

УДК: 616.61-053.2-036-092.9-099:546.3

Т.В. Горбач, Н.И. Макеева, В.А. Головачева, А.Е. Отчик
Клинико-экспериментальное обоснование
роли тяжелых металлов в развитии
нефропатий у детей

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA.2016.4(76):105-108; doi10.15574/SP.2016.76.105

Цель: в условиях клинико-экспериментального исследования оценить роль тяжелых металлов в механизмах развития нефропатий у детей.

Материалы и методы. Изучена экологическая обстановка региона с учетом ряда аэроэкологических факторов. Обследовано 94 ребенка с нефропатиями, которые разделены на два экологических кластера. В сыворотке крови детей изучали содержание меди и цинка методом атомно-адсорбционной спектрофотометрии. Экспериментальная часть работы проведена на 2-месячных крысах, которым в течение месяца ежедневно вводили раствор CuCl_2 . В мембранах субклеточных фракций почек изучали липидный спектр методом тонкослойной хроматографии. Проведено морфологическое изучение почек крыс.

Результаты. Выявлено снижение уровня цинка и повышение уровня меди в сыворотке крови в группе обследуемых из загрязненного кластера по сравнению с детьми из чистого кластера, что свидетельствует о развитии экзозависимых нефропатий. Экспериментальная часть работы показала, что накопление меди приводит к изменению структуры и свойств мембран субклеточных фракций клеток почек крыс, что приводит к нарушению функции нефроцитов.

Выводы. Избыточное содержание меди в организме является фактором риска развития нефропатии у детей.

Ключевые слова: нефропатия, медь, дети, крысы, липиды мембран.

Введение

Многочисленные клинические исследования показали, что в развитии и прогрессировании нефропатий значительную роль играют экологические факторы, в частности тяжелые металлы, которые снижают защитные механизмы организма, способны накапливаться в почках и непосредственно влиять на метаболизм в клетках почек [5]. Так, по данным О.В. Синяченко, повышение уровня меди может вызвать тубуло-интерстициальные нарушения в почках с проявлением аминокацидурии, гиперурикозурии и гиперкальциурии [6]. Так как мембраны нефроцитов принимают непосредственное участие во взаимодействии клеток со средой, можно предположить, что под действием разных внешних сигналов на клетку, в том числе экологических факторов, изменяется обмен липидов мембран, что может привести к мембранным нарушениям разной степени [7]. Несмотря на многочисленные работы, в которых изучалась роль липидного обмена в развитии и прогрессировании отдельных видов нефропатий, влияние факторов внешней среды (в частности металлов) на липидный спектр клеточных мембран нефроцитов до сих пор не изучено.

Цель исследования: в условиях клинико-экспериментального исследования оценить роль тяжелых металлов в механизмах развития нефропатии у детей.

Основные задачи: 1. Изучить экологическую ситуацию г. Харькова. 2. Определить уровень меди и цинка в сыворотке крови детей, больных нефропатией. 3. В условиях экспериментальной модели изучить влияние повышенной концентрации меди в организме на липидный спектр мембран субклеточных фракций клеток почек.

Материал и методы исследования

Была тщательно изучена экологическая обстановка региона с учетом ряда аэроэкологических факторов, в том числе с распределением детского населения по двум экологическим условным кластерам (УК). Согласно методике экологической кластеризации, с учетом комплекса факторов, мы разделили г. Харьков на два кластера:

УК₁ — с достаточным уровнем качества окружающей среды и УК₂ — с низким уровнем качества окружающей среды.

Под наблюдением находилось 94 ребенка в возрасте от 1 года до 18 лет, проживающих в разных УК, из них 34 — с гломерулонефритом, 26 — с интерстициальным нефритом, 34 — с дисметаболической нефропатией. Контрольную группу составили 34 практически здоровых ребенка, проживающих в УК₁. Определение содержания металлов в сыворотке крови проведено спектрометрическим методом [4] с использованием атомно-абсорбционной спектрофотометра «Сатурн».

Экспериментальная часть исследования проведена на 2-месячных крысах-самцах линии Wistar. Животные были разделены на две группы (по 15 особей в каждой). Моделирование нефропатии проводили путем ежедневного (в течение месяца) внутривенного (через зонд) введения крысам водного раствора CuCl_2 с концентраций Cu^{2+} 1,75 мг/дм³ из расчета 1 мл на 100 г. веса животного [2]. Контрольной группе крыс по такой же схеме вводили дистиллированную воду. В 3-месячном возрасте крыс выводили из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом. Мембраны субклеточных фракций выделяли методом дифференциального центрифугирования. Экстракцию липидов мембран проводили по методу Bligh and Dyer [1]. Липиды фракционировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol в смеси гексан:диэтиловый эфир:метанол:ледяная уксусная кислота (45:10:1:1,5). Количественное определение фракций проводили спектрофотометрическими методами [1]. Подтверждение развития нефропатии получено с помощью биохимических и морфологических методов.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что развитию гломеруллопатии в большинстве случаев предшествовали острые респираторные инфекции (39,9% наблюдений), обострение хронического тонзиллита или ангина (у 20,9% больных). В 8,3% случаев заболевание развилось на фоне аллергических реакций,

