

мальних каналців з пригнобленням транспорту неорганічних і органічних речовин, води. Виказано припущення, що разом із специфічною дією на нирки кожного з вивчених чинників, в їх ефектах присутні загальні патогенетичні механізми. Дія більшості з перерахованих чинників, супроводжується активацією перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), яке також відповідало не за вторинне пошкодження проксимальних каналців. Другим механізмом пошкодження є перевантаження білком, що ре-

абсорбується, яке зростає внаслідок підвищеної фільтрації білка. Отже, в патогенезі пошкоджень проксимального відділу нефрона при токсичних і інших нефротропних діях, прямі токсичні ефекти поєднуються з активацією ПОЛ і протеоліза, а останній обумовлений лабілізацією лізосом.

Пропонується робоча патогенетична класифікація токсичних нефропатій, використання якої може бути корисним при діагностиці і лікуванні токсичних нефропатій.

УДК 616.61-005.1:616-092:616.61.612.017.4

## РОЛЬ АПОПТОЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ

*Шафран Л.М.*

*Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса, Украина*

**Актуальность темы.** Токсические нефропатии привлекают к себе все большее внимание научных работников и практических врачей разных специальностей. Это обусловлено быстрым ростом числа обладающих нефротоксичностью промышленных ядов, ксенобиотиков, лекарственных, рентгено- и радиоконтрастных, противоопухолевых препаратов, с одной стороны, и расширением представлений об их мишенях в системе почек и мочевыводящих путей, с другой [1-3]. Перечень первичных и вторичных нефротоксикантов в настоящее время превышает 300 наименований [4]. С ними контактирует более 10 млн. человек ежегодно, среди которых частота только такого грозного осложнения, как острая почечная недостаточность (ОПН), составляет до 20% [5]. Поэтому ранняя диагностика нефротоксикозов, выяснение и уточнение молекулярных, клеточных механизмов развития, установление соотношений типа «структура – активность», позволят решить не только важные и актуальные в научно-теоретическом плане аспекты проблемы, но и существенно повысить эффективность лечебных и профилактических мероприятий.

Нефротоксиканты поражают проксимальные, дистальные каналцы, мозговое вещество нефрона, приводят к развитию оксидативного стресса, изменениям энергетического обмена, минерального и электролитного баланса за счет прямого воз-

действия на проницаемость мембран, развития клеточного ацидоза, дисфункций клеточных органелл, а также дизрегуляторных нарушений, в первую очередь, в ренин-альдостерон-ангиотензиновой системе [6-8]. При этом необходимо подчеркнуть, что при столь значительном разнообразии включаемых в патогенез биохимических и физиологических механизмов, морфологические изменения довольно стереотипны и характеризуются в основном как некроз проксимальных каналцев, который является наиболее часто фиксируемым маркером токсических нефропатий [9, 10]. Не случайно, Б. Брэннер [1] и другие цитированные выше авторы неоднократно подчеркивали, что диагностика этого вида почечной патологии является достаточно трудной задачей.

Традиционно в центре внимания нефрологов находятся клинически выраженные формы почечной патологии, симптоматика которых, как правило, укладывается в общепринятые категории, такие как «гломерулонефрит», «нефротический», «тубуло-интерстициальный» синдромы, «острая почечная недостаточность», «некроз проксимальных каналцев» и т.п. [1, 2, 7, 11]. Не оспаривая правомерности и целесообразности такого подхода для клинической практики, следует напомнить о необходимости более широкого использования новых возможностей лабораторной диагностики, отхода от общепринятых штампов

прежде всего за счет результатов изучения молекулярных и биохимических механизмов нефропатий, особенно и в первую очередь токсического генеза. Сложная структура и полимодальность физиологических функций нефрона и почек в целом вызывают необходимость междисциплинарного подхода при выявлении ранних проявлений функциональных нарушений при нефротоксикозах и оценке их значимости. Это связано, с одной стороны, с нарушением принципа «доза – время – эффект» при действии малых и сверхмалых доз и концентраций нефротоксикантов, типичных для современных условий контакта населения с химическими веществами, и существенным различием в выборе информативных биомаркеров для изучения патогенетических механизмов острых, подострых, субхронических и хронических нефропатий, с другой [12-15]. Речь идет скорее не о появлении и раскрытии новых механизмов, а об изменении наших представлений о пространственно-временных взаимоотношениях в обычных для данной функциональной системы программах жизнедеятельности, клеточных циклах, межклеточном взаимодействии, внутриорганной и межорганной интеграции.

16

Большой интерес в этом плане представляет проблема апоптоза, который играет важную роль в патогенезе токсических нефропатий, однако остается изученной крайне недостаточно. Под апоптозом обычно понимают сложный процесс программированной гибели клеток, в развитии которого важную роль отводят внутриклеточным приобретенным и генетически обусловленным механизмам [16,17]. Огромный и постоянно возрастающий интерес к проблеме апоптоза, публикация многочисленных, разнообразных по направленности, содержанию, значимости разнородных и подчас противоречивых данных делает невозможным их обобщение даже в масштабах монографических изданий, сборников научных работ и посвященных апоптозу форумов [18-20], поскольку и сам термин «апоптоз» объединил широкий круг явлений, разных по этиологии, патогенезу и значению для жизнедеятельности биосистем. И хотя программируемая смерть клетки как элемент ее физиологического цикла носит защитный характер (элимина-

ция «отработавших» на определенном этапе жизнедеятельности клеток и их клонов, недопущение пролиферации функционально и генетически неполноценных предсуществующих и образующихся под действием экзогенных факторов клеток), механизмы перехода апоптоза в разряд патологических процессов, в том числе и при токсических нефропатиях, остаются недостаточно изученными.

