УДК 616.853:57.084/.085]:616.61-091:577.121.7

Колесова Н.А., Хайтович М.В., Аршиннікова Л.Л., Антоненко Л.І., Брюзгіна Т.С., Чухрай С.М., Литвиненко В.І., Сухарева Н.М., Жданова О.О.

ЗМІНИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ ТА СТРУКТУРИ НИРОК ЗА ВІДТВОРЕННЯ КОРАЗОЛОВОЇ МОДЕЛІ СУДОМНОГО СИНДРОМУ

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

Резюме. *Патоморфологічними, гістохімічними, біохімічними та електронно мікроскопічними методами дослідження в експерименті на щурах лінії Вістар (n=20) з відтворенням коразолової моделі судомного синдрому визначено основні механізми ушкодження нирок. Встановлено, що розвиток патологічних змін нирок відбувається за поєднання енергетичних зсувів та структурних змін, які відображають погіршення кровопостачання в умовах судомних нападів.*

Вступ

Судомний синдром є найбільш характерною ознакою клінічних проявів епілепсії, частота якої за останній час збільшилася серед дітей та дорослого населення земної кулі до 40 млн чоловік.

Епілептичний напад, маючи величезний вплив на всі системи організму, викликає не тільки зміни функціональних електрофізіологічних характеристик мозку, але й глибокі зрушення в різних системах підтримки життєдіяльності організму. Рядом авторів, які проводили експериментальні нейрофізіологічні дослідження, було відзначено, що під час і після епілептичного нападу в організмі відбуваються значні біохімічні зрушення, спрямовані на енергетичне забезпечення нападу, а також на забезпечення життєдіяльності організму. Експериментальний судомний напад викликає пригнічення тканинного дихання в різних відділах мозку, зміну активності різних енергетичних ферментів і енергетично багатих речовин, впливає на процеси гліколізу. Виснаження енергетичних запасів організму відбувається внаслідок необхідності компенсувати енергетичний дефіцит, що виник в результаті "енергетичного забезпечення" нападу, і в той же час внаслідок активації ендогенних протисудомних механізмів [1,2,3,4,5,6,7].

До теперішнього часу значна увага при судомному синдромі приділялась вивченню метаболізму і функції клітин мозку та активності органоспецифічних ферментів крові, але структурні, метаболічні (енергетичний обмін) зміни в життєво важливих органах при даній патології залишаються не вивченими.

Створення моделей судомних станів, адекватних клінічному еквіваленту, в даний час розглядається як один з найбільш перспективних шляхів, що дозволяє не тільки наблизитися до розкриття патофізіологічних механізмів епілептогенезу, але й розробити на їх основі способи раціональної терапії.

Вважають, що в експериментальних умовах великий епілептичний напад відповідає електрошоковому судомному синдрому, а малий – коразоловому. Стан внутрішніх органів в цих ситуаціях не досліджувався, що утруднює розробку адекватних лікувальних фармакологічних схем.

Метою дослідження було вивчення особливостей енергетичного обміну та структури нирок за відтворення коразолової моделі судомного синдрому.

Важливість вивчення стану нирок за судомного синдрому пов'язана з їхнім значенням в регуляції водно-солевого гомеостазу в організмі. Відомо, що нефрони, з яких побудована тканина нирок, володіють високою морфо-функціональною спеціалізацією, котра обумовлена тонкою структурою та фізіологічними особливостями кожного з його відділів, патологічні процеси в яких і призводять до розвитку змін функціональної активності нирок та порушення гомеостазу.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проведені на 20 щурах-самцях лінії Вістар масою 170–200 г. Судомний синдром відтворювали шляхом введення коразолу (пентилентетразол, Sigma, США) внутрішньоочеревинно в дозі 80 мг/кг (n=10).[8,9]

Рівень аденілових нуклеотидів в нирках білих щурів визначали методом високовольтного спектрофорезу на папері з наступною спектрофотометрією при довжині хвилі 260 та 290 нм. На підставі отриманих даних розраховували показники, які характеризують стан енергетичного обміну: суму аденілових нуклеотидів АТФ+АДФ+АМФ, співвідношення АТФ/АДФ, аденілатний енергетичний заряд Аткінсона (АЕЗ) за формулою

АЕЗ=(АТФ+1/2АДФ)/(АТФ+АДФ+АМФ); індекс фосфорилювання (ІФ) за співвідношенням ІФ=АТФ/(АДФ+АМФ); порівнювальний коефіцієнт (Кпор.) за формулою Кпор.=(АТФ+АМФ)/АДФ.

