УДК 615.254.7-092.4:612.398.192:616.613-003.7 doi.org:10.31684/2541-8475.2019.1(13).20-24

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ НЕФРОЦИТОВ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА ПЕПТИДНЫМ КОМПЛЕКСОМ ИЗ ТКАНЕЙ СВИНЫХ ПОЧЕК

Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

Жарикова Г.В., Брюханов В.М., Бобров И.П., Мазко О.Н.,
Макарова О.Г., Лепилов А.В., Жариков А.Ю., Венергольд Е.В.

Цель исследования – изучить влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на морфофункциональную активность ядрышковых организаторов нефроцитов в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза.

Эксперименты проведены на 24 самцах крыс стока Вистар, разделенных поровну на 2 группы: контрольная (6 недель моделирования оксалатного нефролитиаза) и подопытная (6 недель моделирования оксалатного нефролитиаза + введение пептидного комплекса из тканей свиных почек в дозе 15 мг). Выявление ядрышковых организаторов осуществлялось модифицированным методом Y. Daskal.

Эксперименты показали, что при применении пептидного комплекса из тканей свиных почек отмечалось усиление биосинтетических процессов в нефроцитах, т.к. наблюдалось увеличение морфофункциональной активности ядрышковых организаторов клеток почки по сравнению с контролем. Повышение активности ядрышкового аппарата клеток проявлялось как увеличением числа ядрышек и числа гранул серебра (фибриллярных центров) в них, так и увеличением содержания клеток с большим количеством фибриллярных центров на 1 ядро.

Ключевые слова: *пептидный комплекс из тканей свиных почек, нефролитиаз, ядрышковые организаторы.*

The aim of the present research is to study the influence of the peptide complex of pig kidneys tissue on the morphofunctional activity of nucleolar organizers of nephrocytes under experimental oxalate nephrolithiasis.

Experiments were conducted on 24 male Wistar rats which were divided into 2 groups: a control group (6 weeks of oxalate nephrolithiasis modeling) and a test group (6 weeks of oxalate nephrolithiasis modeling + injecting the peptide complex at a dose of 15 mg). Detecting of nucleolar organizers was carried out with a modified Y. Daskal's method.

Studies revealed that with the use of the peptide complex of pig kidneys tissue an enchancement of biosynthetic processes in nephrocytes could be noticed, as an increase in morphofunctional activity of nucleolar organizers of kidney cells could be observed in comparison with a control group. An increase in activity of nucleolar cell apparatus appeared both in their increase of number of nucleoli and number of silver granules (core structures) and the increase of cell count with a large number of core structures for one nucleus.

Key words: *peptide complex of pig kidneys tissue, nephrolithiasis, nucleolar organizers.*

Разработка новых эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения мочекаменной болезни – актуальная задача современной фармакологии и урологии.

На сегодняшний день существуют экспериментально обоснованные предпосылки для создания нового антилитогенного средства пептидной природы. Ранее нами был получен экспериментальный пептидный комплекс из лиофилизата тканей свиных почек, идентифицирован его аминокислотный состав и апробировано лечебное действие на экспериментальной модели оксалатного нефролитиаза. Оказалось, что трехнедельное пероральное введение полученного пептидного комплекса в дозе 15 мг сопровождалось разрушением крупных и средних уролитов до мелкой пылевидной зернистости [1, 2].

Как известно, в почках образуются и функционируют так называемые ингибиторы кристаллизации – высокомолекулярные белки, препятствующие камнеобразованию [3]. Не исключено, что вводимые пептиды, обладая ядерной направленностью действия, могли стимулировать образование клеточных белков, и в том числе – ингибиторов кристаллизации. В этой связи мы решили изучить влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на биосинтетические процессы в нефроцитах в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза.

Цель настоящего исследования – изучить влияние пептидного комплекса из тканей сви-

ных почек на морфофункциональную активность ядрышковых организаторов нефроцитов в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза.