Как включается присущий в первую очередь всем делящимся клеткам апоптоз в патогенез этого вида патологии почек, каковы его этапы и лежащие в их основе молекулярно-клеточные и метаболические изменения, каковы пространственно-временные параметры этого прогрессирующего и склонного к саморазвитию физиологического и/или патологического процесса, как он соотносится с другими видами клеточной смерти (некроз, аутофагоцитоз)?

Эти и многие другие вопросы патогенеза токсических нефропатий остаются недостаточно изученными, что отрицательно сказывается на качестве неотложной и плановой лечебно-профилактической помощи пострадавшим. Особенно актуальным является вопрос о составе, происхождении, времени появления и последовательности биохимических изменений при токсических нефропатиях, так как именно эти позиции могут определять важные диагностические, клинические и прогностические аспекты указанных видов патологии почек. Изучение апоптоза и его физиолого-биохимических и морфологических коррелятов в контексте патогенетических механизмов нефротоксичности на экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* позволяет в значительной мере восполнить существующий пробел.

Учитывая вышеизложенное, **целью настоящей работы** явилось обобщение результатов собственных исследований и данных литературы последних лет по изучению биохимических коррелятов развития апоптоза на ранних стадиях поражения почек у экспериментальных животных и на моделях *in vitro*, вызываемых преимущественно тяжелыми металлами в малых дозах для выяснения роли апоптоза в патогенезе токсических нефропатий и использования наиболее информативных биомар-

керов в клинической практике.

**Материалы и методы.** Проанализированы и сопоставлены с данными литературы результаты проведенных в нашей лаборатории экспериментальных исследований на белых беспородных крысах-самцах с исходной массой тела  $200 \pm 20$  г, получавших стандартное питание, в остром, подостром и субхроническом экспериментах *in vivo* однократно либо повторно (5 и 25 введений) внутрижелудочно вводили ацетат свинца (Pb) в дозах 50; 25; 12,5; 5 и 1 мг/кг массы тела (по металлу) в водном растворе, хлорид кадмия (Cd) или хлорид ртути (Hg) в дозах 10; 5,0; 1,0; 0,1 и 0,05 мг/кг массы тела (по металлу). Ряд опытов проводили *in vitro* на переживающих отрезках кишки крыс и митохондриальной фракции гомогенатов печени и почек, выделенной дифференциальным центрифугированием в градиенте сахарозы.

У животных опытных и контрольных групп определяли содержание свинца, цинка, кальция в крови, моче, а после декапитации крыс под легким нембуталовым наркозом также и в тканях печени, почек, головного мозга, бедренной кости методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии с электротермической атомизацией на приборе AAS-3 (Carl Zeiss, Jena) с приставкой «Грфит-2М» с автоматическим дозатором и пламенным вариантом этого метода на приборе «Сатурн-3П», а также методом холодного пара на модифицированном приборе «Юлия» [21,22]. Проводили общий анализ крови и мочи в динамике эксперимента. Биохимические исследования [23] включали: определение SH- и SS-групп, металлотионеина (МТН) в крови, д-аминолевулиновой кислоты (АЛК) и копропорфина в моче; показатели интенсивности процессов свободно-радикального окисления по уровню перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты [ДК], ТБК-тест [МДА]); активность ферментов системы антиоксидантной защиты (каталаза [КТ, КФ.1.11.1.6], супероксиддисмутаза [СОД, КФ.1.15.11], глутатионпероксидаза [ГП, КФ.1.11.1.9], глутатионредуктаза [ГР, КФ.1.6.4.2], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [Г-6-ФДГ, КФ.1.1.1.49]), синтез гема (дегидратаза  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты [АЛА-Д], активность цитозольных (лактатдегидрогеназа [ЛДГ, КФ.1.1.2.3], митохон-

дриальных (изоцитратдегидрогеназа [ИЦДГ, КФ.1.1.1.42], малатдегидрогеназа [МДГ, КФ.1.1.1.39], сукцинатдегидрогеназа [СДГ, КФ.1.3.99.1] и цитохромоксидаза [ЦХО, КФ.1.9.3.1]) и лизосомальных ферментов (кислая и щелочная фосфатазы [КФ, КФ.3.1.3.2, и ЩФ, КФ.3.1.3.1], катепсины [КП, КФ.3.4.4.9]) а также проводили морфологические и гистохимические исследования тканей по общепринятым методам [24,25]. Подсчитывали количество эпителиальных клеток, макрофагов и лейкоцитов в культуральной жидкости (среда Хэнкса-199) с переживающими отрезками кишечника крысы и определяли фагоцитарную активность лейкоцитов центрифугата. Результаты исследований обрабатывали методами вариационного и корреляционного анализа с помощью пакета программ в Microsoft Excel [26]. Полученные данные сопоставляли с приведенными в литературе последних лет результатами экспериментальных исследований и клинических наблюдений других авторов для построения концептуально-экспериментальной модели, описывающей вероятную роль апоптоза в патогенезе токсической нефропатий.

