

УДК 576+612+616

NOS-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ ПОВРЕЖДЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НЕФРОНОВ У КРЫС ПРИ ГЛЮКОКОРТИКОИД- ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Луканина С. Н., Сахаров А. В., Просенко О. И.

*Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск, Россия
E-mail: lukanina.lukanina@yandex.ru*

Работа посвящена изучению iNOS-зависимых молекулярных механизмов нарушения структурно-функциональной организации почек крыс при окислительном стрессе, индуцированном длительным применением глюкокортикоидов. В образцах почек крыс интактной группы иммуногистохимическая картина по степени экспрессии iNOS характеризовалась как негативная. Длительное применение глюкокортикоидов приводит к повышению экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы, гиперпродукции оксида азота и гибели тубулярных эпителиоцитов нефронов коркового вещества. Использование полифункционального серосодержащего антиоксиданта «Тиофан» оказывает нефропротективный эффект, ограничивает развитие выраженных NOS-зависимых повреждений структурных элементов нефронов.

Ключевые слова: окислительный стресс, глюкокортикоиды, почка, iNOS, антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ

Хронические болезни почек становятся одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения и общества в целом [1–3]. Результаты эпидемиологических исследований последних десятилетий показали, что данная группа заболеваний встречается гораздо чаще, чем предполагалось ранее и приближается по распространенности к болезням сердечно-сосудистой системы, опухолям и травмам [1, 3]. Несмотря на достижения современной нефрологии, их этиология и патогенез в настоящее время остаются недостаточно изученными [2–4]. Как известно, NO представляет собой соединение свободнорадикальной природы и играет роль универсального модулятора разнообразных функций организма. В настоящее время доказано его участие в регуляции клеточного дыхания, поддержания сосудистого гомеостаза, иммунологического контроля, экспрессии генов и т.д. [5–8]. Исследованиями Х.М. Маркова (1996) [8] установлено, что NO, синтезируемый в эндотелиальных, мезангиальных и эпителиальных клетках почек участвует в регуляции водно-солевого обмена посредством влияния на ренальный кровоток. Его роль в процессах фильтрации, реабсорбции, секреции, инкреции отмечается в многочисленных публикациях [5, 9–12].

Несмотря на то, что NO способствует реализации многих физиологических реакций, имеются сведения об участии этого соединения в иницировании

запрограммированной гибели клеток [1, 13, 14]. Авторами установлено, что NO может изменять потенциал мембраны митохондрий с последующим высвобождением цитохрома C и активацией эффектора апоптоза каспазы-3 [15]. При этом в качестве одного из ведущих механизмов, опосредующих развитие летальных повреждений клеток нефрона, приводится свободнорадикальный [16–20].

В связи с этим, детальное изучение реализации молекулярных механизмов повреждения нефрона под влиянием NO[•] определяет высокую актуальность настоящего исследования.

Цель работы – изучение iNOS-зависимых молекулярных механизмов летального повреждения клеток нефронов при моделировании глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились самцы крыс линии Вистар массой 250-300 г. Эксперименты проведены с соблюдением правил гуманного обращения с животными согласно «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и директивой совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран-участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях» с осуществлением хирургических вмешательств под эфирным ингаляционным наркозом и выведением животных из эксперимента передозировкой диэтилового эфира.

Крыс распределяли на 4 группы: интактная, контрольная и 2 группы сравнения, по 10 особей в каждой. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и корму. Крысам контрольной и двух групп сравнения (ГС) ежедневно в течение 14 суток вводили водную суспензию синтетического глюкокортикоида «Преднизолон Никомед» («Никомед Австрия ГмбХ», Линц, Австрия) в дозе 50 мг/кг с помощью внутрижелудочного зонда, инициируя у них развитие окислительного стресса [21]. Для чистоты эксперимента и стандартизации манипуляций, связанных с введением в организм веществ, крысам первой группы сравнения (1 ГС) через три часа после преднизолона вводили 0,2 мл водопроводной воды. Животные второй группы сравнения (2 ГС) по аналогичной схеме получали антиоксидант «Тиофан» (Ассоциация «Новосибирский институт антиоксидантов», Новосибирск, Россия) (в дозе действующего вещества 100 мг/кг веса), растворенный в 0,2 мл растительного масла производства ОАО «ЭФКО» торговой марки «Altero Golden». В связи с тем, что «Тиофан» – жирорастворимый антиоксидант, крысам контрольной группы после приема преднизолона внутрижелудочно вводили только растворитель антиоксиданта – растительное масло (0,2 мл).

По окончании эксперимента на 15 сутки, у животных всех групп забирали равные половины левой почки. Для проведения иммуногистохимического исследования образцы почек крыс фиксировали в 10 %-м растворе нейтрального формалина, обезживали в растворах изопропанола возрастающей концентрации и заливали в гистомикс. С помощью полуавтоматического ротационного микротомы (SLEE CUT 5062, Германия) изготавливали серийные срезы толщиной 3 – 5 микрон.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование образцов почек и оценку оптической плотности продуктов экспрессии клетками нефронов iNOS в тканях животных всех групп проводили в соответствии со стандартным протоколом. Из парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на стекла, покрытые поли-L-лизинном. Депарафинирование выполняли в термостате при температуре + 60 °С в течение 1 часа и погружением в ксилол. Восстановление антигенной активности осуществляли методом теплового демаскирования в растворе трис-EDTA (pH 9.0) на водяной бане в течение 30 минут. Блокирование эндогенной пероксидазной активности выполняли с помощью 3 % раствора перекиси водорода в течение 10 минут. В работе использовали антитела к iNO-синтазе (Rabbit Monoclonal, Clone Name SP126, Spring Bioscience Corporation, США) в рекомендованных разведениях. Выявление антигена проводили при помощи безбиотиновой системы детекции на основе пероксидазы (Spring Bioscience Corporation, США). После каждой инкубации срезы отмывали в фосфатно-солевом буфере, подсушивали, после чего для визуализации реакции наносили хромоген 3,3-диаминобензидин (ДАБ) (Spring Bioscience Corporation, США), что позволяло получать специфическую окраску. По достижении необходимой интенсивности окрашивания срезы докрашивали гематоксилином Майера. Для достоверности полученных результатов применяли негативный контроль антител (обработка срезов без нанесения первичных антител).

