатиона* (ГЛН) в мкМ. Ртутную нефропатию у 21 крыс моделировали путем подкожного введения хлорида ртути в дозе 0.01 мг на 100 гр.веса. в течении 6-8 недель. Группу контроля составили 5 животных, которым выполняли все этапы операции, до наложения лигатуры.

Концентрацию креатинина в моче и плазме крови, общего белка в моче определяли спектрофотометрически.

Статистическая обработка результатов исследования, проводилась параметрическими и непараметрическими методами статистики в программе *Microsoft Excel* с надстройкой *AtteStat* 12 с применением критериев Крамера-Уэлча и Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова.

Результаты и их обсуждение. В группе с ртутной интоксикацией через месяц ежедневного подкожного введения ртути отмечались судороги в мышцах конечностей, слабость, диарея, увеличение диуреза. К концу эксперимента из 25 крыс 4 крысы погибли. Накануне операции крыс первой и второй групп помещали в метаболические клетки на 6 часов для определения объема спонтанного диуреза. При

этом у животных с хронической интоксикацией сулемой развивалась полиурия и массивная протеинурия.

Таблица 1

Влияние подкожного введения хлорида ртути в дозе 0,1 мг/кг на основные процессы мочеобразования и экскрецию белка с мочой ($M \pm m$)

Условия опыта	Диурез	Фильтрация	Реабсорбция	Белок
	Среднее значение \pm стандартное отклонение			
Ложноопер. $n=5$	0,092 \pm 0,01	16,73 \pm 0,38	99,44 \pm 0,08	0,076 \pm 0,003
Ртутная нефропатия $n=21$	0,181 \pm 0,04*	18,72 \pm 1,38*	99,33 \pm 0,06*	3,21 \pm 0,39*

Примечание: * – По критерию Крамера–Уэлча достоверность различий по сравнению с ложнооперированными не менее 99%

Полиурия была обусловлена ростом скорости клубочковой фильтрации и некоторым снижением канальцевой реабсорбции воды. Наши результаты согласуются с данными других исследований [2]. При сравнении уровня аминокислот ложнооперированных и животных с ишемией-реперфузией различия по цистеину и глутатиону оказались достоверными. Если содержание общего гомоцистеина отличалось незначительно, то уровень цистеина и глутатиона увеличивался в группе с ишемией-реперфузией по сравнению с ложнооперированными и значительно снижался в группе с ишемией-реперфузией на фоне ртутной нефропатии. Это можно объяснить тем, что транссульфурация гомоцистеина с образованием цистеина чувствительна к текущему окислительному статусу, прооксиданты смещают равновесие процесса в сторону образования цистеина, а антиоксиданты наоборот. Прирост глутатиона и цистеина при ишемически реперфузионной патологии почек можно рассматривать как защитную реакцию, направленную на увеличение антиоксидантной защиты, тогда как в условиях ртутной интоксикации эта защитная реакция оказывается резко подавленной.

Таблица 2

Содержание аминокислот в плазме ложнооперированных крыс (I группа)

	ЦИС	ГЛН	ГЦИС
Медиана	95,0	16,1	8,4
25% перцентиль	88,0	14,8	7,7
75% перцентиль	96,0	17,3	11,2

Таблица 3

Содержание аминокислот в плазме крыс с ишемией-реперфузией (II группа)

	ЦИС	ГЛН	ГЦИС
Медиана	125,02	24,95	4,82
25% перцентиль	120,16	21,20	3,25
75% перцентиль	134,22	29,54	6,91

Таблица 4

Содержание аминокислот в плазме крыс в III группе с ишемией-реперфузией в сочетании с ртутной нефропатией

	ЦИС	ГЛН	ГЦИС
Медиана	33,34	3,65	3,81
25% перцентиль	26,32	2,67	2,62
75% перцентиль	38,22	5,30	7,40

Сравнение групп проводилось с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова и параметрического критерия Крамера–Уэлча (табл. 5). Выявлены отличия по содержа-

нию цистеина и глутатиона в первой и второй группах и во второй и третьей группах (достоверность 99%). Что касается уровня гомоцистеина, то отличие в первой и второй группах составило 95%, тогда как во второй и третьей группах отличий по концентрации гомоцистеина не выявлено.

