

Антагонисты кальция и мочекаменная болезнь: новые перспективы

Проведено исследование влияния антагонистов кальция на процессы апоптоза в почечной ткани в эксперименте на лабораторных животных и у пациентов с мочекаменной болезнью, осложненной хроническим калькулезным пиелонефритом. Получены убедительные данные о нефропротективном действии антагонистов кальция при бактериальном и ишемическом воздействии в эксперименте и у больных мочекаменной болезнью. Изучение роли апоптоза в патогенезе мочекаменной болезни может пролить свет на механизмы развития и хронизации заболевания и найти новые пути торможения и предупреждения раннего нефросклероза и вторичного сморщивания почек. Вероятно, антагонисты кальция будут использоваться по новым показаниям: как модуляторы апоптоза, с учетом общности конечного этапа клеточной гибели, наступающей от различных причин. Этим этапом является увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция.

На сегодняшний день убедительно доказано, что при бактериальном ишемическом повреждении почки развитие летальных повреждений нефрона в большей степени определяется участием ионов кальция [1, 2]. Состояние метаболического ацидоза приводит к нарушению электрической репульсации ионов кальция сквозь кальциевые каналы, что увеличивает частоту и длительность их пребывания в открытом состоянии [3, 4]. Все эти процессы вызывают избыточный вход ионов кальция в клетку и ее последующую гибель. Резкое увеличение концентрации ионов кальция способствует активации фосфолипаз A_2 и C , протеинкиназ, что приводит к деградации фосфолипидов мембран [5]. Еще один механизм повышения концентрации ионов кальция в клетке — усиление анаэробного метаболизма при ишемии, что приводит к накоплению пальмитоилкарнитина, являющегося мощным агонистом кальциевых каналов и почти постоянно удерживающего их в открытом состоянии [6].

Кроме того, в патогенезе различных заболеваний почек большое значение имеет активация программируемой клеточной гибели — апоптоза. В настоящее время существует большое количество данных о роли депозависимого входа ионов кальция в апоптозе. Показано, что длительная (в течение 10–18 ч) обработка клеток ингибиторами Са-АТФаз, активирую-

щими депозависимый вход ионов кальция в клетку, приводит к апоптозу [7]. Это доказывает факт участия ионов кальция в регуляции программируемой гибели клетки. Снижение клеточной выживаемости, а следовательно активация апоптоза играет роль в патогенезе ишемических состояний паренхиматозных органов.

В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях доказана ведущая роль апоптоза в генезе интерстициального нефрита, рефлюкс-нефропатии, гидронефроза [8]. Описаны гломерулярный апоптоз, тубулоинтерстициальный апоптоз, апоптоз при аутоиммунных поражениях, при острых воспалительных заболеваниях почек [9]. Одни и те же физические и токсические факторы в зависимости от дозы и экспозиции могут индуцировать апоптоз либо некроз тубулярных клеток. Затяжное и малоинтенсивное токсическое или гипоксическое воздействие, как и неполная обструкция мочеточников, приводит к тубулоинтерстициальному нефриту и хронической почечной недостаточности.

При остром или хроническом ишемическом либо токсическом воздействии на почки первичной мишенью являются тубулярные клетки. Гибель эпителия проксимальных канальцев под влиянием повреждающих факторов происходит через апоптоз, что было показано в культуре тканей. Было продемонстрировано также, что тубулоинтерстициальная атрофия после односторонней окклюзии мочеточника сопровождается апоптозом канальцевого эпителия, в конечном счете фагоцитируемого соседними тубулярными клетками. В литературе описан апоптоз эпителия дистальных канальцев при обструкции мочеточников [10]. В. Gobe наблюдал одновременно некроз и апоптоз канальцевых клеток в экспериментальной модели одностороннего стеноза почечной артерии.