Морфометрические параметры структурных компонентов нефронов оценивали с помощью комплекса оптико-структурного анализа на базе AxioImager.M2 с программным обеспечением для анализа изображений AxioVision Z2 M2 (CARL ZEISS, Германия). Съемку изображений осуществляли CCD-камерой AxioCam HR с программным обеспечением ZenLite (CARL ZEISS, Германия). Последующее изучение и морфометрию с определением относительной площади иммунореактивного вещества осуществляли на компьютерных изображениях. Зону иммунореактивности в почечной паренхиме выделяли по методу «компьютерного скелетирования» с определением процентного отношения иммунопозитивных зон к общей площади ткани. В каждой серии производили морфометрию 30 участков во всех зонах коркового и мозгового вещества почки.

Статистический анализ результатов исследования проводили на основе определения медианы и квартилей (Me (Q25;Q75)). Различия показателей между группами оценивали методом вариационной статистики по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни для независимых выборок и считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$. Расчеты производили по общепринятым формулам с использованием стандартных программ пакета Statistica 7.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Считается, что iNOS локализуется преимущественно в макрофагах и активируется цитокинами при патологических процессах, либо в ответ на различные внешние воздействия на клетку [22, 23].

Результаты исследования показали, что в исследуемых образцах почек крыс интактной группы иммуногистохимическая картина по степени экспрессии iNOS характеризовалась как негативная. На светооптическом уровне выраженных морфофункциональных нарушений в структурных элементах почечных телец и канальцев нефронов не обнаружено (Рис. 1, таблица 1).

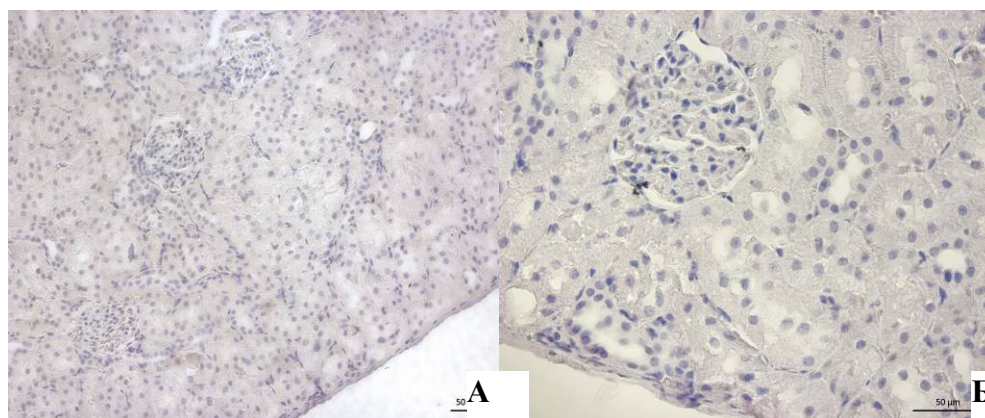


Рис. 1. Выявление экспрессии iNOS в образцах почек животных интактной группы: А – негативная иммуногистохимическая реакция в корковом и мозговом веществе почки. Ув. 100 х; Б – негативная иммуногистохимическая реакция клеток почечного тельца и эпителия проксимального и дистального отделов канальца нефрона. Ув. 200 х.

Таблица 1

Морфометрическая оценка экспрессии iNOS в почечной паренхиме (Медиана (Q25;Q75))

Группы животных	Удельная площадь иммунореактивного вещества (%)	
	почечных телец	канальцев нефронов
1 группа сравнения	11,4 (10,5; 12,3)*	38,9 (37,5; 40,3)*
2 группа сравнения	7,8 (6,3; 8,4)	16,4 (15,0; 17,8)**
Контрольная	9,9 (8,6; 11,2)	33,1 (31,7; 34,5) #

Примечание: В образцах почечной паренхимы животных интактной группы экспрессия iNOS не обнаружена; * – статистически значимые различия между показателями животных интактной и 1 группы сравнения; ** – статистически значимые различия между показателями животных 1 и 2 групп сравнения; # – статистически значимые различия между показателями животных контрольной и 2 группы сравнения ($p \leq 0,05$).

На 15-е сутки эксперимента в препаратах почек животных, длительно принимавших глюкокортикоиды, определяется достоверное повышение уровня экспрессии iNOS (Рис. 2, таблица 1). Локализация иммунопозитивных участков

определяется преимущественно в корковом веществе почки. Наиболее высокий уровень экспрессии данного белка обнаружен в эпителиоцитах проксимального и дистального отделов канальцев нефрона (Рис. 2, Б). В цитоплазме мезангиальных клеток, подоцитов и эндотелия почечного тельца реакция на данный белок слабо выражена (Рис. 2, А).

Таким образом, увеличение уровня экспрессии iNOS в образцах почек животных, длительно получавших преднизолон, свидетельствует об избыточной продукции NO клетками тубулярного нефротелия при глюкокортикоид-индуцированном окислительном стрессе.