Гістохімічне вивчення активності окисно-відновних ферментів в нирках проводили на кріостатних зрізах свіжозамороженої тканини серця товщиною 10 мкм. Досліджували активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) за Нахласом і співав., лактатдегідрогенази (ЛДГ) за Гессом, Скарпеллі і Пірсом, а також НАД-Н ДГ та НАДФ-Н ДГ за Фарбером. Активність ферментів вивчали напівкількісним методом.

Патоморфологічне та електронномікроскопічне дослідження проведене за загальноприйнятими методиками.

Дослідження проникності клітинних мембран проводили на еритроцитах – найбільш чутливому індикаторі функціонального стану організму. Вони першими сприймають інформацію про навколишнє середовище. Тому саме їх широко використовують як скринінговий метод в якості моделі для оцінки стану мембранного апарату організму. Процеси, які відбуваються в еритроцитарній мембрані відображають аналогічні зміни в мембранах інших органів і тканин [3-7].

Вивчення жирнокислотного (ЖК) складу ліпідів тканини серця та крові проведено методом газорідинної хроматографії. Було ідентифіковано 9 найбільш інформативних ЖК: С14:0 – міристинова, С 15:0 – пентадеканова С16:0 – пальмітинова, С17:0 – маргаринова, С18:0-стеаринова, С18:1- олеїнова, С18:2- лінолева, С18:3- ліноленова, С20:4- арахідонова. Отримані зразки тканин експериментальних тварин гомогенізували у фізіологічному розчині, після чого здійснювали газохроматографічний аналіз за методикою Яницької Л.В. та ін. (2005). Піки ЖК ідентифікували шляхом порівняння з часом утримання піків стандартних ЖК. Кількісну оцінку ЖК ліпідів проводили методом нормування площин піків метилових похідних ЖК та визначали їх вміст у відсотках.

Вірогідність отриманих результатів оцінювалася за t-критерієм Ст'юдента. Результати вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Мікроскопічне вивчення змін нирок за відтворення коразолової моделі судомного синдрому показало, що в них розвивається комплекс гістохімічних та структурних змін в усіх відділах нефрона. В більшій частині клубочків кори і юкстамедулярної зони петлі капілярів з нерівномірним діаметром просвітів, частіше – помірно звужені. Ендотелій капілярів, подоцити і базальна мембрана клубочкового фільтру звичайної структури. Просвіт капсули клубочків вільний.

Епітелій канальців всіх відділів нефрона з гетерогенними ознаками патологічних змін. Більше за інші уражений епітелій звивистих канальців проксимального відділу: частина клітин з ознаками зернистої дистрофії, інші - набряклі. Ядра збільшені в діаметрі набряклі. Просвіти канальців нерівномірної ширини, щілиноподібні. Прямі відділи проксимальних канальців вистелені кубічним епітелієм, який має структурні ознаки ушкодження, подібні до епітелія звивистих канальців.

Низхідні та визхідні тонкі канальні вистелені плоскими епітеліоцитами з ознаками помірного набряку; в їх просвітах зрідка виявляється оксифільний пластівцевоподібний матеріал.

Дослідженнями встановлено, що дистальні прямі та звивисті канальні нефрона вистелені низьким циліндричним епітелієм без суттєвих дистрофічних змін; просвіти їх досить широкі. Збиральні трубочки в кірковій та мозковій частині вистелені кубічним та низьким циліндричним епітелієм переважно звичайної структури і лише вогнищево виявляються епітеліоцити з ознаками набряку цитоплазми та ядра.