В связи с ролью апоптоза в патогенезе острых воспалительных заболеваний почек надо отметить, что дефект захвата макрофагами лейкоцитов, подвергшихся апоптозу, часто делает воспалительный процесс в почках неконтролируемым. Яркий пример такого нарушения апоптоза лейкоцитов — абсцесс почки, так как элиминация лейкоцитов путем апоптоза является основным механизмом, разрешающим воспаление [11]. Конечный результат плохо контролируемого как аутоиммунного, так и неаутоиммунного воспаления в почках — снижение их функции, морфологическим субстратом которого является нефросклероз. Полагают, что важную роль в формировании последнего играет

активация апоптоза. С угнетением этого механизма связывают и антисклеротическое действие антигипертензивных средств в профилактике хронической почечной недостаточности.

Однако многие вопросы патогенеза прогрессирования патологических процессов в почечной паренхиме остаются невыясненными. Долгое время основной формой гибели клеток почек при различных заболеваниях считался некроз. Открытие апоптоза стимулировало изучение роли этого явления в патологии почек. Кроме того, в настоящее время принято считать, что если клетка умирает от апоптоза, то подразумевается возможность терапевтического вмешательства, а если причиной гибели является некроз, то фармакологическая коррекция будет неэффективна, даже на начальной стадии повреждения [12].

Своевременная диагностика патологических внутриклеточных процессов и применение фармакологических средств, ингибирующих механизм апоптоза, открывают новые перспективы в лечении и профилактике многих урологических заболеваний. В связи с участием ионов кальция в процессе программируемой клеточной гибели представляет интерес изучение механизмов их проникновения внутрь клетки, которое осуществляется по кальциевым каналам. Возможна его модуляция препаратами из группы антагонистов кальция [13].

Таким образом, представляется перспективным исследование возможности применения антагонистов кальция по новым показаниям: в качестве модуляторов процессов апоптоза в почечной ткани, в частности, у больных мочекаменной болезнью, осложненной хроническим пиелонефритом (ХП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведено исследование влияния антагонистов кальция на указанные процессы. На первом этапе выполнен анализ отечественной и иностранной литературы, включая Index Medicus и ресурсы сети Интернет. Работы, освещающие процесс апоптоза при мочекаменной болезни и ХП, немногочисленны. Кроме того, до 1993 г. термины «апоптоз» и «программируемая клеточная гибель» не имели собственной рубрики, и информация по этой теме была рассеяна по большому числу предметных рубрик.

На втором этапе исследования в эксперименте на лабораторных животных смоделирована обструктивная уропатия по методу Ю. М. Есилевского (1990) и пиелонефрит по методике, описанной В. И. Седовым

(1980). Часть животных в ходе опыта получали антагонисты кальция (нифедипин, верапамил, диуманкал) в LD₅₀. При проведении эксперимента руководствовались принципами гуманного отношения к лабораторным животным в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований. Животных умерщвляли в различные сроки (в 1-е, 3-и и 5-е сутки), а почки подвергали стандартному морфологическому исследованию.

Третьим этапом исследования была верификация активации программируемой клеточной гибели у экспериментальных животных и больных мочекаменной болезнью, осложненной хроническим калькулезным пиелонефритом. Гистологическому исследованию подвергались биоптаты почечной ткани, а также препараты после нефрэктомии и резекции почек. Исследование проводили на базе НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург. Полученные препараты проходили фиксацию 2,5% раствором глутеральдегида на фосфатном буфере с рН 7,0, молярностью 0,05 моль, после чего на том же буфере производилась постфиксация 1% раствором OsO₄. Обезвоживание выполняли в спиртах восходящей крепости — 30, 50, 70 и 96%, заливка аралгитом с последующей полимеризацией — при нагревании до 60 °С.