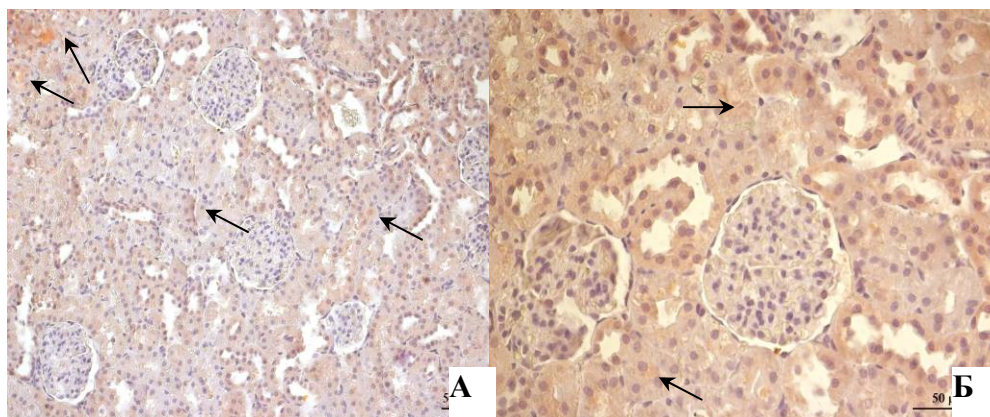


Рис. 2. Выявление экспрессии iNOS в образцах почек животных первой группы сравнения: А, Б – особенности иммуногистохимической реакции клеток почечного тельца и нефротелия проксимального и дистального отделов канальца нефрона. Стрелкой показаны очаги позитивной иммуногистохимической реакции. Ув. 100 х и 200 х.

Образцы почек животных контрольной группы по тинкториальным характеристикам ИГХ реакции, а также количеству позитивно реагирующих клеток и их гистотопографии и не имели различий с тканью почек крыс первой группы сравнения (Рис. 3, таблица 1).

При фармакологической коррекции тубулоэпителиальной дисфункции полифункциональным фенольным серосодержащим антиоксидантом нового поколения «Тиофан» установлено, что локализация продуктов реакции аналогична таковой у животных первой группы сравнения. Однако обнаружено, что количество иммунопозитивных клеток в ткани почек животных, получавших антиоксидант «Тиофан» достоверно меньше, а интенсивность ИГХ реакции значительно ниже, чем у крыс, принимавших только глюкокортикоиды (Рис. 4, таблица 1). Так, при количественной оценке оптической плотности уровень экспрессии iNOS в структурах почечного тельца образцов крыс 2 ГС не имел существенных отличий, а в канальцах нефронов – в 2,37 раз ниже, чем у животных 1 ГС.

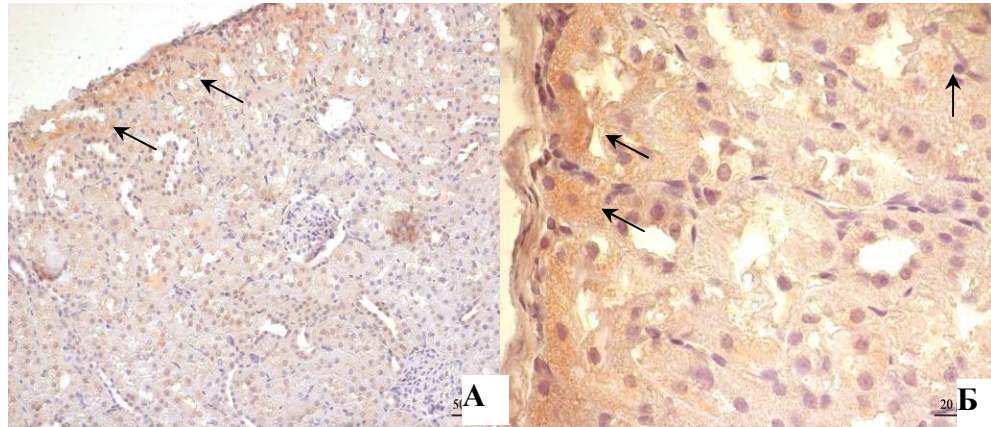


Рис. 3. Выявление экспрессии iNOS в образцах почек животных контрольной группы: А, Б – позитивная иммуногистохимическая реакция в корковом и мозговом веществе почки. Стрелкой показаны очаги иммуннопозитивного вещества. Ув. 100 х и 200 х.

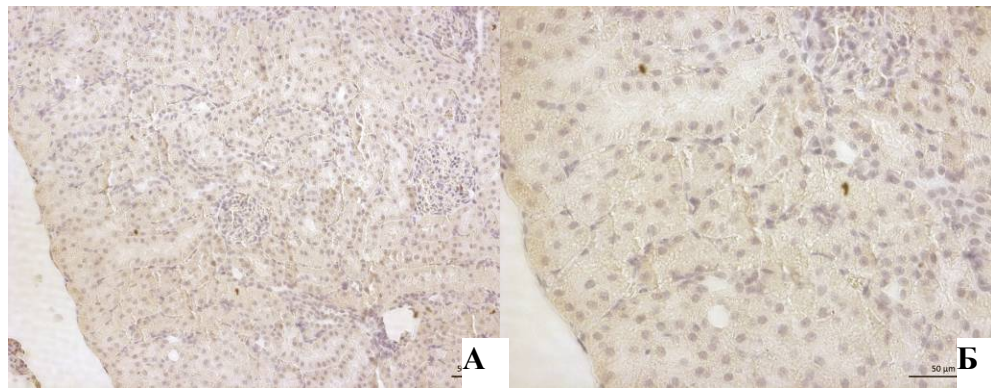


Рис. 4. Выявление экспрессии iNOS в образцах почек животных второй группы сравнения: А – позитивная иммуногистохимическая реакция в корковом и менее выраженная – в мозговом веществе почки. Ув. 100 х; Б – слабая позитивная иммуногистохимическая реакция клеток почечного тельца и тубулярного эпителия. Ув. 200 х.