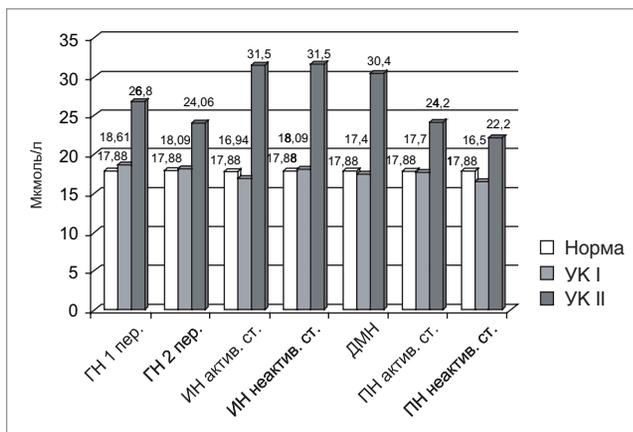


Рис. 1. Содержание меди в крови у больных нефропатиями, проживающих в разных экологических условиях

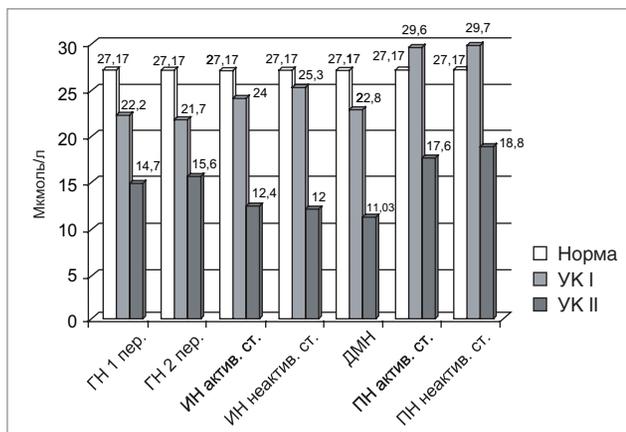


Рис. 2. Содержание цинка в крови у больных нефропатиями, проживающих в разных экологических условиях

а у 2,3% детей с клиническими проявлениями стрептодермии. В 29,2% наблюдений этиологический фактор установить не удалось. Структура заболеваний, предшествующих развитию гломерулопатии, за последние годы изменилась: наблюдается снижение удельного веса стрептококковой инфекции в развитии гломерулопатии. Среди обследованных детей, страдающих дисметаболической нефропатией, 78% проживают в УКII, что косвенно может свидетельствовать о воздействии экофакторов на развитие нефропатии.

Для изучения содержания биогенных элементов больные гломерулонефритом были разделены на две группы: 1 группу составили дети с острым гломерулонефритом с нефротическим синдромом, нефротическим синдромом с гематурией и гипертензией и хроническим гломерулонефритом с нефротической и смешанной формами; 2 группу — больные с острым гломерулонефритом с нефротическим и изолированным мочевым синдромами, а также с хроническим гломерулонефритом, гематурической формой. Каждая группа разделена на два периода: период начальных проявлений острого или обострения хронического гломерулонефрита (период обострения) и период обратного развития острого, частичной или полной ремиссии хронического гломерулонефрита (период ремиссии). Учитывая отсутствие достоверных отклонений показателей активности процесса среди больных гломерулонефритом 1 и 2 группы и показателей активности острого и хронического интерстициального нефрита, мы сочли возможным объединить больных с различными вариантами (иммуновоспалительные,

токсико-метаболические, дисметаболические) поражения почек в одну группу для определения элементного состава крови у больных детей, проживающих в различных экологических условиях кластерах. Принятие подобного решения аргументировалось и тем, что большинство обследованных (51% больных) — дети с хроническим заболеванием почек, которое при определенной продолжительности процесса включает различные варианты поражения почек или их функции.

Содержание уровня меди и цинка в крови у больных нефропатиями, проживающих в разных экологических кластерах, представлено на рис. 1, 2.

У всех проживающих в УКII детей, больных дисметаболической нефропатией, острым и хроническим гломерулонефритом и интерстициальным нефритом, независимо от активности процесса, выявлено достоверное снижение содержания цинка в сыворотке крови и повышение содержания меди как антагониста цинка (рис.1, 2) по сравнению с показателями детей, которые проживают в УКI и показателями детей из группы контроля.

Установлено, что при содержании в сыворотке крови уровня цинка ниже, чем 20,8 мкмоль/л, а меди выше, чем 19,8 мкмоль/л, нефропатия является экзогенным заболеванием; при концентрации цинка сыворотки крови выше, чем 20,8 мкмоль/л, а меди ниже, чем 19,8 мкмоль/л, нефропатия не является экзогенной [3]. Для уточнения механизмов нефротоксичного действия гиперэлементоза меди проведено экспериментальное исследование.