Материалы и методы

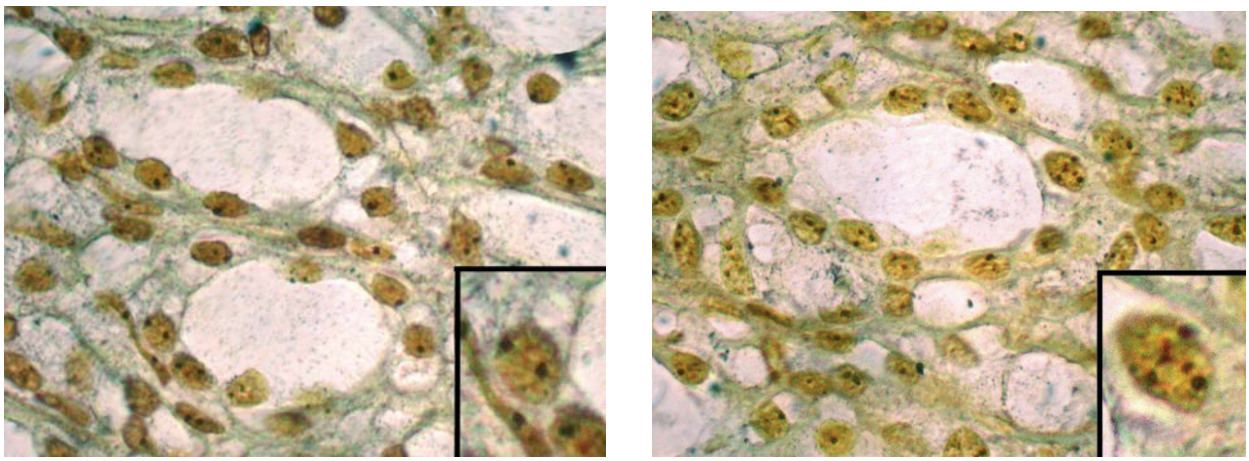
Исследование проводилось на 24 самцах крыс стока Вистар массой 200–250 г, находившихся в условиях стандартной лабораторной диеты, получая ежедневно 30–40 г корма для лабораторных грызунов, производимого ЗАО «Ассортимент-Агро» под торговой маркой «Чара». Животные были разделены поровну на две группы: контрольная и подопытная. В контрольной группе осуществлялось моделирование экспериментального оксалатного нефролитиаза без введения фармакологически активных веществ [4]. Согласно используемой модели нефролитиаза, крысы ежедневно получали в виде питья в свободном доступе 1%-й водный раствор этиленгликоля. Крысам подопытной группы в аналогичных условиях моделирования нефролитиаза с 22-го по 42-й дни опыта перорально через зонд в виде крахмальной взвеси в дозе 15 мг вводился пептидный комплекс, полученный методом уксуснокислой экстракции из лиофилизата тканей свиных почек.

Хроматографический анализ пептидного комплекса из тканей свиных почек методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе «Милихром-А02» без проведения гидролиза показал, что в его состав входит порядка 30 хроматографически значимых пиков в диапазоне объема удерживания от 0 до 2500 мкл. Методом капиллярного электрофореза на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105М» с положительной полярностью высокого напряжения в солянокислом гидролизате полученного пептидного тифицированы 14 аминокислот: аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лейцин, изолейцин, метионин, валин, пролин, треонин, серин, аланин, глицин с суммарной массовой долей 49,778%.

По истечении шести недель эксперимента крысы обеих групп подвергались декапитации под эфирным наркозом с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.). Материалом исследования послужила почка крысы. Орган фиксировали в 10%-ом растворе формалина, обрабатывали по стандартной методике, заливали в парафин.

Для гистологического исследования ткань почки фиксировали в 10%-ом растворе нейтрального формалина, проводили по стандартной методике и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином, эозином и гистохимическим методом на ядрышковые организаторы. Выявление ядрышковых организаторов осуществляли по двухступенчатому методу Daskal Y. и соавт. [5] в нашей модификации [6, 7]. При увеличении х1000 под масляной иммерсией микроскопа высчитывали число ядрышек и число гранул серебра в ядрышках на 1 ядро, строили гистограммы распределения клеток по числу гранул на 1 ядро. В каждом случае исследовали не менее 50 клеток нефротелия.

Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 10.0. При нормальном распределении данных при проверке статистических гипотез применяли методы параметрической статистики (t-критерий Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро-Уилка $W=0,89$, $p<0,01$), то применяли тест Колмогоро-



1а 1б

Рисунок 1 – Микрофотография ядрышковых организаторов в нефроцитах (в рамках – увеличенный фрагмент микрофотографии). Окраска нитратом серебра по Y. Daskal в модификации Боброва И.П. Увеличение х1000.
1а – Небольшое количество в контрольной группе исследования.
1б – Большое количество ядрышковых организаторов в подопытной группе исследования.