При обсуждении полученных результатов необходимо отметить, что в литературе имеется обширный материал, касающийся экспрессии всех изоформ нитроксидсинтазы мезангиоцитами, эпителиальными клетками почечных канальцев собирательных трубок, клетками "macula densa" и эндотелия почечных сосудов [8]. Каждая из представленных в различных отделах почек изоформ NO-синтазы имеет свои особенности как в локализации, так и в механизмах действия на почечные процессы [24–28]. Считается, что в зависимости от структуры и функций NOS

разделяются на эндотелиальные (eNOS, или NOS-3), нейрональные (nNOS, или NOS-1) и индуцибельные (iNOS, или NOS-2) [1]. При этом eNOS обеспечивает образование NO, который участвует в регуляции тонуса сосудистой стенки в физиологических условиях. Как уже отмечалось выше, с повышением активности iNOS связывается развитие многих патологических процессов [22]. На связь апоптоза с повышением уровня экспрессии iNO-синтазы в клетках почечного эпителия при IgA-нефропатии указывается в публикациях Р. К. Mishra, G. V. Raghuram, Н. Panwar и др. (2009) [29], Л. Б. Пак, А. И. Дубикова, Т. А. Кабанцевой и др. (2013) [1, 30]. О развитии апоптоза в структурных компонентах нефрона вследствие окислительного стресса упоминается в работах Т. Suzuki, Т. Matsusaka, М. Nakayama и др. (2009) [31]. Данными авторами показано ассоциированное с окислительным стрессом увеличение уровня экспрессии p53, p21, cyclin E и белков CDK2, нарушение клеточного цикла, возрастание числа хромосомных aberrаций. Установлено также, что сочетанная индукция активности iNOS и молекулы p53 приводит к быстрому прогрессированию почечной недостаточности [15]. В ранних исследованиях [32] нами показано, что в условиях хронической глюкокортикоидной нагрузки в организме крыс происходит усиление свободнорадикальных процессов, локальным проявлением которого являются глубокие нарушения структурной организации паренхимы почек. При этом наиболее выраженные повреждения отмечены (в том числе) в эпителиоцитах корковых нефронов. В основе механизма этих повреждений, как считают авторы, лежит возникающая под влиянием глюкокортикоидов гипертензия. Последняя приводит к ишемии корковых нефронов, гипоксии и летальным повреждениям тубулярных эпителиоцитов по механизму апоптоза [33]. Полученные результаты согласуются с данными Ф. Д. Цаликовой (1999), А. А. Ярилина (2001), Л. Б. Пак, А. И. Дубикова, Т. А. Кабанцевой и др. (2013) [1, 4, 14].

В почечных клубочках стереотипной тканевой реакцией на повреждение является клеточная пролиферация, с последующим накоплением внеклеточного матрикса и развитием нефросклероза [34]. При этом измененные компоненты матрикса могут опосредованно повышать чувствительность мезангия к различным индукторам апоптоза. В работах I. Y. Chang, J. N. Kim, J. Y. Jun и др. (2011), Л. Б. Пак, А. И. Дубикова, Т. А. Кабанцевой и др. (2013) [1, 35] отмечено, что при гломерулосклерозе кортикальном некрозе и др., происходит его активация. По данным Е. В. Пожиловой, В. Е. Новикова (2015), М. В. Филимоновой, В. В. Южакова, Л. И. Шевченко и др. (2015), Е. N. Dedkova, L. A. Blatter (2009), S. A. Omar, A. G. Webb (2014) [23, 36–38], в качестве одного из участника развития патологического процесса выступает NO.

Исследованиями В. Е. Новикова, Е. И. Климкиной (2005, 2009), Е. В. Пожиловой, В. Е. Новикова, О. С. Левченковой (2015) и др. [39–42] установлено, что при стрессе, гипоксии и ишемии в результате гиперпродукции АКМ и их взаимодействия с NO происходит образование пероксинитрита (ONOO-) – свободнорадикального соединения с выраженными окислительными свойствами.

По мнению Е. В. Пожиловой, В. Е. Новикова (2015), U. Forstermann, W. S. Sessa (2012), S. A. Omar, A. G. Webb (2014) [23, 37, 43], токсический эффект NO

обусловлен повышением активности iNO-синтазы и может быть связан как с его прямым действием на ферменты клетки, так и с образованием ONOO-. При этом в результате ингибирования митохондриальных ферментов, отмечается дисфункция митохондрий и снижение продукции АТФ. Возможно, такой механизм лежит в основе нарушения процессов окислительного фосфорилирования и энергетического обмена в ткани при активации свободнорадикальных процессов [44–46].

Таким образом, обнаруженное в настоящей работе увеличение уровня экспрессии iNOS и, как следствие, гиперпродукция NO при глюкокортикоид-индуцированном окислительном стрессе может являться одним из ведущих механизмов структурного и функционального нарушения клеток нефротелия, и, как следствие, секреторно-реабсорбционных процессов. Полученные данные согласуются с результатами проведенных ранее собственных исследований [47], в которых установлено, что продолжительное использование преднизолона приводит к нарушению гидро- и ионоуретической функций почек и развитию почечной недостаточности. С нашей точки зрения, NO и пероксинитрит могут являться основными участниками процесса повреждения молекулы ДНК в клетках тубулярного нефротелия, инициируя развитие апоптоза [48]. В работе И. Ф. Беленичева, В. И. Черния, Ю. М. Колесника и др. (2009) показано, что избыточное образование в клетке этих активных метаболитов кислорода стимулирует синтез в ней белка p53. Несмотря на то, что p53 является «охранником генома», при необратимом повреждении ДНК его суперэкспрессия опосредует индуцирование экспрессии апоптогенных белков Bax, Fas, p53AIP (apoptosis inducing protein) [49]. Можно полагать, что использование полифункционального серосодержащего антиоксиданта «Тиофан» при моделировании глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса либо подавляет экспрессию iNOS, либо блокирует активность NO, способствуя снижению уровня гибели клеток канальцевого эпителия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют о том, что длительное использование глюкокортикоидов приводит к повышению экспрессии iNO-синтазы, гиперпродукции NO и гибели эпителиоцитов нефронов. Применение полифункционального серосодержащего антиоксиданта «Тиофан» оказывает нефропротективный эффект, ограничивая развитие структурно-функциональных нарушений в структурных элементах нефрона.