**Результаты исследования и их об- суждение.** Проведенные исследования показали, что в распределении ТМ в организме подопытных животных наблюдается закономерная фазовость. В первые часы опыта при остром, подостром и субхроническом введении происходит первичное неспецифическое связывание токсикантов с белками плазмы, мембранами эритроцитов, другими лигандами, а также преимущественное накопление их в печени в первые 5 суток опыта. Затем происходит специфическое связывание ТМ с транспортными белками, индуктивный синтез которых происходит в печени (например, металлотионеины, МТН), перераспределение их содержания в паренхиматозных органах, с опережающим накоплением Cd и неорганических форм Hg преимущественно в почках, а Pb — в печени, костях, кишечнике и почках. Причем, наибольшие концентрации ТМ имеют место в корковой части нефрона, а эпителий проксимальных канальцев выступает в роли основной мишени при оценке клеточной локализации, что согласуется с данными литературы

[1,9,37]. Последнее в значительной мере определяет позицию данных клеточных структур при изучении процессов клеточной смерти в патогенезе нефротоксикозов.

### Апоптоз и другие виды клеточной смерти

Неоспоримый факт массивного некроза эпителия проксимальных канальцев почек при металлотоксикозах и других токсических нефропатиях является хрестоматийным штампом и как бы не требует дальнейшей детализации. Известно [31, 38], что некротические процессы характеризуются ишемией тканей и гипоксией клеток. При этом отмечается рост интрацеллюлярного  $Na^+$ , активация гликолиза, накопление лактата, ацидификация цитоплазмы. Недостаток АТФ приводит к нарушению функционирования ионных каналов (антипорты  $Na^+ \leftrightarrow H^+; Cl^- \leftrightarrow HCO_3^-$ ). Неконтролируемая продукция активных форм кислорода (АКФ) активирует неспецифические  $Na^+$ -каналы, что также способствует набуханию клеток и их последующему лизису. Это наблюдалось и в наших исследованиях.

При действии высоких доз ТМ признаки некротических изменений эпителия проксимальных канальцев почек развиваются в течение первых суток экспозиции, а в опытах *in vitro* на переживающих отрезках кишечника крыс – в течение первого часа воздействия. При гистологическом исследовании почек крыс, получавших Hg, в корковом веществе количество почечных

телец визуально уменьшено; капиллярный клубочек замещен плотным конгломератом эпителиоидных и гистиоцитарных клеток (рис. 1). Часть почечных телец содержит капиллярный клубочек обычного вида с вакуолизацией эндотелия, выраженным полнокровием капилляров. Полость капсулы умеренно расширена. Наружная мембрана целая, несколько утолщена. Проксимальные канальцы коркового вещества частью сохранены. В их просвете видна белковая масса. Эпителий проксимальных канальцев характеризуется набуханием цитоплазмы. В сохранившихся эпителиоцитах определяется набухание ядер и появление мелких вакуолей в цитоплазме. Определяются участки, выполненные обрывками эпителиальной выстилки канальцев, белковыми массами, гистиоцитами. Дистальные канальцы характеризуются сохраненной структурой. В препаратах, изготовленных на 3-5 сутки экспозиции Hg отмечены также признаки воспалительной реакции.

В то же время в препаратах почек животных, получавших малые дозы ТМ, в первые часы воздействия в эпителии проксимальных канальцев обнаруживаются в значительном числе апоптозные клетки. Они характеризуются сжатием (сморщиванием, съеживанием) цитоплазмы, компактным либо фрагментированным ядром. Отшнуровывающиеся фрагменты образуют нуклеофильные апоптозные тельца, которые подвергаются фагоцитозу соседними

клетками и макрофагами. Полученные данные согласуются с материалами других авторов [39] и подтверждают наличие апоптозного пути клеточной смерти при нефротоксикозах. Подобная картина характерна, вероятно, для эпителия различных органов и систем, так как отчетливо наблюдается, например, при экспозиции ТМ в течение 15-30 мин в переживающих отрезках кишечника белых крыс. Для случая отравления Pb она была детально охарактеризована С.П. Луговским [33]. Используемые автором показатели (митотический индекс и индекс апопто-

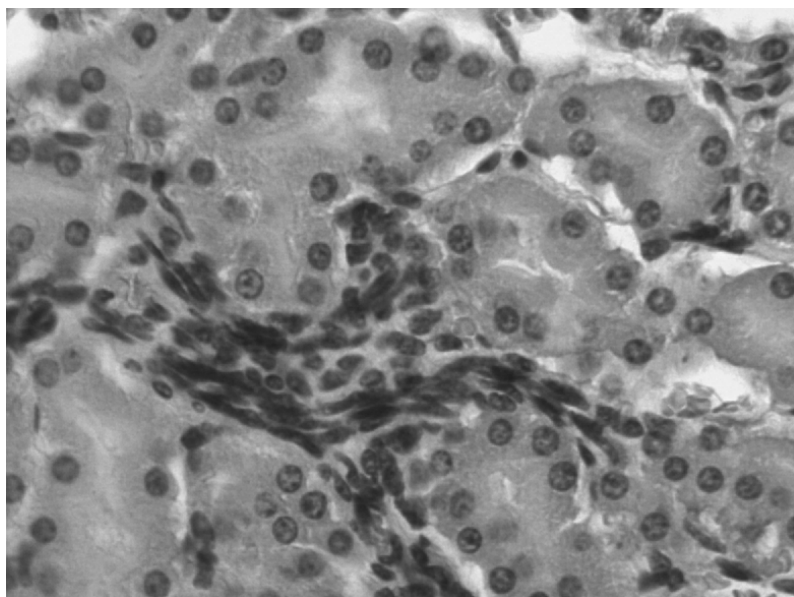


Рис. 1. Морфологические изменения в канальцах почек крыс после 30-суточной экспозиции Cd 1 мг/кг (окраска гематоксилин-эозин; 40 x 10)

тоза) представляются информативными и объективными маркерами для целей токсикометрии.