Таблица 5

Сравнение групп экспериментальных животных по уровню общих аминотиолов

	ЦИС		ГЛН		ГЦИС	
	статистика	P-значение	статистика	P-значение	статистика	P-значение
I и II группы						
Критерий Манна-Уитни	50	0,0022**	45	0,014**	42	0,037*
Критерий Колмогорова-Смирнова	1	0,005**	0,8	0,05	0,7	0,15*
Критерий Крамера-Уэлча	4,48	0,0007**	3,71	0,002**	2,47	0,01*
II и III группы						
Критерий Манна-Уитни	210	9,12E-0,6**	210	9,12E-0,6**	115	0,67
Критерий Колмогорова-Смирнова	1	5,22E-0,6**	1	5,22E-0,6**	0,22	0,25
Критерий Крамера-Уэлча	11,98	3,2E-0,7**	8,86	7,27E-0,6**	0,55	0,58

Корреляционный анализ процессов мочеобразования с уровнем общих аминотиолов в группе ложнооперированных выявил взаимосвязь между процессом реабсорбции и содержанием цистеина в плазме (коэффициент корреляции равен 0,88 и значим на уровне 95%), между фильтрацией и количеством гомоцистеина в плазме. Значимых корреляций этих показателей в группе с ртутной нефропатией не выявлено.

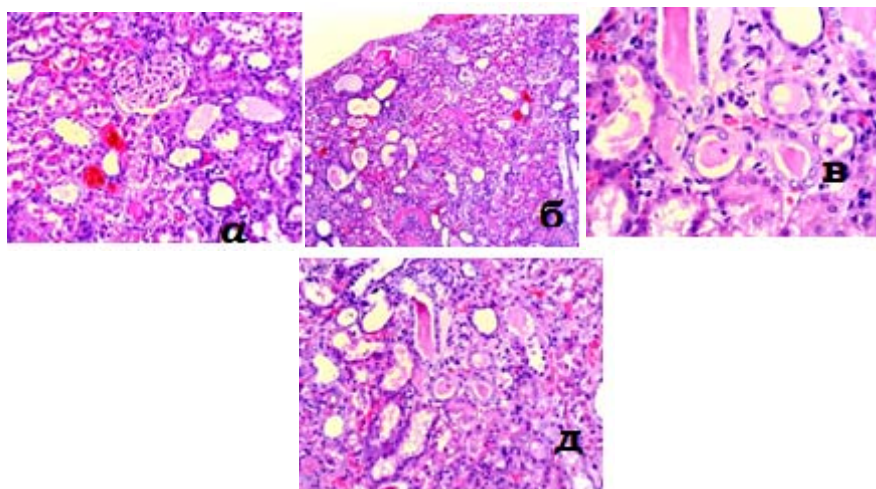


Рис. Гистопатологическое исследование почки с сочетанным нефротоксическим и ишемически-реперфузионным повреждением. Окраска гематоксилин эозином. 200× кратное увеличение.
Объяснения в тексте

Для проведения гистологических исследований готовили ультратонкие срезы толщиной 5-7 мкм. Материалом служили почки с сочетанным нефротоксическим и ишемически-реперфузионным повреждением, которые сразу после забора фиксировались в забуференном 10% формалине. Затем образцы обезживались в растворе этанола, пропитывались парафином и окрашивались гематоксилином-эозином. Срезы готовились на стандартном микротоме и исследовались при 100×, 200× и 400× кратном увеличении с помощью светового микроскопа «Carl Zeiss Axio Lab A1», на котором также были получены цифровые электронные микрофотографии. Отмечалось выраженное венозное и капиллярное полнокровие коркового и мозгового слоев, полнокровие капилляров клубочков и стаз в отдельных сосудах (ри-

сунок а). При этом гидропическая дистрофия эпителия проксимальных и дистальных канальцев была различной степени выраженности, часть канальцев была представлена клетками с лизированными ядрами (рисунок б). В просвете значительного числа канальцев наблюдались гиалиновые цилиндры и слущенный эпителий, строма с очаговой слабой мононуклеарной и эозинофильной инфильтрацией (рисунок в и д).