Список литературы

1. Пак Л. Б. Апоптоз и патология почек / Л. Б. Пак, А. И. Дубиков, Т. А. Кабанцева, А. А. Василюк, О. М. Григорян // Нефрология. – 2013. – Т. 17, № 4. – С. 36–43.
2. Смирнов А. В. Хроническая болезнь почек: дальнейшее развитие концепции и классификации / А. В. Смирнов, В. А. Добронравов, И. Г. Каюков, А. М. Есаян // Нефрология. – 2007. – № 4. – С. 7–17.

3. Томилина Н. А. Эпидемиология хронической почечной недостаточности и новые подходы к классификации и оценке тяжести хронических прогрессирующих заболеваний почек / Н. А. Томилина, Б. Т. Бикбов // *Терапевтический архив*. – 2005. – № 6. – С. 87–89.
4. Цаликова Ф. Д. Апоптоз в патогенезе нефропатий / Ф. Д. Цаликова // *Нефрология и диализ*. – 1999. – № 3. – С. 127–130.
5. Kempson S. Nitric oxide production by mouse renal tubules can be increased by a sodium-dependent mechanism / S. Kempson, N. Thompson, L. Pezzuto, H. Glenn Bohlen // *Nitric Oxide*. – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 33–43.
6. Silva G. Extracellular ATP stimulates NO production in rat thick ascending limb / G. Silva, W. H. Beierwaltes, J. L. Garvin // *Hypertension*. – 2006. – Vol. 47. – P. 563–567.
7. Кутырина И. М. Современные аспекты патогенеза почечной артериальной гипертензии / И. М. Кутырина // *Нефрология*. – 2000. – Т. 4, № 1. – С. 112–115.
8. Марков Х. М. Окись азота в физиологии и патологии почек / Х. М. Марков // *Вестник РАМН*. – 1996. – № 7. – С. 73–78.
9. Blantz R. C. The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration / R. C. Blantz, A. Deng, M. Lortie, K. Munger, V. Vallon, F. B. Gabbai, S. C. Thomson // *Kidney Int*. – 2002. – Vol. 61. – P. 782–785.
10. Gustavo R. A. Constitutive endocytosis and recycling of NKCC2 in rat thick ascending Limbs / R. A. Gustavo, P. A. Ortiz // *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. – 2010. – Vol. 299. – P. 1193–1202.
11. Каримова Р. Г. Гидроуретическая функция почек при различных уровнях активности системы оксида азота / Р. Г. Каримова, И. Н. Билалов, А. Г. Мухамеджанова // *Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана*. – 2013. – Т. 215. – С. 164–169.
12. Каримова Р. Г. Ионоуретическая функция почек при повышении продукции оксида азота / Р. Г. Каримова, И. Н. Билалов // *Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана*. – 2014. – Т. 217. – С. 164–169.
13. Vousden K. H. Blinded by the light: the growing complexity of p53 / K. H. Vousden, C. Prives // *Cell*. – 2009. – Vol. 137. – P. 413–431.
14. Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии / А. А. Ярилин // *Актуальные проблемы патофизиологии*. – М.: Медицина, 2001. – С. 13–56.
15. Qiu L. Q. Coupled induction of iNOS and p53 upregulation in renal resident cells may be linked with apoptotic activity in the pathogenesis of progressive IgA nephropathy / L. Q. Qiu, R. Sinniah, S. I. Hsu // *J. Am. Soc. Nephrol*. – 2004. – Vol. 15, № 8. – P. 2066–2078.
16. Bitar M. S. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes / M. S. Bitar, S. Wahid, S. Mustafa, E. Al-Saleh, G. S. Dhaunsi, F. Al-Mulla // *Eur. J. Pharmacol*. – 2005. – Vol. 511, № 1. – P. 53–64.
17. Creager M. A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I / M. A. Creager, T. F. Luscher, F. Cosentino, J. A. Beckman // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108, № 12. – P. 1527–1532.
18. Endemann D. H. Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus / D. H. Endemann, E. L. Schiffrin // *Curr. Hypertens. Rep*. – 2004. – Vol. 6, № 2. – P. 85–89.
19. Goldin A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury / A. Goldin, J. A. Beckman, A. M. Schmidt, M. A. Creager // *Circulation*. – 2006. – Vol. 114, № 6. – P. 597–605.
20. Дзугкоев С. Г. Влияние афобазола на биохимические и гистопатоморфологические показатели эндотелиальной дисфункции при экспериментальном сахарном диабете у крыс / С. Г. Дзугкоев, К. М. Козырев, Н. Г. Гуманова, Ф. С. Дзугкоева // *Биомедицинская химия*. – 2012. – Т. 58, Вып. 4. – С. 438–445.
21. Валеева И. Х. Влияние димефосфона и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон / И. Х. Валеева, Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, А. У. Зиганшин // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2002. – Т. 65, № 2. – С. 40–43.
22. Мелехина Е. В. Оксид азота при поражении почек у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом / Е. В. Мелехина, И. М. Османов, Е. В. Неудахин, В. А. Таболин, И. Э. Волков, И. А. Сумакова, В. В. Длин // *Нефрология и диализ*. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 201–204.