Ультратонкие срезы производили на ультратоме фирмы «LKB» (Швеция) и контрастировали в течение 2 мин уранил ацетатом, а затем нитратом свинца. Исследование полученных препаратов производили в электронном просвечивающем микроскопе JEM-100С (Япония) при увеличении в 3, 5, 10, 20 тысяч раз. Фотосъемку производили при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получены убедительные данные о нефропротективном действии антагонистов кальция при бактериальном и ишемическом воздействии (менее выраженный отек мезангия в клубочках, в канальцах — дистрофические изменения в виде обратимого мутного набухания и гиалиново-капельной дистрофии с очагами баллонной, единичные некрозы эпителиоцитов канальцев). Это позволило предположить возможное участие апоптоза в развитии осложнений мочекаменной болезни (почечная недостаточность, хронический пиелонефрит, вторичное сморщивание почки). Предварительные результаты электронной микроскопии выявили характерные для апоптоза изменения клетки (фрагментация ДНК, специфические изменения клеточной мембраны и вакуолей, конденсация хроматина и др.).

Таблица. Результаты электронной микроскопии биоптатов почечной паренхимы у экспериментальных животных ($\chi \pm \delta_x$)

Показатель	Апоптоз		Некроз		p
	абс. число	%	абс. число	%	
Без антагонистов кальция (n = 46)	27,13 ± 0,40	2,76	9,49 ± 0,25	1,72	0,001
С применением антагонистов кальция (n = 34)	16,91 ± 0,53	3,11	7,15 ± 0,15	0,86	0,001

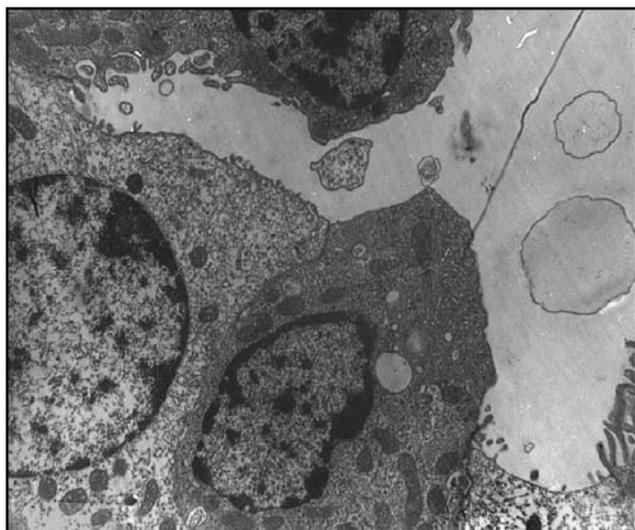


Рис. 1. Клетки дистального извитого канальца больных с калькулезным пиелонефритом, получавших антагонисты кальция в составе комплексного лечения. Единичные вакуоли в светлых клетках. Увеличение 10 000

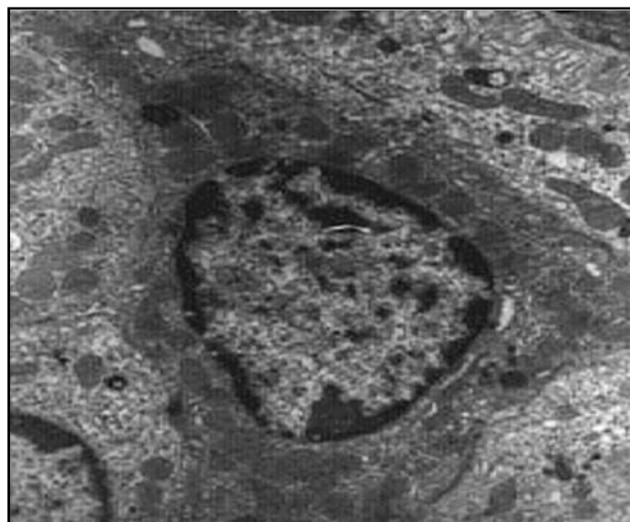


Рис. 2. Клетки проксимального извитого канальца больных с калькулезным пиелонефритом, получавших антагонисты кальция в составе комплексного лечения. Единичные вакуоли в цитоплазме. Увеличение 10 000