Заключение. В клинической практике ишемии чаще подвергается пораженный заболеванием орган с наличием хронического процесса и со сниженной функциональной способностью. В нашем исследовании хроническое ртутное повреждение привело к развитию токсической нефропатии, а острая ишемия с последующей реперфузией усугубила нарушения в системе прооксидантов и антиоксидантов. Сложный характер изменений содержания аминокислот возможно связан с генерализованной активацией адаптивных нейрогуморальных систем. В настоящее время хорошо известна важная роль тиольных веществ в жизнедеятельности клеток. Тиолы входят в состав активных центров ферментов, играют важную роль в обеспечении проницаемости внутриклеточных мембран, являются одним из компонентов, определяющих величину стационарного окислительно-восстановительного равновесия в клетках и тканях; тиолы необходимы для формирования третичной структуры белков. Цистеин играет роль антиоксиданта, вступая в реакции окисления-восстановления. Тиоловая группа имеет высокое сродство к тяжелым металлам. Считается, что ионы ртути, связываясь с тиоловыми группами транспортного белка, фильтруются гломерулами, а затем реабсорбируются нефротелием преимущественно начального отдела проксимального канальца.

Литература

1. Брин В.Б., Кокаев Р.И., Бабаниязов Х.Х., Пронина Н.В. Профилактические эффекты ацизола на фоне длительной сулемовой интоксикации // Вестник новых медицинских технологий. 2010. Т.17, №1. С. 26–28.
2. Бузоева М.Р. К вопросу о нефротоксичности хлорида ртути на фоне измененного кальциевого гомеостаза // Вестник новых медицинских технологий. 2017. Т.24, №3. С. 116–119.
3. Иванов А.В. Разработка аналитических методов фракционного исследования гомоцистеина и других аминокислот плазмы крови для оценки ишемических повреждений головного мозга: дисс... к.м.н. Москва, 2015. 127 с.
4. Sabbahy E.M., Vaidya V.S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 2011. № 3 (5). P. 606–618. DOI: 10.1002/wsbm.133.
5. 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. № 19 (15). P. 2776–2794.
6. Zynab Karimi, Farzaneh Ketabchi, Nasim Alebrahimdehkhordi, Hossein Fatemikia, Seyed Mohammad Owji & Seyed Mostafa S. Moosavi: Renal ischemia/ reperfusion against nephrectomy for induction of acute lung injury in rats // Renal Failure. 2016. №3. P. 1503–1515.
7. Fatemikia H., Ketabchi F., Karimi Z., Moosavi S.M. Distant effects of unilateral renal ischemia/reperfusion on contralateral kidney but not lung in rats: The roles of ROS and iNOS // Can J Physiol Pharmacol. 2016. № 94. P. 447–487.
8. Florence L. Johnson, Inhibition of IκB Kinase at 24 Hours After Acute Kidney Injury Improves Recovery of Renal Function and Attenuates Fibrosis // J Am Heart Assoc. 2017. № 6(7). P. 1–15.
9. Willem G van Rijt, Gertrude J Nieuwenhuijs-Moeke, Renoprotective capacities of non-erythropoietic EPO derivative, ARA290, following renal ischemia/reperfusion injury // J Transl Med. 2013. № 11. P. 286.
10. Whalen H., Shiels P., Littlejohn M., Clancy M. A novel rodent model of severe renal ischemia reperfusion injury // Ren Fail. 2016. №38(10). P. 1694–1701.
11. Lash L.H., Cummings B.S. Mechanisms of toxicant-induced acute kidney injury. Comprehensive toxicology – renal toxicology. Oxford: Elsevier, 2010. P. 81–116.