23. Пожилова Е. В. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 4. – С.35–41.
24. Christian D. Effect of angiotensin receptor blockade on central haemodynamics in essential hypertension: results of a randomised trial / D. Christian, U. K. Arnfried, P. S. Markus // Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System. – 2008. – Vol. 9. – P. 49.
25. Herrera M. A high-salt diet dissociates NO synthase-3 expression and NO production by the THAL / M. Herrera, G. Silva, J. L. Garvin // Hypertension. – 2006. – Vol. 47. – P. 95–101.
26. Mattson D. L. Nitric oxide synthase activity and isoforms in rat renal vasculature / D. L. Mattson, F. Wu // Hypertension. – 2000. – Vol. 35. – P. 337–341.
27. Ortiz P. A. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport / P. A. Ortiz, J. L. Garvin // Am. J. Physiol Renal Physiol. – 2002. – Vol. 282. – P. 777–784.
28. Wilcox C. S. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure / C. S. Wilcox, W. J. Welch, F. Murad, S. S. Gross, G. Taylor, R. Levi, H. W. Schmidt // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 11993–11997.
29. Mishra P. K. Mitochondrial oxidative stress elicits chromosomal instability after exposure to isocyanates in human kidney epithelial cells / P. K. Mishra, G. V. Raghuram, H. Panwar // Free Radic. Res. – 2009. – Vol. 43, № 8. – P. 718–728.
30. Vaseva A. V. The mitochondrial p53 pathway / A. V. Vaseva, U. M. Moll // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787, № 5. – P. 414–420.
31. Suzuki T. Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis / T. Suzuki, T. Matsusaka, M. Nakayama // Am. J. Pathol. – 2009. – Vol. 174, № 5. – P. 1675–1682.
32. Луканина С. Н. Оценка эффективности защиты почек крыс антиоксидантом тиофаном при окислительном стрессе / С. Н. Луканина // Вестник КрасГАУ. – 2010. – № 11. – С. 136–140.
33. Луканина С. Н. Особенности гидро- и ионоуретической функций почек крыс при окислительном стрессе / С. Н. Луканина, А. В. Сахаров, А. Е. Просенко, К. В. Жучаев // Вестник ТвГУ. – Серия «Биология и экология». – 2017. – № 1. – С. 18–27.
34. Savill J. Apoptosis and the Kidney / J. Savill // J. Am. Soc. Nephrol. – 1994. – Vol. 5. – P. 12–21.
35. Chang I. Y. Repression of apurinic/apyrimidinic endonuclease by p53-dependent apoptosis in hydronephrosis-induced rat kidney / I. Y. Chang, J. N. Kim, J. Y. Jun // Free Radic. Res. – 2011. – Vol. 45, № 6. – P. 728–734.
36. Dedkova E. N. Trimetazidine effects on the mitochondrial metabolism during rabbit heart failure / E. N. Dedkova, L. A. Blatter // The Journal of Physiology. – 2009. – Vol. 587, № 4. – P. 851–872.
37. Omar S. A. Nitrite reduction and cardiovascular protection / S. A. Omar, A. G. Webb // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2014. – Vol. 73. – P. 57–69.
38. Филимонова М. В. Экспериментальное исследование противоопухолевой активности нового ингибитора синтаз оксида азота T1023 / М. В. Филимонова, В. В. Южаков, Л. И. Шевченко // Молекулярная медицина. – 2015. – № 1. – С. 61–64.
39. Новиков В. Е. Фармакология гепатопротекторов / В. Е. Новиков, Е. И. Климкина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 2–20.
40. Новиков В. Е. Влияние гипоксена на морфо-функциональное состояние печени при экзогенной интоксикации / В. Е. Новиков, Е. И. Климкина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 5. – С. 43–45.
41. Пожилова Е. В. Активные формы кислорода в физиологии патологии клетки / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков, О. С. Левченкова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 13–22.
42. Тургенева Л. Б. Лечение воспалительных заболеваний пародонта мексидолом / Л. Б. Тургенева, В. Е. Новиков, Е. В. Пожилова // Патогенез. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 67.
43. Forstermann U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Forstermann, W. S. Sessa // European Heart Journal. – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 829–837.
44. Новиков В. Е. Возможности фармакологической нейропротекции при черепно-мозговой травме / В. Е. Новиков // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7, № 2. – С. 1500–1509.

45. Новиков В. Е. Влияние веществ с ноотропной активностью на окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга при острой черепно-мозговой травме / В. Е. Новиков, Л. А. Ковалева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1997. – Т. 60, № 1. – С. 59–61.
46. Новиков В. Е. Влияние ноотропов на функцию митохондрий мозга в динамике черепно-мозговой травмы в возрастном аспекте / В. Е. Новиков, Л. А. Ковалева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – Т. 61, № 2. – С. 65–68.
47. Луканина С. Н. Оценка эффективности управления механизмами нефропатии при длительном применении глюкокортикоидов / С. Н. Луканина, А. В. Сахаров, А. Е. Просенко, К. В. Жучаев // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2016. – № 5. – С. 195–206.
48. Brune B. Nitric oxide and its role in apoptosis / B. Brune, A. von Knethen, K. B. Sandau // European Journal of Pharmacology. – 1998. – Vol. 351, № 3. – P. 261–272.
49. Беленичев И. Ф. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник. – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2009. – 262 с.

**NOS-DEPENDENT MECHANISM OF DAMAGE TO THE STRUCTURAL
ELEMENTS OF NEPHRONS IN RATS WITH GLUCOCORTICOID-INDUCED
OXIDATIVE STRESS**

Lukanina S. N., Sakharov A. V., Prosenko O. I.

*Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia
E-mail: lukanina.lukanina@yandex.ru*

The work is devoted to the study of iNOS-dependent molecular mechanisms of violation of the structural and functional organization of the kidneys of rats during oxidative stress induced by prolonged use of glucocorticoids. The objects of the study were male Wistar rats, which were divided into 4 groups: intact, control and 2 comparison groups. Animals of the control and two comparison groups were daily administered an aqueous suspension of Prednisone Nycomed synthetic glucocorticoid (Nycomed Austria GmbH, Linz, Austria) at a dose of 50 mg / kg daily for 14 days using an intragastric probe, initiating the development of oxidative stress in them. For the purity of the experiment and the standardization of manipulations associated with the introduction of substances into the organism, 0.2 ml of tap water was injected into the rats of the first comparison group three hours after prednisolone. Animals of the second comparison group (2 CG) according to a similar scheme received the antioxidant “Tiofan” (Association “Novosibirsk Institute of Antioxidants”, Novosibirsk, Russia) (at a dose of the active substance 100 mg / kg of weight), dissolved in 0.2 ml of a brand-name vegetable oil Altero Golden. Due to the fact that “Tiofan” is a fat-soluble antioxidant, only antioxidant solvent, vegetable oil (0.2 ml) was intragastrically administered to rats of the control group after taking prednisolone. At the end of the experiment on day 15, equal half of the left kidney was taken from the animals of all groups. An immunohistochemical study of the kidney samples and the assessment of the optical density of the expression products by iNOS nephrons cells were carried out in accordance with the standard protocol. Antibodies to inducible NO-synthase (Rabbit Monoclonal, Clone NameSP126,

Spring Bioscience Corporation, USA) were used in the recommended dilutions. Detection of immune complexes was performed in a biotinless detection system using peroxidase (Spring Bioscience Corporation, USA). In the samples of kidneys of rats of the intact group, the immunohistochemical pattern according to the degree of iNOS expression was characterized as negative, i.e. obvious morphofunctional disorders in the structural elements of the renal bodies and the nephron tubules were not detected. In the preparations of the kidneys of animals with long-term glucocorticoids, a significant increase in the expression level of iNOS was detected. The localization of immunopositive sites is found mainly in the cortical substance of the kidney, in the epithelial cells of the proximal and distal nephron tubules. It was found that the number of immunopositive cells in the kidney tissue of animals treated with the antioxidant "Tiofan" was significantly less, and the intensity of the IHC reaction was significantly lower than in rats who took only glucocorticoids. Prolonged use of glucocorticoids leads to an increase in the expression of the inducible isoform of NO synthase, overproduction of nitric oxide and the death of tubular epithelial cells of the nephron of the cortex substance. The use of polyfunctional sulfur-containing antioxidant "Tiofan" has a nephroprotective effect, limits the development of obvious NOS-dependent damage to the structural elements of nephrons.

Keywords: oxidative stress, glucocorticoids, kidney, iNOS, antioxidants.

References

1. Pak L. B., Dubikov A. I., Kabantseva T. A., Vasilyuk A. A., Grigoryan O. M., Apoptosis and kidney pathology, *Nephrology*, **17**, 4 (2013).
2. Smirnov A. V., Dobronravov V. A., Kayukov I. G., Yesayan A. M. Chronic kidney disease: further development of the concept and classification, *Nephrology*, **4** (2007).
3. Tomilina N. A., Bikbov B. T. Epidemiology of chronic renal failure and new approaches to the classification and assessment of the severity of chronic progressive kidney diseases, *Therapeutic archive*, **6** (2005).
4. Tsalikova F. D. Apoptosis in the pathogenesis of nephropathies, *Nephrology and dialysis*, **3** (1999).
5. Kempson S., Thompson N., Pezzuto L., Glenn Bohlen H. Nitric oxide production by mouse renal tubules can be increased by a sodium-dependent mechanism, *Nitric Oxid*, **17**, 1, (2007).
6. Silva G., Beierwaltes W. H., Garvin J. L. Extracellular ATP stimulates NO production in rat thick ascending limb, *Hypertension*, **47** (2006).
7. Kutyryna I. M. Modern aspects of the pathogenesis of renal arterial hypertension, *Nephrology*, **4**, 1 (2000).
8. Markov Kh. M. Nitric oxide in the physiology and pathology of the kidneys, *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, **7** (1996).
9. Blantz R. C., Deng A., Lortie M., Munger K., Vallon V., Gabbai F. B., Thomson S. C. The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration, *Kidney Int.*, **61** (2002).
10. Gustavo R. A., Ortiz P. A. Constitutive endocytosis and recycling of NKCC2 in rat thick ascending Limbs, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **299** (2010).
11. Karimova R. G., Bilalov I. N., Mukhamedzhanova A. G. Hydrouretic function of the kidneys at different levels of activity of the nitric oxide system, *Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman*, **215** (2013).
12. Karimova R. G., Bilalov I. N. Ionouretic function of the kidneys with an increase in the production of nitric oxide, *Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman*, **217** (2014).
13. Vousden K. H., Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53, *Cell*, **137** (2009).
14. Yarilin A. A. Apoptosis: the nature of the phenomenon and its role in health and disease, *Actual problems of pathophysiology*, 13–56 (M.: Medicine, 2001).