В опытах *in vitro* на переживающих отрезках кишечника оказалось возможным моделировать условия развития различных видов клеточной смерти при действии ионов ТМ. Наиболее простым способом оценки клеточной реакции явился подсчет числа и состава клеток в просвете кишки после предварительного центрифугирования и отмывания слизи при высоких концентрациях ТМ (табл. 1), а также определение фагоцитарной активности лейкоцитов, содержащихся в клеточном детрите. Установлено дозозависимое возрастание числа клеток в культуральной жидкости, что напрямую связано с процессами клеточной смерти энтероцитов.

Если при малых концентрациях и при ограниченном (15-30 мин) времени экспозиции доминируют процессы апоптоза в слизистой оболочке кишечника (прежде всего и главным образом в энтероцитах), то по мере роста концентраций ТМ и времени воздействия увеличивается абсолютное число клеток, количество мертвых клеток при окраске трепановым синим, а также наблюдается опережающий рост числа лейкоцитов и макрофагов, сопровождающих воспалительные процессы в ткани. При этом следует подчеркнуть, что в отличие от некротических изменений в исследованных тканях, апоптоз закономерно обнаруживается в эпителии почечных канальцев и в слизистой кишечника животных контрольной группы в опытах *in vivo* и *in vitro*, что свидетельствует о его физиологической роли в интактном организме.

При электронной микроскопии [9, 31, 33] в эпителиоцитах и энтероцитах отчетливо наблюдаются аутофагосомы и аутофаголизосомы, а также прослеживается поглощение ими не только апоптозных телец, но и клеточных органелл, в частности,

измененных МХ. Эти исследования подтверждают тесную взаимосвязь апоптоза с еще одним видом клеточной смерти – аутофагоцитозом [40,41].

Аутофагия – процесс деградации белков и органелл в физиологических условиях, обеспечивающий существование, жизнеспособность клеток, дифференциацию и развитие организма [42,43]. Она также связана с развитием ряда нейродегенеративных заболеваний, кардиомиопатий, канцерогенеза, бактериальных и вирусных инфекций. В процессе аутофагии мембранная акросомальная структура (преаутофагосома) поглощает цитозольные компоненты, включая органеллы и включения, с образованием аутофагосом, которые в последующем сливаются с лизосомами, приводя к протеолитической деградации содержимого аутофагосом с помощью лизосомальных ферментов. В процессе образования аутолизосом в клетках млекопитающих необходимы две универсальные модификации: Atg12-конъюгация и LC3-модификация [44]. Липопротеидный инициатор и модификатор аутофагоцитоза LC3 представляет аутофагосомальный аналог дрожжевого промотора аутофагии Atg8. Обогащенная липидами форма LC3, LC3-II, является маркером аутофагосом у млекопитающих и широко используется для изучения аутофагии. Другие гомологи Atg8, GABARAP и GATE-16, также модифицируются рядом механизмов. Были найдены различия в действии трех перечисленных модификаторов LC3-II, GABARAP и GATE-16 путем делипидации гомологами Atg8 и Atg12, что обуславливает многообразие видов аутофагоцитоза в различных физиологических и патологических ситуациях [40].

И.В. Давыдовский [45] подчеркивал, что «некробиотические процессы в принципе представляют собой нормальное явление в физиологии и биологии. Покровный эпителий кожи, эпителий пищеварительного, дыхательного, мочеполового трактов непрерывно отмирает и регенерирует... Такие же процессы со стороны эпителия тонкого и толстого кишечника

Таблица 1  
Состав клеточного детрита в просвете отрезка тощей кишки *in vitro* после введения Pb

№ опыта	Концентрация Pb	Состав содержимого в просвете кишки, клеток/мл	
		Эпителиальные клетки	Подвижные клетки (лейкоциты, макрофаги и др.)
1.	Ацетат свинца, 1 мг/л	$0,50 \cdot 10^1$	$5,5 \cdot 10^1$
2.	Ацетат свинца, 10 мг/л	$4,85 \cdot 10^1$	$15,9 \cdot 10^2$
3.	Ацетат свинца, 100 мг/л	$5,35 \cdot 10^2$	$6,2 \cdot 10^3$
4.	Ацетат свинца, 1 г/л	$6,75 \cdot 10^4$	$24,9 \cdot 10^6$
5.	Контроль	$0,09 \cdot 10^1$	$2,1 \cdot 10^2$

имеют прямое отношение к выделению пищеварительных ферментов, в частности, энтерокиназы». Это положение неоднократно высказывалось и другими авторами [17,18,31,36]. Поэтому сам факт установления апоптоза или программированной клеточной смерти не может рассматриваться как достоверный признак развития нефротоксикоза. Важен в данном случае показатель прогрессивного развития (положительной динамики) апоптоза и других видов клеточной смерти, а также генетических, молекулярных, клеточных и тканевых коррелятов апоптоза биохимического, физиологического и морфологического характера. При этом, если основные признаки и элементы апоптоза с позиций генетики и молекулярной биологии описаны достаточно четко то, например, в биохимическом отношении этот процесс изучен недостаточно, вследствие чего существуют различные, иногда и альтернативные гипотезы. При анализе особенностей развития и реализации разных видов гибели клеток при токсических нефропатиях обращает на себя внимание множественный характер и вариабельность лежащих в их основе молекулярных механизмов и задействованных метаболических систем. Они требуют углубленного изучения и систематизации.