Виявлені структурні зміни нефрона розвиваються на фоні більш виразного порушення енергетичного обміну його епітелію (Таблиця 1, рисунок 1).

В епітелії звивистих проксимальних канальців в нормі визначається найбільш висока активність ферментів тканинного дихання, про що свідчить висока активність СДГ – 2,5 одиниць активності. При цьому темно-сині зерна диформазану визначаються в базальному відділі цитоплазми епітеліоцитів. За відтворення коразолової моделі судомного синдрому кількість кінцевого продукту гістохімічної реакції зменшується і активність СДГ вірогідно зменшується до 2,0±0,02 одиниць активності. Паралельно, гліколітичний шлях генерації енергії підсилюється з 2,3±0,03 одиниць активності до 2,4±0,03 одиниць активності. За таких енергетичних змін тканинного дихання та гліколізу рівень термінального окиснення також вірогідно знижується з 2,6±0,01 одиниць активності в контролі до 2,4±0,01 одиниць активності, що свідчить про зменшення рівня енергетичної забезпеченості функціональної активності епітелія проксимальних канадців. Встановлені зміни є структурним і метаболічним базисом зниження рівня активного транспорту електролітів, білків,

Таблиця 1. - Гістохімічний показник активності окисно-відновних ферментів в епітелії канальців нефрона за відтворення коразолової моделі судомного синдрому (M±m;P;одиниці активності)

Група	Структура	Ферменти		
		СДГ	ЛДГ	НАД-Н ДГ
Контроль (n=7)	Ендотелій клубоч.	0,8±0,01	1,1±0,02	1,2±0,02
	Епітелій прокс. канальців	2,5±0,02	2,3±0,03	2,6±0,01
	Епітелій дист. канальців	2,3±0,03	2,2±0,02	2,5±0,02
	Епітелій петлі Генле	0,7±0,01	0,9±0,02	0,9±0,01
Коразолова модель (n=7)	Ендотелій клубоч.	0,7±0,01	1,0±0,02	1,1±0,02
	Епітелій прокс. канальців	2,0±0,02*	2,4±0,03*	2,4±0,01*
	Епітелій дист. канальців	2,0±0,03*	2,3±0,02*	2,2±0,02*
	Епітелій петлі Генле	0,6±0,01*	0,9±0,02*	0,8±0,01*

Примітка:* вірогідність (P<0,05) по відношенню до групи інтактних тварин.

глюкози і пасивного зворотного всмоктування води. Встановлені енергетичні зміни в епітелії проксимальних канальців нефрона є також метаболічним підгрунтям розвитку в ньому дистрофічних змін і функціональної неповноцінності.

В тонких канальцях нефрона енергетичні зміни проявляються в меншій мірі, що очевидно, грунтується на тому, що в цьому відділі нефрону в нормі відбувається пасивна реабсорбція води на основі різниці осмотичного тиску між сечою в канальцях та тканинною рідиною інтерстиція. Треба зазначити, що і в нормі активність ферментів різних метаболічних шляхів в його епітелії значно нижча, ніж в проксимальних і дистальних канальцях. Так, активність СДГ в контролі становить тільки 0,7±0,01 одиниць активності, а після відтворення коразолової моделі судомного синдрому вона зменшується до 0,6±0,01 одиниць активності. Значення показників гліколізу мало змінюються і активність ЛДГ становить, як і в контролі, 0,9±0,02 одиниць активності. Гістохімічні показники активності енергетичних процесів термінального окиснення зменшуються.

Такі мінімальні вірогідні зміни енергетичної забезпеченості епітелія тонкого відділу нефрона не призводить в ньому до значущих структурних змін.