ва-Смирнова или U-критерий Манна-Уитни. Данные считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты по оценке морфофункциональной активности ядрышковых организаторов клеток собирательных трубочек почечного сосочка показали, что в контрольной группе число гранул серебра в ядрышках на 1 ядро составило 2,5±0,1, пределы колебаний числа гранул варьировали от 1 до 3 гранул, модальное значение составило 3 гранулы. Количество ядрышек в ядрах клеток в среднем составило 2,0±0,1, пределы колебаний числа ядрышек варьировали от 1 до 3 ядрышек, модальное значение составило 2 ядрышка (рисунок 1а).

При распределении клеточных элементов в зависимости от количества гранул серебра на 1 ядро выявлено, что гистограмма распределения имеет сдвиг влево и характеризуется высокими пиками в областях клеток, имеющих 2 и 3 гранулы на 1 ядро (рисунок 2).

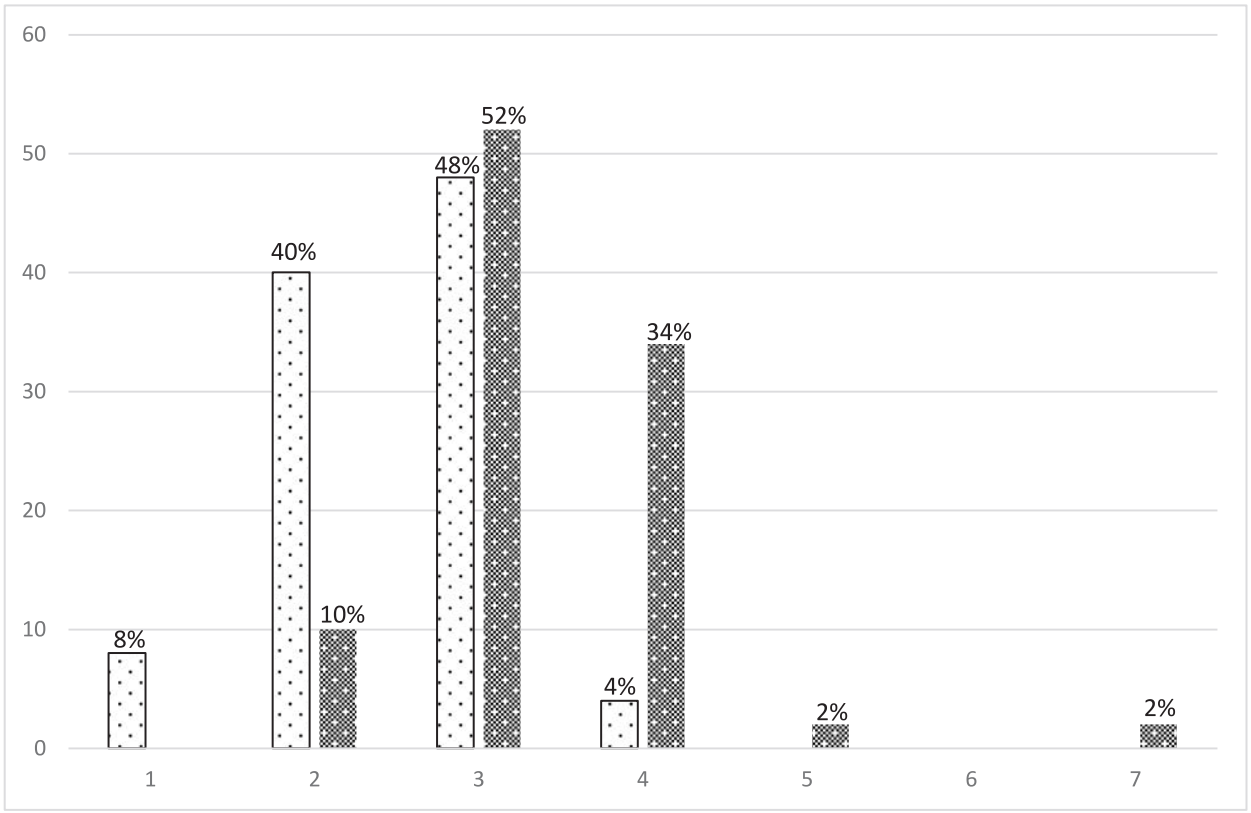


Рисунок 2 – Гистограмма, характеризующая распределение клеток по количеству гранул серебра в клетках почки.
Примечание: по оси абсцисс – число гранул серебра, по оси ординат – процент клеток.