#### Биохимические корреляты апоптоза

Использование в опытах пороговых и не приводящих к острым и подострым токсическим эффектам доз ТМ, поэтапное приготовление препаратов для морфологических исследований на ранних стадиях экспозиции, результаты гистологического, биохимического и иммуноферментного анализа в эти сроки (часы, первые сутки), свидетельствуют об индукции апоптоза эпителиальных клеток тубулярного аппарата нефрона. Прежде всего это манифестируется повышением активности специфичных для апоптоза цитоплазматических протеаз (каскада каспаз), белка р53, митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК) и других участников этого сложного и многоэтапного процесса [45-47]. Их индуктивный синтез отчетливо прослеживается с помощью современных методов исследования, но не отвечает на вопрос о пусковом механизме патологического апоптоза. Тем более, что апоптоз может развиваться

и в безкаспазном варианте [31]. Поэтому изучение морфо-функциональных и метаболических изменений остается актуальной задачей.

Такие типичные морфологические признаки, как везикуляризация цитоплазмы, наличие большого числа первичных и вторичных лизосом и появление аутофагосом, сочетались с повышением активности лизосомальных ферментов (КФ, ЩФ и КП) в 2-3 раза по отношению к контролю. Индуктором наблюдаемых изменений является, вероятно, Cd- или Hg-металлотиио-неиновый комплекс, рецептором которого являются лизосомы эпителиальных клеток проксимальных канальцев. CdМТН и HgМТН выполняют также сигнальную функцию, запуская процессы лизосомального апоптоза и аутофагии эпителиальных клеток. Полученные данные позволяют выделить в качестве первого типичного варианта апоптоза в патогенезе токсических нефропатий с позиций клеточной компартиментализации **лизосомальный апоптоз**, характерный, в частности, для отравлений кадмием и ртутью.

Апоптоз является энергозависимым процессом. Вовлечение в апоптоз МХ способствует его развитию за счет падения трансмембранного потенциала, выхода инициирующего апоптоз фактора (протеаза А1F) и цитохрома с [16,48]. Признаки нарушения энергетического обмена в МХ (снижение содержания АТФ и рост неорганического фосфата, НФ) и декомпартментализации митохондриальных ферментов (рост активности МДГ в цитоплазме до 194%, ИЦДГ – 126%, СДГ до 154% по отношению к контролю при снижении активности в МХ ИЦДГ до 54%, СДГ - до 68% и ЦХО - до 47%) наиболее четко проявляются, начиная с 3-5 дня экспозиции экспозиции животных ТМ. Следует подчеркнуть, что НАДФ-зависимая МДГ в МХ оставалась на высоком уровне (152% по отношению к контролю), тогда как НАД-зависимый фермент был угнетен в среднем на 50%. Содержание SH-групп снижалось в среднем на 40%, при тенденции к росту уровня SS-групп (на 18%). Комплекс наблюдаемых изменений характеризует тип апоптоза с позиций клеточной компартиментализации к категории **митохондриального апоптоза**. Он характерен, в частности, для инток-

сикации свинцом *in vivo* и хорошо воспроизводится также в опытах *in vitro* на переживающих отрезках кишечника крыс. Этот вид апоптоза носит пограничный характер, так как вследствие нарушения энергоснабжения клетки он легко переходит в некроз.

Однако наиболее универсальные (по пространственной локализации в клетке) метаболические проявления нефротоксикозов касаются инициации процессов свободнорадикального окисления с образованием активных форм кислорода (АФК), перекисидации липидов (ПОЛ) и угнетения антиоксидантных систем, формирующих комплекс оксидативного стресса. Усредненные показатели динамики перечисленных показателей в почках крыс при 30-суточной экспозиции Cd (внутрижелудочное введение 5 раз в неделю в дозах 0,1 мг/кг) представлены на рис. 2.

Из представленных на рисунке данных видно, что несмотря на генерацию АФК и ПОЛ уже на первые сутки опыта, угнетение активности ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту клеток, происходит лишь начиная с 5 суток и достоверно изменяется к 15-м суткам опыта. Поэтому, не отрицая роль рассматриваемого комплекса как одного из ведущих индукторов апоптоза при металлонефротоксикозах, говорить об оксидативном стрессе как о факторе, формирующем самостоятельную форму апоптоза, не представляется возможным.

Под влиянием ТМ существенно изменялись практически все исследованные показатели. В связи с кажущейся пестротой наблюдаемых функциональных, метаболических и морфологических сдвигов, многие из которых коррелируются с проблемой программируемой гибели клеток, была предпринята попытка построения концеп-