Показники енергетичного обміну в епітелії дистальних прямих та звивистих канальців за моделювання коразолового судомного синдрому змінюється за такими ж закономірностями. Так, активність СДГ знижується з 2,3±0,03 одиниць активності в контролі до 2,0±0,03 одиниць активності. Темно-синій продукт кінцевої реакції рівномірно розміщений в цитоплазмі циліндричного епітелія. Показники гліколізу, про що свідчить підвищеня активності ЛДГ з 2,2±0,02 одиниць активності в контролі до 2,3±0,02 одиниць активності, наростають. А ферменти термінального окиснення (НАД-Н ДГ) вірогідно знижують свою активність.

Такий перебіг енергетичних процесів в епітелії всіх канальців нефрона, за якого рівень процесів тканинного дихання і термінального окиснення вірогідно знижується при паралельному підсиленні гліколізу, може відображати розвиток в нирках за відтворення коразолової моделі судомного синдрому тканинної гіпоксії.

Електронно-мікроскопічні дослідження конкретизували встановлені на світлооптичному рівні зміни і показали, що після відтворення коразолової моделі судомного синдрому в усіх структурних компонентах нирки наявні морфологічні ознаки контракції. Просвіт гломерулярних капілярів або звужений, або заповнений форменими елементами крові. Ендотеліальні клітини містять ядро з рівномірно розподіленим еухроматином, що свідчить про активні транскрипційні процеси. Мітохондрії переважно округлої форми, матриксом помірної електронної щільності та окремими набряклими кристами. Канальці зернистої ендоплазматичної сітки дещо розширені. Відростки подоцитів (цитотрабекули та цитоподії) тісно прилягають до ядровмісних ділянок, суттєво зменшуючи сечовий простір, що погіршує фільтраційні процеси.

Гломерулярна мембрана в місцях її контакту з мезангіоцитами часто нерівномірно розширена, а в ділянках, де вона розділяє ендотеліоцити та подоцити, її товщина без суттєвих ультраструктурних змін.