В группе лабораторных животных и больных, получавших традиционное антибактериальное лечение, при электронномикроскопии были выявлены деструктивные некробиотические процессы. Отмечались отек карิโอплазмы, краевое стояние и конденсация хроматина, извитость и неравномерность толщины клеточных мембран. В мембранах клеток клубочков обнаруживались отложения циркулирующих иммунных комплексов. В клетках эпителия проксимальных канальцев выявлены нарушения кариоцитоплазматического отношения, а также угнетение функции ядер. В группе больных, получавших антагонисты кальция в составе комплексного лечения, в целом отмечались те же изменения, особенно в клубочках. Однако имелись и некоторые различия: отмечалась вакуольная и жировая капеллярная дистрофия, несмотря на отек карิโอплазмы, а ядра функционально были более активны (рис. 1, 2).

Вышеописанные изменения в обеих группах больных характеризуют начальные стадии апоптоза. Наряду с апоптотически измененными клетками

также обнаруживались некротизированные клетки. Вышеуказанные изменения были менее выражены во второй группе больных, что было отмечено при количественном пересчете апоптотически измененных и некротизированных клеток (см. таблицу).

Таким образом, изучение роли апоптоза в патогенезе мочекаменной болезни может пролить свет на механизмы их развития и хронизации заболевания и найти новые пути торможения и предупреждения раннего нефросклероза и вторичного сморщивания почек. Вероятно, антагонисты будут использоваться по новым показаниям: как модуляторы апоптоза, с учетом общности конечного этапа клеточной смерти, наступающей от различных причин. Этим этапом является увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Автор ставит перед собой задачу дальнейшей выработки конкретных рекомендаций по применению антагонистов кальция в урологической практике, с определением конкретных показаний и доз препаратов.

Литература

1. Программируемая клеточная гибель / под ред. В. С. Новикова. — СПб.: Наука, 1996. — 276 с.
2. Berridge M. J. Calcium — a life and death signal // M. J. Berridge, M. D. Bootman, P. Lipp Nature. — 1998. — Vol. 395. — P. 645–648.
3. Крутецкая З. И. Механизмы внутриклеточной сигнализации / З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова. — СПб., 2003. — 208 с.
4. Авдонин П. В. Рецепторы и внутриклеточный кальций / П. В. Авдонин, В. А. Ткачук. — М.: Наука, 1994. — 288 с.
5. Вислобоков А. И. Кальциевые каналы клеточных мембран / А. И. Вислобоков, А. Г. Копылов, В. Г. Бовтюшко // Успехи физиол. наук. — 1995. — Т. 26, № 1. — С. 93–110.
6. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. — 3rd ed. / V. Hille. — Sunderland: Sinauer Assoc. Inc., 2001. — 725 p.
7. Baylor S. M. Measurement and interpretation of cytoplasmic Ca^{2+} signals from calcium-indicator dyes / S. M. Baylor, S. Hollingworth // News Physiol. Sci. — 2000. — № 15. — P. 19–26.
8. Savill J. Apoptosis and the kidney / J. Savill // J. Am. Soc. Nephrol. — 1994. — № 5. — P. 12–21.
9. Lieberthal W. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury / W. Lieberthal, J. S. Levine // Am. J. Physiol. — 1996. — Vol. 40. — P. 477–488.
10. Sarica K. The effect of calcium channel blocker on renal cell apoptosis in unilateral supravascular obstruction / K. Sarica // 7th Cong. of the MUA. — Marrakech, 2001. — P. 83.
11. Ranganath R. M. Role of programmed cell death in development / R. M. Ranganath // J. Int. Rev. Cytol. — 2001. — Vol. 202. — P. 159–242.
12. Geske F. L. The biology of apoptosis / F. L. Geske // Hum. Pathol. — 2001. — № 10. — P. 1029–1038.
13. Андреев Н. А. Антагонисты кальция в клинической медицине / Н. А. Андреев, В. С. Моисеев. — М., 1995. — 158 с.