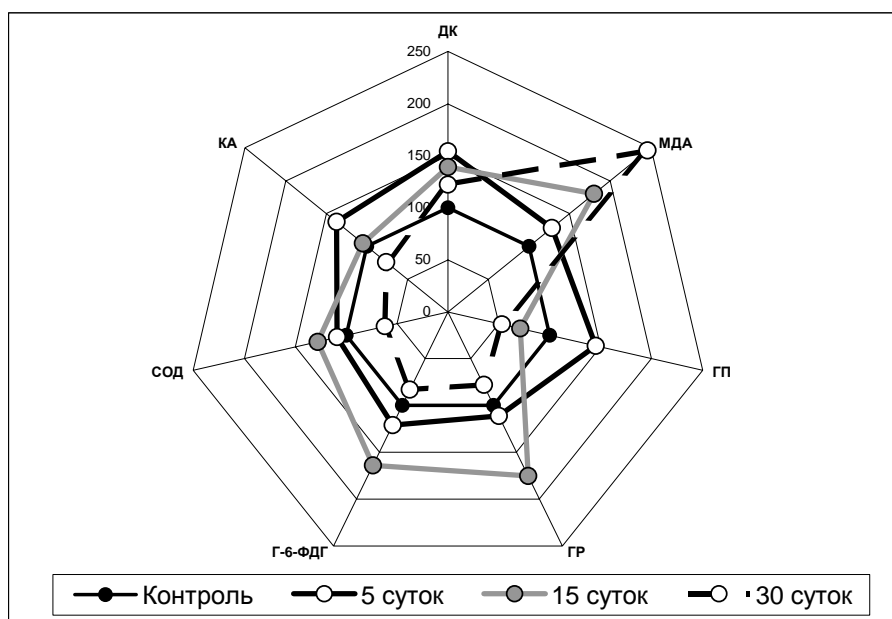


Рис. 2. Динамика изменения показателей оксидативного стресса в почках белых крыс при субхроническом в/ж введении Cd в дозе 0,1 мг/кг, в % к контролю.

ДК — диеновые конъюгаты, МДА — малоновый диальдегид, ГП — глутатионпероксидаза, ГР — глутатионредуктаза, Г-6-ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, СОД — супероксиддисмутаза, КА — каталаза

туально-экспериментальной модели «патологизации» апоптоза на основе одного из основных принципов токсикологии «доза - время - эффект» с использованием биохимических маркеров.

Это отражает состояние адаптационных возможностей клеточных функций: понижение энергетического потенциала, нарушение электролитного баланса и внутриклеточной осмолярности, ионного градиента с повышением pH цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных канальцев и, в первую очередь, индуктивно увеличившихся в числе лизосом [28,29]. Эти изменения имеют прямое отношение, с одной стороны, к нефротоксичности ТМ, и к запуску апоптозного каскада, с другой. Поступающие с металлотиионеином в эпителиальные клетки проксимальных канальцев Cd и Hg, освобождаются от связи с транспортным белком в лизосомах активированными при pH 5,0-5,4 протеазами (КФ, КП и др.). Их активность на первых этапах субхронического эксперимента действительно возрастает в 3-5 и более раз по отношению к контролю. При последующем росте pH и количества комплексов МТН-Cd и МТН-Hg их полного распада не происходит, что также может служить сигналом для запуска

апоптоза эпителиоцитов проксимальных канальцев, их аутофагоцитоза, а затем и некротизации. Не случайно, в литературе появился специальный термин для такого комплексного защитного и повреждающего механизма, получившего название «некроапоптоз» [30].

Подразделение апоптоза согласно пространственному принципу носит достаточно условный характер, так как наблюдаемые изменения не происходят изолированно. Кроме того, они не учитывают фактор времени, позволяющий проследить токсикодинамику процесса апоптоза. В этом плане большой интерес представляют результаты исследований Е. Сервеза с соавт. [49], которые в опытах *in vivo* и *in vitro* с типичным нефротоксикантом гентамицином убедительно показали, что имеет место дозозависимое развитие разных видов клеточной смерти эпителия проксимальных канальцев уже в первые 3 дня эксперимента: введение 1-3 мМ токсиканта вызывает апоптоз, а большие дозы – некроз эпителиальных клеток. Гентамицин вызывал индукцию лизосомальных ферментов и выход их в цитозоль в пределах 2 ч после введения. Падение мембранного потенциала МХ и выход цитохрома с в цитозоль отмечены только через 9 ч. Активация каспазы-9 происходила через 12 ч, а каспазы-3 – через 16-24 ч. Именно с этого времени начинается фрагментация ядер эпителиоцитов и появляются другие признаки апоптоза. Приведенные данные хорошо коррелируются с результатами наших исследований и позволяют использовать биохимические маркеры для целей диагностики токсических нефропатий, прогноза тяжести течения и эффективности терапевтических мероприятий.

### Выводы

1. Процесс гибели (отмирания) клеток, запускаемый многочисленными экзогенными и эндогенными стимулами, является филогенетически выработанным адаптационно-компенсаторным механизмом, который следует рассматривать в индивидуальном и популяционном контексте.
2. Для клетки он выступает как признак завершения ею физиологической роли либо развития несовместимых с дальнейшей жизнедеятельностью биохими-

ческих, морфологических и функциональных изменений. Для популяции клеток он является регулятором численности, способом обновления в физиологическом плане либо признаком (индикатором, маркером) развития патологических нарушений в соответствующем сегменте органа и ткани.

3. Гибель клеток протекает по типу апоптоза, аутофагоцитоза и (или) некроза, каждый из которых имеет свои четко выраженные признаки и особенности.
4. Апоптоз, аутофагоцитоз и некроз в то же время следует рассматривать не только (и не столько) как три вида клеточной смерти, а как ее последовательные этапы прежде всего в популяционном понимании процесса гибели клеток.
5. Усиление качественно и количественно лимитированного в физиологических условиях апоптоза при действии нефротоксикантов выполняет не только защитную (элиминирующую), но и сигнальную функцию по отношению к другим видам клеточной смерти.
6. Апоптоз инициируется продуктами клеточного метаболизма, которые образуются в клетках эпителия проксимальных канальцев под влиянием нефротоксикантов. Для их реализации должны быть соблюдены три условия:
  - транспорт нефротоксиканта в клетки-мишени;
  - транслокация универсальных модуляторов и запуск интракомпартментальных защитных механизмов, таких как активация лизосомальных гидролаз, разобщение ОФ и Д в МХ, активация гликолиза в цитоплазме, образование АФК и угнетение антиоксидантных систем не только в ЭПР, но и в других компартментах клетки.
  - активация предсуществующих, индукция синтеза *de novo* и поступление вследствие декомпартментализации в соответствующие активные точки необходимых ферментов и белков инициации апоптоза (каскада каспаз, МАПК, p53, AIF) под влиянием экспрессии соответствующих генов.
7. Лабораторные исследования величины и направленности изменений биохими-