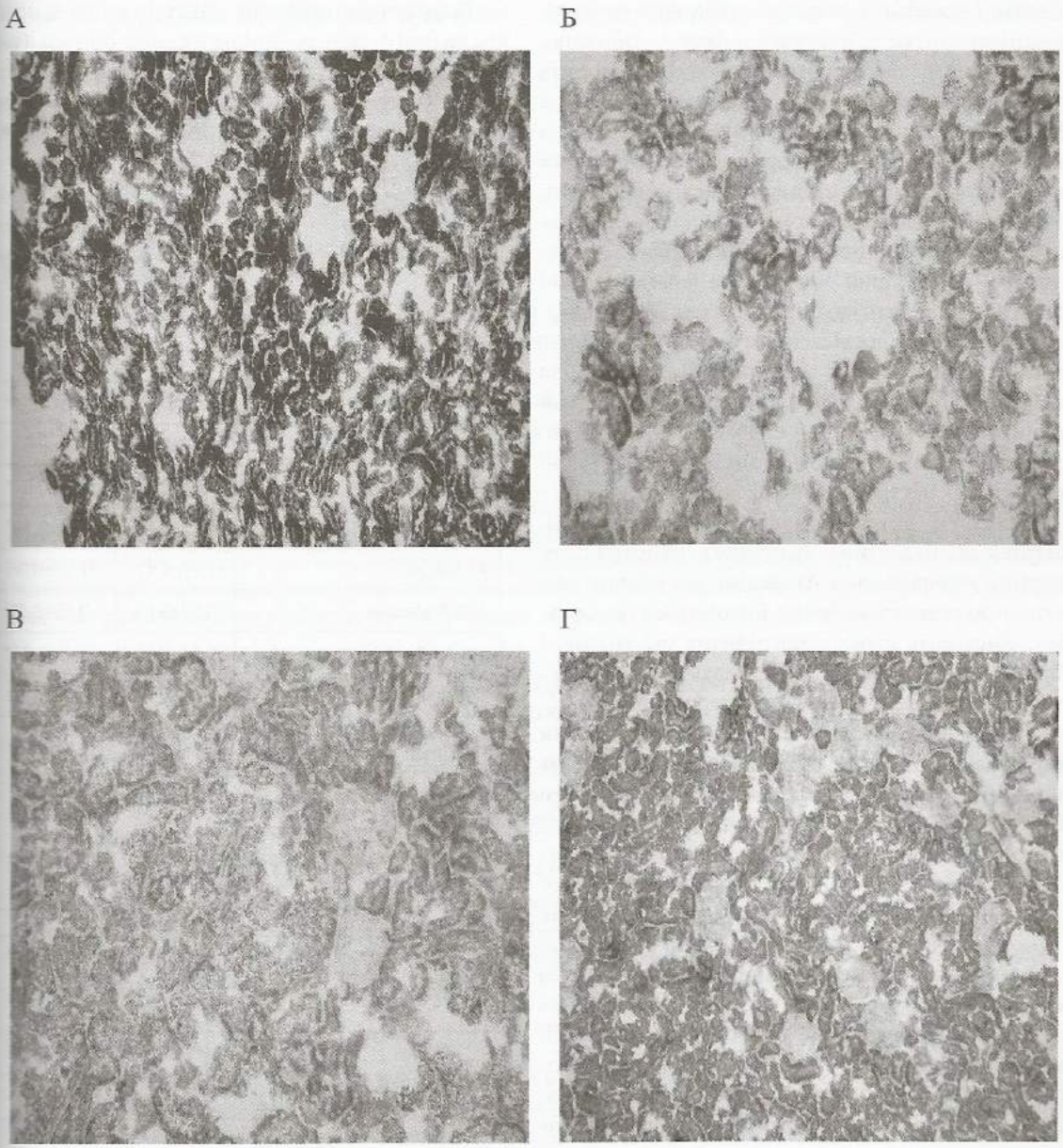

Рисунок 1. – Гістологічні зрізи кіркової речовини нирок. А, В – контроль; Б, Г – коразоловий судомний синдром; А, Б – активність СДГ. Метод Нахласа і співавт.; В, Г – активність ЛДГ. Метод Гесс, Скарпеллі і Пірс. Збільшення: об.10, ок. 10.

Епітеліоцити проксимальних канальців варіюють за електронною щільністю та вмістом органел, але слід відмітити, що клітин з електронно ущільненою цитоплазмою та ядрами не спостерігаються. Мікроворсинки щіткової облямівки щільно прилягають одна до одної, іноді втрачають паралельне розташування.

Просвіти більшості дистальних канальців звужені, внаслідок зближення апікальних поверхонь епітеліоцитів. Як і в проксимальних канальцях, епітеліоцитам притаманна мозаїчність ультраструктури, що пов'язано із насиченістю клітин органелами. Досить поширені клітини з функціонально активним ядром та значною кількістю мітохондрій, канальців ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі без суттєвих деструктивних ознак.

Проксимальні та дистальні канальці, ниркові тільця, перитубулярні мікросудини тісно прилягають один до одного, через що інтерстиційний простір зменшений.

Для перитубулярних мікросудин характерні явища стазу та накопичення у просвітах коагу-

льованої плазми у вигляді дрібнодисперсного матеріалу, що свідчить про гіпоксію. Ендотеліальні клітини цих мікросудин містять ядра, в яких переважає транскрипційно активна форма хроматину – еухроматин. Навколо ядра розташовується більшість органел біосинтетичної дії: полісоми, канальці ендоплазматичної сітки, комплекс Гольджі, мітохондрії. Останні, як правило, при збереженій зовнішній мембрані мають електроннопрозорий матрикс та фрагментовані кристи. Збільшені розміри мітохондрій з одночасним різким просвітленням матриксу і руйнуванням крист дають підставу вважати їх за набряк. Набряк та локальний лізис цитоплазми поширюється і на окремі ендотеліальні клітини. Інші ендотеліоцити мають стоншені периферичні ділянки з фенестрованими діафрагмами.

Просвіти артеріол нерівномірно звужені, ендотеліальні клітини набувають неправильної форми, здебільшого з ознаками локального або розповсюдженого набряку цитоплазми та органел. Змінюють свою топографічну орієнтацію і гладком'язові клітини, цитоплазма яких електронно ущільнена внаслідок їх перескорочення.