– контрольная группа; – подопытная группа.

На этом фоне по результатам исследования почек крыс подопытной группы, где 3 недели вводился пептидный комплекс из тканей свиных почек, были получены свидетельства существенного усиления биосинтетических процессов.

Оказалось, что в подопытной группе по сравнению с контролем заболевания выявлялось достоверное ($p=0,0000001$) возрастание среднего числа гранул серебра в ядрышках на 1 ядро до 3,4±0,1, пределы колебаний числа гранул варьировали от 2 до 7 гранул, модальное значение составило 3 гранулы. Количество ядрышек в данной группе в среднем было также достоверно ($p=0,000035$) больше, чем в контроле (2,7±0,1), пределы колебаний числа ядрышек варьировали от 1 до 4 ядрышек, модальное значение составило 3 ядрышка (рисунок 1б).

При распределении клеточных элементов в зависимости от количества гранул серебра на 1 ядро в данной группе выявлено, что гистограмма распределения имела сдвиг вправо и характеризовалась высокими пиками в областях клеток, имеющих 3 и 4 гранулы на 1 ядро. При этом в сравнении с контрольной группой появлялись клетки с 7 гранулами (2%) на 1 ядро. Клетки с 1-ой гранулой на 1 ядро отсутствовали, а содержание клеток с двумя гранулами было уменьшено (рисунок 2).

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что при применении пептидного комплекса из тканей свиных почек отмечалось увеличение морфофункциональной активности ядрышковых организаторов клеток почки по сравнению с контролем. Повышение активности ядрышкового аппарата клеток проявлялось как увеличением числа ядрышек и числа гранул серебра (фибриллярных центров) в них, так и увеличением содержания клеток с большим количеством фибриллярных центров на 1 ядро.

Как известно, ядрышко – это динамичная структура, его морфология тесно связана с биогенезом рибосом: синтезом прерибосомальной РНК, процессингом и миграцией РНП-частиц в нуклеоплазму, а затем и в цитоплазму. Чем выше активность ядрышка и чем больше в нем фибриллярных центров, тем выше синтез белка в клетке и ее биосинтетическая активность [8]. Поэтому результаты проведенных нами экспериментов свидетельствуют о существенном усилении биосинтеза белка в нефроцитах. С одной стороны, это хорошо согласуется с современными представлениями о механизмах клеточного действия короткоцепочечных пептидов и аминокислот. Считается, что эти вещества могут влиять на генетическую регуляцию синтеза нуклеиновых кислот и, как следствие – на рибосомальный синтез белка [8]. В то же время установленный эффект может внести понимание в механизмы антилитогенного действия пептидного экстракта из тканей свиных почек. Так, общее усиление клеточного синтеза белка может сопровождаться ростом количества и активности внутрипочечных ингибиторов кристаллизации: остеопонтина, протеина Тамма-Хорсфалла и бикунина, свойства которых хорошо описаны в современней литературе [3]. Кроме того, в последние годы все большее внимание уделяется изучению органической матрицы почечного камня. Эксперименты показывают, что матрица может содержать десятки и даже сотни эндогенных белков, в том числе стимуляторы и ингибиторы кристаллизации [10]. Сегодня существует мнение, что модификация структуры и функции матрицы камня может препятствовать литогенезу. Сопоставляя выявленный ранее литолитический эффект пептидного комплекса из тканей свиных почек и результаты настоящего исследования, можно предположить, что усиление биосинтеза белка в нефроцитах имеет весомое значение для возникновения антилитогенного эффекта пептидного комплекса из тканей свиных почек.