ческих маркеров способствуют объективизации позиции врача при постановке диагноза токсической нефропатии, оценки тяжести клинического течения и прогноза заболевания, а также эффективности применяемой терапии при условии учета пространственно-временных взаимоотношений в патогенезе интоксикации, включая превалирующий тип клеточной смерти.

#### Литература

1. Brenner, Barry M. (editor). The Kidney. – Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. – 6<sup>th</sup> Edition. – Vol. 2. – P. 1509-1526; 1563-1596.
2. Пішак В.П., А.І. Гоженко, Ю.Є. Роговий. Тубуло-інтерстиційний синдром. – Чернівці: Медакадемія, 2002. – 221 с.
3. Куценко С.А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2004. – 720 с.
4. Трахтенберг И.М., Шафран Л.М. Тиоловые яды. – В кн.: Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – С. 111-175.
5. Lauwerys R., Bernard A. Preclinical detection of nephrotoxicity: description of the test and appraisal of their health significance // *Toxicol. Lett.*, 1989. – Vol. 46. – Iss. 1. – P. 13-29.
6. Epstein M. (ed.). Calcium Antagonists in Clinical Medicine. – Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc., 2002. – 3<sup>th</sup> Edition. – 559-712.
7. Возіанов О.Ф., Гоженко А.І., О.С. Федорук. Гостра ниркова недостатність.- Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2003. – 376 с.
8. Шафран Л.М., Большой Д.В., Пыхтева Е.Г., Третьякова Е.М. Роль лизосом в механизме защиты и повреждения клеток при действии тяжелых металлов // *Ж. Современные проблемы токсикологии*, 2004. – № 3. – С. 17-24.
9. Bach P.H., Gregg N.J., Wilks M.F., Delacruz L. Nephrotoxicity: Mechanisms, Early Diagnosis, and Therapeutic Management. – N.-Y.: Marcel Dekker, Inc., 1991. – 586 p.
10. Histopathological and ultrastructural effects of Losartan on embryonic rat kidney /Akila I., Inanb S., Gurcuc B., Nazikoglu A., Ozbəlgən K., Muftuoglu S. // *Acta histochemica*, 2005. – Vol. 107. – No. 2. – P. 291–300.
11. Heptinstall R.H. Pathology of the Kidney. – Boston: Little, Brown & Co., 1992. – Vol. 1-3. – 2111 p.
12. Тиунов Л.А., Шафран Л.М., Кузьменко А.А. Некоторые проблемы биохимической токсикологии // *Ж. Токсикологический вестник*.- М., 1994 - № 4. – С. 2-9.
13. Liu J., Habeebu S.S., Liu Y., Klaassen C.D. Acute CdMT Injection Is Not a Good Model to Study Chronic Cd Nephropathy: Comparison of Chronic CdCl<sub>2</sub> and CdMT Exposure with Acute CdMT Injection in Rats // *Toxicology and Pharmacology*, 1998. – Vol. 153. – Iss. 1. – P. 48-58.
14. Шафран Л.М., Большой Д.В. Парадоксальная токсичность – интенсивно развивающееся направление современной токсикологии // Тези доповідей II з'їзду токсикологів України. 12-14 жовтня 2004 р. – К., 2004. – С. 17-18.
15. Фармакология сверхмалых доз антител к эндогенным регуляторам функций / О.И. Эпштейн, М.Б. Штарк, А.М. Дыгай и др. – М.: Изд. РАМН, 2005. – С. 75-88.
16. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2003. – С. 444.
17. Фаллер Д.Р., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ. – М.: БИНОМ-Пресс, 2004. – С. 139-140.
18. Программированная клеточная гибель / Под ред. В.С. Новикова. – СПб: Наука, 1996. – 276 с.
19. Apoptose en pathologie humaine / Sci. ed. Georges N. Cohen. – Paris: Elsevier, 2000. – 132 p.
20. Oxidative stress, disease and cancer / Ed. Keshav K Singh. – N.-Y.: Elsevier, 2006. – 1104 p.
21. Методические рекомендации по спектрохимическому определению тяжелых металлов в объектах окружающей сре-