Проведений морфологічний аналіз змін нирок за відтворення коразолової моделі судомного синдрому показав, що моделювання судом викликає спазм усіх структурних компонентах нирки і призводить до зменшення розмірів просвітів кровоносних судин і канальцевого апарату. Це, безумовно, позначається на швидкості та кількості фільтрації і сприяє затримці рідини, що і обумовлює розвиток, з одного боку, процесів набряку, а з іншого – гіпоксії . Зміни в канальцях свідчать, що порушуються і процеси реабсорбції, в першу чергу переносу білкових молекул в проксимальних їх частинах та солей в дистальних. Тобто, в нирці розвиваються морфологічні ознаки порушень водно-сольового обміну і обміну білків та інших речовин між кров'ю та сечею.

Встановлені морфологічні зміни нирок розвиваються на фоні пригнічення рівня енергетичних процесів, про що свідчать виявлені нами показники аденілових нуклеотидів, які забезпечують поєднання між процесами генерування і використання енергії (таблиця 2).

Цифровий матеріал свідчить, що в нирках щурів з моделлю коразолових судом істотно знижені показники АТФ, АДФ, АМФ і сума АН (на 39, 34, 49 і 41% відповідно), а також ІФ (на 68%), який вказує на здатність клітин синтезувати АТФ з АМФ і неорганічного фосфору. Співвідношення АТФ/АДФ, АЕЗ і Кпор. були на рівні контрольних значень.

Газохроматографічне дослідження жирнокислотного складу ліпідів тканин нирки (таблиця 3) свідчить, що за моделювання коразолового судомного синдрому розвиваються зміни, які пов'язані з вмістом пальмітинової ЖК

Таблиця 2 - Рівень аденілових нуклеотидів в нирках щурів з моделлю коразолових судом (M±m)

Групи тварин Показники	Інтактні (n=8)	Коразолові судоми (n=6)
АТФ, ммоль/кг	1,52±0,23	0,93±0,04*
АДФ, ммоль/кг	1,24±0,05	0,82±0,03*
АМФ, ммоль/кг	1,35±0,13	0,69±0,07*
АТФ+АДФ+АМФ, ммоль/кг	4,11±0,15	2,44±0,10*
АТФ/АДФ	1,27±0,17	1,14±0,05
АЕЗ Аткінсона	0,52±0,03	0,55±0,02
Індекс фосфорилювання	1,94±0,10	0,63±0,04*
Порівняльний коефіцієнт	1,89±0,29	1,98±0,09

Примітка: * - вірогідність ($p<0,05$) по відношенню до групи інтактних тварин.

Таблиця 3 - Жирнокислотний спектр ліпідів тканин нирки за відтворення коразолової моделі судомного синдрому (в %)

ЖК	Нирки	
	Інтактні (n=8)	Коразолові судоми (n=6)
$C_{14:0}$	3,4 ± 0,3	1,7 ± 0,3
$C_{15:0}$	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,05
$C_{16:0}$	24,6 ± 1,0	19,5 ± 1,0*
$C_{17:0}$	0,5 ± 0,05	0,2 ± 0,05
$C_{18:0}$	10,3 ± 1,0	9,0 ± 1,0
$C_{18:1}$	7,6 ± 0,8	11,6 ± 1,0*
$C_{18:2}$	12,6 ± 1,0	14,0 ± 0,8
$C_{18:3}$	0,5 ± 0,05	0,3 ± 0,05
$C_{20:4}$	40,0 ± 1,5	43,4 ± 1,3*
УНЖК	39,3 ± 1,8	30,8 ± 1,6
УННЖК	60,7 ± 1,8	69,2 ± 1,6*
УПНЖК	53,1 ± 1,5	57,7 ± 1,5*

Примітка:* вірогідність ($P<0,05$) по відношенню до групи інтактних тварин.