Выводы

1. Трехнедельное применение пептидного комплекса из тканей свиных почек при экспериментальном оксалатном нефролитиазе сопровождается увеличением морфофункциональной активности ядрышковых организаторов нефроцитов по сравнению с контролем заболевания.
2. Повышение активности ядрышкового аппарата клеток проявлялось как увеличением числа ядрышек и числа гранул серебра (фибриллярных центров) в них, так и увеличением содержания клеток с большим количеством фибриллярных центров на 1 ядро.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы:

1. Жариков А.Ю., Киселев В.И., Салдан И.П., Жарикова Г.В., Лепилов А.В., Бобров И.П. Морфологическая оценка влияния пептидного комплекса из тканей свиных почек на течение экспериментальной мочекаменной болезни. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 164(8): 237-240.
2. Жарикова Г.В., Жариков А.Ю., Киселев В.И., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Кирьякова В.О. Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на показатели свободнорадикального окисления при экспериментальной мочекаменной болезни. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2017; 37(2): 17-21.
3. Зверев Я.Ф., Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Лампатов В.В. Модуляторы оксалатного нефролитиаза. Ингибиторы кристаллизации. *Нефрология.* 2010; 14(1): 29-49.
4. Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза. *Нефрология.* 2008; 12(4): 28-35.
5. Daskal Y, Komaromy L, Busch H. Isolation and partial characterization of perichromatin granules. A unique class of nuclear rnp particles. *Experimental Cell Research*. 1980; 126(1): 39-46.
6. Бобров И.П., Авдалян А.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Гервальд В.Я., Долгатов А.Ю., Самуйленкова О.В., Ковригин М.В., Кобяков Д.С. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах. *Архив патологии.* 2010; 72(3): 35-37.
7. Бобров И.П., Авдалян А.М., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Брюханов В.М., Дорошенко В.С., Гервальд В.Я., Долгатов А.Ю., Ковригин М.В. Модифицированный метод выявления аргирофильных белков области ядрышкового организатора на парафиновых срезах. *Морфология.* 2010; 138(5): 65-67.
8. Chelidze PV. Fibrillar centres in the nucleoli of cultured pek cells after the action of actinomycin D. Цитология. 1982; 24(2): 137-143.
9. Хавинсон В.Х., Соловьев А.Ю., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Механизм биологической активности коротких пептидов: проник-

новение в клетку и эпигенетическая регуляция экспрессии генов. *Успехи современной биологии*. 2013; 133(3): 310-316.

10. Kaneko K, Nishii S, Izumi Y, Yasuda M, Yamanobe T, Fukuuchi T, Yamaoka N, Horie S. Proteomic Analysis after Sequential Extraction of Matrix Proteins in Urinary Stones Composed of Calcium Oxalate Monohydrate and Calcium Oxalate Dihydrate. *Analytical Sciences*. 2015; 31(9): 935-942.

Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Жарикова Ганна Викторовна, преподаватель кафедры общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, д. 40.
Тел.: (3852) 566938.
E-mail: ganna1704@mail.ru

Информация об авторах

Бобров Игорь Петрович, с.н.с. морфологической лаборатории Центра медико-биологических исследований Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, д. 40.
Тел.: (3852) 669927.
E-mail: science@agmu.ru

Брюханов Валерий Михайлович - д.м.н., профессор, профессор кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета.
656038, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.
Тел.: (3852) 566812.
Email: science@agmu.ru

Мазко Олеся Николаевна, к.м.н., с.н.с. лаборатории биомедицины Центра медико-биологических исследований Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, д. 40.
Тел.: (3852) 669927.
E-mail: olesia.mazko@yandex.ru

Макарова Олеся Геннадьевна, к.м.н., с.н.с. лаборатории биомедицины Центра медико-биологических исследований Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, д. 40.
Тел.: (3852) 669927.
E-mail: olesia552@mail.ru

Лепилов Александр Васильевич, д.м.н., заведующий кафедрой судебной медицины имени профессора В.Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, д. 40.
Тел.: (3852) 408439.
Email: science@agmu.ru

Жариков Александр Юрьевич, д.б.н., доцент, заведующий кафедрой фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656056, г. Барнаул, ул. Папанинцев, д. 126.
Тел.: (3852) 241859.
E-mail: zharikov@agmu.ru

Венергольд Елена Владимировна - студентка 5 курса фармацевтического факультета Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.
Тел.: (3852) 566869.
Email: science@agmu.ru