- ды, полимерах и биологическом материале. - № 4096-86. - Одесса, 1986. - 25 с.
22. МВ 10.1-115-2005 «Визначення вмісту ртуті в об'єктах навколишнього середовища і біологічних матеріалах». - К., 2005. - 48 с.
23. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. - М.: ПИТЕР, 203. - с.
24. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. - М.: Медицина, 1996. - 544 с.
25. Пирс Э. Гистохимия. - М.: Иностранная литература, 1962. - 963 с.
26. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. - К.: МОРИОН, 2000. - 320 с.
27. Nilsson, E., Ghassemifar, R., Brunk, U.T., 1997. Lysosomal heterogeneity between and within cells with respect to resistance against oxidative stress // *Histochem. J.*, 1997. - Vol. 29. - Iss. 9. - P. 857-865.
28. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: Involvement of lysosomes and mitochondria / Servaisa H., Van Der Smissenb P., Thirion G., Van der Essen G. // *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005. - Vol. 206, - No. 3. - P. 321-333.
29. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route / Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H. // *J. Biol. Chem.*, 2001. - Vol. 276. - Iss. 32. - P. 3149-3157.
30. Thevenod, F., 2003. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium // *Nephron. Physiol.*, 2003. - Vol. 93. - Iss. 1. - P.87-93.
31. Lockshin R.A., Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. - Iss. 36. - P. 2405-2417.
32. Луговской С.П., Легкоступ Л.А. Механизмы биологического действия свинца на пищеварительную систему // *Ж. Современные проблемы токсикологии*, 2002. - № 2. - С. 45-49.
33. Луговський С.П. Апоптоз епітелію слизової оболонки тонкої кишки щурів при свинцевій інтоксикації // *Ж. Современные проблемы токсикологии*, 2002. - № 3. - С. 50-54.
34. Артамонова В.Г., Шаталов Н.Н. Профессиональные болезни: Учебник. - 5-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 1996. - 432 с.
35. Massey A., Kiffin R., Cuervo A.M. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. - Vol. 36. - Iss. 25. - P. 2420-2434.
36. Meijer A.J., Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. - Vol. 36. - Iss. 21. - P. 2445-2462.
37. Renal Toxicology / In: *Comprehensive Toxicology* /Vol. Ed.-R.S. Goldstein. - Cambridge, UK: PERGAMON, 1997. - P. 633-664.
38. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) / Yasunobu Okada Y., Emi Maeno E., Takahiro Shimizu T. et al. // *Journal of Physiology*, 2001. - Vol. 532. - Iss. 1. - P. 3-16.
39. Orlando KA, Stone NL, Pittman RN. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells // *Exp Cell Res.*, 2005. - Vol. 27. - Iss.10. - P.47-56.
40. Meijer A.J., Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. - Vol. 36. - Iss. 12. - P. 2445-2462.
41. Yoshimori, T. Autophagy: A regulated bulk degradation process inside cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004. - Vol. 313. - No.5. - P. 453-458.
42. Klionsky, D. J., & Emr, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation // *Science*, 2000. - Vol. 290. - Iss. 17. - P. 1717-1721.
43. Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. Autophagosome formation in mammalian cells // *Cell Struct. Funct.*, 2002. - Vol. 27. - Iss. 5. - P. 421-429.
44. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. - Vol.

36. – Iss. 12. – P. 2503-2518.
45. Давыдовский И.В. Общая патология человека. – М.: Медицина, 1969. – С. 169.
46. Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis // *Molecular Cell*, 2002. – Vol. 9. – Iss. 2. – P. 459-470.
47. Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer // *Current Opinion Genet. Develop.*, 2002. – Vol. 12. – P. 60–66.
48. Kolchab W., Calderc M., Gilbertc D.. When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signaling // *FEBS Lett.*, 2005. – Vol. 579. – Iss. 8. – P. 1891-1895.
49. Hail N. Jr., Lotan R. Mitochondrial Respiration Is Uniquely Associated with the Prooxidant and Apoptotic Effects of *N*-(4-Hydroxyphenyl)retinamide // *The Journal of Biological Chemistry*, 2001. - Vol. 276. - No. 49. – P. 45614–45621.
50. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: Involvement of lysosomes and mitochondria / Servaisa H., Van Der Smissenb P., Thiriona G. et all. // *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005. – Vol. 206. – Iss. 3. – P. 321– 333.

### Резюме

#### РОЛЬ АПОПТОЗУ В ПАТОГЕНЕЗИ ТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ

*Шафран Л.М.*

Проведено аналіз результатів особистих досліджень і літературних даних щодо вивчення процесів клітинної смерті за умови розвитку токсичних нефропатій різного ґенезу. Показано, що послідовний розвиток апоптозу, аутофагії та некрозу клітин епіте-

лію проксимальних каналців нирок і енте-роцитів слизової оболонки переживаючих відрізків порожньої кишки білих щурів (як епітеліальної моделі у дослідах *in vitro*) залежить від виду токсиканта, діючої дози і часу експозиції. Співставлення метаболічних і морфологічних змін дозволило виділити інформативні біохімічні кореляти апоптозу, відбиваючі залучення у процес програмованої смерті різних клітинних органел (лізосоми, мітохондрії тощо), оксидативно-го стресу та інших медіаторів апоптозу, які можна використовувати у діагностиці, оцінці важкості клінічного протікання і ефективності лікування токсичних нефропатій.

### Summary

#### ROLE OF APOPTOSIS IN THE PATHOGENY OF TOXIC NEPHROPATHIES

*Shafran L.M.*

The analysis of results of own researches and the published data of the different kind of cellular death at toxic nephropathies is performed. The experiments *in vivo* on the white rats and on intestinal epithelium model *in vitro* have shown that consecutive development of cell death may be subdivided into the apoptosis, autophagic cell death and necrosis. The type of cell death depends on the kind of nephrotoxicant, its doze and time of exposition. Comparison of metabolic and morphological changes has allowed to allocate informative biochemical markers of apoptosis, reflecting involving into process of programmed death various cellular organelles (lysosomes, mitochondrion's, nuclei, EPR), oxidative stress and others mediators of apoptosis which can be used at diagnostics, further developing prognosis and efficiency of toxic nephropathies treatment.