(зниження на 21%) і міристинової ЖК (зниження на 50%).

Підсумок. Проведеними комплексними дослідженнями встановлено, що підґрунтям розвитку патології нирок за відтворення коразолового судомного синдрому є гетерогенні зміни всіх відділів нефрона (гломерулярного фільтру, епітелія звивистих та прямих відділів), перитубулярних мікросудин, строми, поєднані зі зниженням ступеня активності окисно-відновних ферментів, розвитком тканинної гіпоксії та дистрофічно-деструктивних змін в них, які можуть слугувати основою для порушення функціональної активності нирок. В основі патогенезу встановлених змін лежать спастичні процеси в судинах та паренхіматозних елементах нирок, поєднані з тканинною гіпоксією, які потрібно враховувати при створенні лікувальних і профілактичних схем.

РОЛЬ ЛАМИКТАЛА В РЕГУЛЯЦИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ

Колесова Н.А., Хайтович М.В., Аршинникова Л.Л., Антоненко Л.И., Брюзгина Т.С., Чухрай С.М., Литвиненко В.И., Сухарева Н.М., Жданова О.О.
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца

Резюме. *Патоморфологическими, гистохимическими, биохимическими и электронномикроскопическими методами исследования в эксперименте на крысах линии Вистар (n=20) с воспроизведением коразоловой модели судорожного синдрома установлены основне механизмы повреждения почек. Показано, что развитие патологических изменений почек происходит с паралельными энергетическими и структурними изменениями, которые отражают ухудшение кровоснабжения в условиях судорожных приступов.*

THE ROLE OF LAMIKTAL IN REGULATION OF ENERGY HOMEOSTASIS IN CONVULSIVE SYNDROME

Kolesova N.A., Haitovich M.V., Arshynnikova L.L., Antonenko L.I., Bruzgina T.S., Chuhraj S.M., Litvinenko V.I., Suhareva N.M., Jdanova O.O.
Bogomolets National Medical University

Abstract. *Basic mechanisms of damage kidneys were fixed by means of pathomorphological, histochemical, biochemical and electron microscopy methods of researches in experimental on rats (Vistar line, n=20) with the corasol model of convulsive syndrome. It's fixed that development pathological changes in kidneys were accompaniel by parallel energy and structural change and it reflect the change for the worse of the blood supply in condition of the convulsive attacks.*

Список літератури

1. Карлов В.А. Эпилепсия. М.: Медицина, 1990.-336 с.
2. Дубенко А. Е. Роль нарушений енергетического обмена в развитии эпилептической энцефалопатии //Журнал психиатрии и медицинской психологии. – 2000. – № 1(7). – С. 92–94.
3. Власов П. Н. Современные аспекты эпилептологии //Неврологический журнал. — 2002. — № 5. — С. 59—63.
4. Карлов В. А. Ключевые вопросы проблемы эпилепсии//Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2003. — Т. 103, вып. 3. – 4 с.
5. Громов С.А. Контролируемая эпилепсия. Клиника, диагностика, лечение. – СПб.: НИЦ Балтика, 2004. – 302 с.
6. Дубенко А. Е., Череватенко Г. Ф., Васильева О. А., Линская А. В., Бабкина Ю.А. Особенности мозговой гемодинамики у больных эпилепсией с сопутствующей патологией сосудистого генеза по данным ультразвуковой доплерографии//Український вісник психоневрології. – 2009. – Т.17, вип. 2(59). – С. 80–84.
7. Mameli O., Caria M.A., Melis F. et al. Autonomic nervous system activity and life threatening arrhythmias in experimental epilepsy //Seizure. – 2000. - Vol.10, № 4. – P. 269-278.
8. Ницинская Л.Е. Изучение противосудорожного действия белка теплового шока 70 кДа в моделях генерализованной эпилепсии у крыс // Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.03.01 – СПб., 2010. – 22 с.
9. Баришполец В.В. Изучение поведенческих ефектов производных 3,4-диметоксифенилэтиламина // Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.00.25 – СПб., 2009. – 22 с.