References

1. Brin VB, Kokaev RI, Babanijazov HH, Pronina NV. Profilakticheskie jeffekty acizola na fone dlitel'noj sulemovoj intoksikacii [Preventive effects of alzoala on the background of long sublimate intoxication]. Vestnik novyh medicinskih tehnologij. 2010;17(1):26-8. Russian.
2. Buzoeva MR. K voprosu o nefrotoksichnosti hlorida rtuti na fone izmenennogo kal'cievogo gomeostazisa [On the issue of nephrotoxicity of mercury chloride on the background of a modified calcium homeostasis]. Vestnik novyh medicinskih tehnologij. 2017;24(3):116-9. Russian.
3. Ivanov AV. Razrabotka analiticheskikh metodov frakcionnogo issledovanija gomocisteina i drugih aminotiolov plazmy krovi dlja ocenki ishemicheskikh povrezhdenij golovnogo mozga [The development of ana-

lytical methods for the fractional study of homocysteine and other aminothiols in blood plasma for the assessment of ischemic brain damage][dissertation]. Moscow; 2015. Russian.

4. Sabbahy EM, Vaidya S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 2011;3(5):606-18. DOI: 10.1002/wsbm.133.

5. Rodriguez F, Bonacasa B, Fenoy FJ, Salom MG. Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. Curr. Pharm. Des. 2013;19(15):2776-94.

6. Zynab Karimi, Farzaneh Ketabchi, Nasim Alebrahimdehordi, Hossein Fatemikia, Seyed Mohammad Owji & Seyed Mostafa S. Moosavi: Renal ischemia/ reperfusion against nephrectomy for induction of acute lung injury in rats. Renal Failure. 2016;3:1503-15.

7. Fatemikia H, Ketabchi F, Karimi Z, Moosavi SM. Distant effects of unilateral renal ischemia/reperfusion on contralateral kidney but not lung in rats: The roles of ROS and iNOS. Can J Physiol Pharmacol. 2016;94:447-87.

8. Florence L. Johnson, Inhibition of IκB Kinase at 24 Hours After Acute Kidney Injury Improves Recovery of Renal Function and Attenuates Fibrosis. J Am Heart Assoc. 2017;6(7):1-15.

9. Willem G van Rijt, Gertrude J Nieuwenhuijs-Moeke, Renoprotective capacities of non-erythropoietic EPO derivative, ARA290, following renal ischemia/reperfusion injury. J Transl Med. 2013;11:286.

10. Whalen H, Shiels P, Littlejohn M, Clancy M. A novel rodent model of severe renal ischemia reperfusion injury. Ren Fail. 2016;38(10):1694-701.

11. Lash LH, Cummings BS. Mechanisms of toxicant-induced acute kidney injury. Comprehensive toxicology — renal toxicology. Oxford: Elsevier; 2010.

Библиографическая ссылка:

Гадиева В.А., Брин В.Б. Содержание аминотиолов у крыс с ишемически-реперфузионным повреждением почек в сочетании с ртутной нефропатией // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2019. №4. Публикация 3-11. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-4/3-11.pdf> (дата обращения: 28.08.2019). DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16434.*

Bibliographic reference:

Gadiev VA, Brin VB. Soderzhanie aminotiolov u kryis s ishemicheski-reperfuzionnym povrezhdeniem pochetk v sochetanii s rtutnoj nefropatiej [Content of aminothiols in rats with ischemia-reperfusion kidney damage in combination with mercury nephropathy]. Journal of New Medical Technologies, e-edition. 2019 [cited 2019 Aug 28];4 [about 6 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-4/3-11.pdf>. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16434.

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-4/e2019-4.pdf>