15. Qiu L. Q., Sinniah R., Hsu S. I. Coupled induction of iNOS and p53 upregulation in renal resident cells may be linked with apoptotic activity in the pathogenesis of progressive IgA nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 8 (2004).
16. Bitar M. S., Wahid S., Mustafa S., Al-Saleh E., Dhaunsi G. S., Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes, *Eur. J. Pharmacol.*, **511**, 1 (2005).
17. Creager M. A., Lüscher T. F., Cosentino F., Beckman J. A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I, *Circulation*, **108**, 12 (2003).
18. Endemann D. H., Schiffrin E. L. Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus, *Curr. Hypertens. Rep.*, **6**, 2 (2004).
19. Goldin A., Beckman J. A., Schmidt A. M., Creager M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury, *Circulation*, **114**, 6 (2006).
20. Dzugkoev S. G., Kozyrev K. M., Gumanova N. G., Dzugkoeva F. S. Effect of afobazole on biochemical and histopathomorphological parameters of endothelial dysfunction in experimental diabetes mellitus in rats, *Biomedical Chemistry*, **58**, 4 (2012).
21. Valeeva I. Kh., Ziganshina L. E., Burnashova Z. A., Ziganshin A. U. Effect of dimephosphone and xydifon on lipid peroxidation and antioxidant system in rats treated with prednisolone for a long time, *Experimental and Clinical Pharmacology*, **65**, 2 (2002).
22. Melekhina E. V., Osmanov I. M., Neudakhin E. V., Tabolin V. A., Volkov I. E., Sumakova I. A., Dlin V. V. Nitric oxide in kidney damage in children with insulin-dependent diabetes mellitus, *Nephrology and dialysis*, **3**, 2 (2001).
23. Pozhilova E. V., Novikov V. E. Nitric oxide synthase and endogenous nitric oxide in cell physiology and pathology, *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*, **14**, 4 (2015).
24. Christian D., Arnfried U. K., Markus P. S. Effect of angiotensin receptor blockade on central haemodynamics in essential hypertension: results of a randomised trial, *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, **9** (2008).
25. Herrera M., Silva G., Garvin J. L. A high-salt diet dissociates NO synthase-3 expression and NO production by the THAL, *Hypertension*, **47** (2006).
26. Mattson D. L., Wu F. Nitric oxide synthase activity and isoforms in rat renal vasculature, *Hypertension*, **35** (2000).
27. Ortiz P. A., Garvin J. L. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport, *Am. J. Physiol Renal Physiol.*, **282** (2002).
28. Wilcox C. S., Welch W. J., Murad F., Gross S. S., Taylor G., Levi R., Schmidt H. W. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89** (1992).
29. Mishra P. K., Raghuram G. V., Panwar H. Mitochondrial oxidative stress elicits chromosomal instability after exposure to isocyanates in human kidney epithelial cells, *Free Radic. Res.*, **43**, 8 (2009).
30. Vaseva A. V., Moll U. M. The mitochondrial p53 pathway, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1787**, 5 (2009).
31. Suzuki T., Matsusaka T., Nakayama M. Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis, *Am. J. Pathol.*, **174**, 5 (2009).
32. Lukanina S. N. Evaluation of the effectiveness of protecting the kidneys of rats with antioxidant thiophane under oxidative stress, *Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University*, **11** (2010).
33. Lukanina S. N., Sakharov A. V., Prosenko A. E., Zhuchayev K. V. Features of hydro- and ionoretic functions of rat kidneys under oxidative stress, *Bulletin of Tver State University., Series "Biology and Ecology"*, **1** (2017).
34. Savill J. Apoptosis and the Kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **5** (1994).
35. Chang I. Y., Kim J. N., Jun J. Y. Repression of apurinic/apyrimidinic endonuclease by p53-dependent apoptosis in hydronephrosis-induced rat kidney, *Free Radic. Res.*, **45**, 6 (2011).
36. Dedkova E. N., Blatter L. A. Trimetazidine effects on the mitochondrial metabolism during rabbit heart failure, *The Journal of Physiology*, **587**, 4 (2009).
37. Omar S. A., Webb A. G. Nitrite reduction and cardiovascular protection, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **73** (2014).
38. Filimonova M. V., Yuzhakov V. V., Shevchenko L. I. Experimental study of the antitumor activity of a new nitric oxide synthase inhibitor T1023, *Molecular Medicine*, **1** (2015).

39. Novikov V. E., Klimkina E. I. Pharmacology of hepatoprotectors, *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy*, **4**, 1 (2005).
40. Novikov V. E., Klimkina E. I. Effect of hypoxen on the morpho-functional state of the liver during exogenous intoxication, *Experimental and Clinical Pharmacology*, **72**, 5 (2009).
41. Pozhilova E. V., Novikov V. E., Levchenkova O. S. Reactive oxygen species in the physiology of cell pathology, *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*, **14**, 2 (2015).
42. Turgeneva L. B., Novikov V. E., Pozhilova E. V. Treatment of inflammatory periodontal diseases with mexidol, *Pathogenesis*, **9**, 3 (2011).
43. Forstermann U., Sessa W. S. Nitric oxide synthases: regulation and function, *European Heart Journal*, **33**, 7 (2012).
44. Novikov V. E. Possibilities of pharmacological neuroprotection in traumatic brain injury, *Psychopharmacology and biological narcology*, **7**, 2 (2007).
45. Novikov V. E., Kovaleva L. A. Effect of substances with nootropic activity on oxidative phosphorylation in brain mitochondria in acute traumatic brain injury, *Experimental and Clinical Pharmacology*, **60**, 1 (1997).
46. Novikov V. E., Kovaleva L. A. Effect of nootropics on the function of brain mitochondria in the dynamics of traumatic brain injury in the age aspect, *Experimental and Clinical Pharmacology*, **61**, 2 (1998).
47. Lukanina S. N., Sakharov A. V., Prosenko A. E., Zhuchaev K. V. Evaluation of the effectiveness of controlling the mechanisms of nephropathy with long-term use of glucocorticoids, *Bulletin of the Novosibirsk State Pedagogical University*, **5** (2016).
48. Brune B., von Knethen A., Sandau K. B. Nitic oxide and its role in apoptosis, *European Journal of Pharmacology*, **351**, 3 (1998).
49. Belenichev I. F., Cherniy V. I., Kolesnik Yu. M. Rational neuroprotection, 262 (Donetsk: Publisher Zaslavsky A. Yu., 2009).