Результаты проведенного экспериментального исследования показали, что введение меди в течение месяца

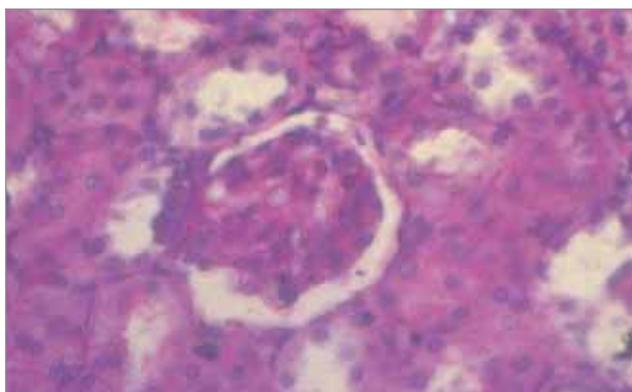


Рис. 3. Клубочек почки крысы при гиперэлементозе меди. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 400

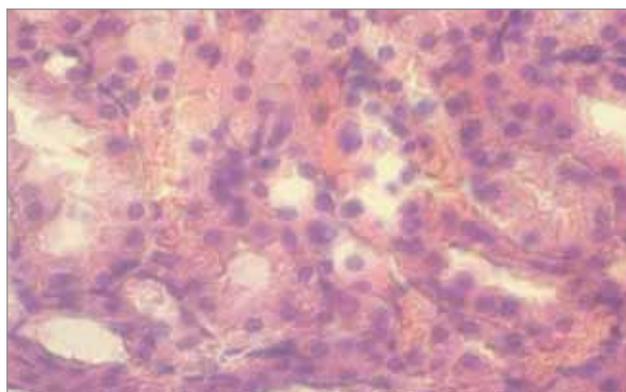


Рис. 4. Канальцы почки крысы при гиперэлементозе меди. ШИК-реакция + гематоксилин. Ув. 400

привело к накоплению металла в сыворотке крови и почках крыс в сыворотке — 56,23±1,84 против 50,11±2,41 в контроле; в почках — 81,05±4,32 против 16,91±1,05 в контроле.

Как показало морфологическое исследование, накопление меди в почках приводит к структурным нарушениям. Анализ микропрепаратов почек крыс при гиперэлементозе меди выявил наличие деструктивно-дистрофических и начало склеротических изменений в клубочках и извитых канальцах (рис. 3, 4). Данные морфологических исследований позволяют предположить развитие дисметаболической нефропатии, что подтверждается биохимически: увеличение креатинина (12,28±1,05 моль/сут, контроль — 9,25±0,62 моль/сут), мочевины (455,12±10,13 моль/сут, контроль — 417,22±15,43 моль/сут), белка в моче (896,91±9,42 мг/сут, контроль — 311,45±12,11 мг/сут),

уратов в моче (50,0±2,08 мг/мл, контроль — следы), оксалатов (10,00±0,95 мг/мл, контроль — следы).

Известно, что одним из ранних проявлений развития нефропатии является изменение липидного спектра сыворотки крови. Изучение липидного спектра сыворотки крови крыс при гиперэлементозе меди выявило наличие дислипидемии. Как видно из табл. 1, в крови повышается содержание холестерина и фосфолипидов, снижается содержание свободных жирных кислот, имеется дисбаланс в содержании липопротеидов. Выявленные нами особенности липидного спектра свидетельствуют о значительном нарушении общего липидного обмена, которое, в частности, касается мембранных структур клеток печени крыс.

Результаты изучения липидного спектра мембран субклеточных фракций клеток почек приведены в таблице 2.

Результаты изучения содержания липидов в мембранах клеток почек и субклеточных фракций показали, что содержание общих липидов во всех изучаемых мембранах снижается, содержание холестерина снижается во всех мембранах субклеточных фракций, практически не изменяется — в цитоплазматических мембранах. При этом содержание ЛПНП (транспортная форма холестерина в ткани) в сыворотке крови повышено. Следовательно, при развитии нефропатии нарушается связывание ЛПНП с мембранами и трансмембранный транспорт холестерина. По-видимому, нарушается и захват мевалоната почками и, в связи с этим, синтез холестерина в почках. Нами установлено, что при развитии нефропатии содержание общих фосфолипидов в мембранах субклеточных фракций повышается, а в цитоплазматических мембранах — снижается. Также установлено снижение содержания ЛПВП в сыворотке крови при увеличении содержания общих фосфолипидов. Возможно, снижение содержания ЛПВП связано с уменьшением синтеза апо-А белка, который, как известно, синтезируется в почках, либо с повышением скорости образования их ремнантных форм, что согласуется с данными литературы. В любом случае очевидно нарушение внутриклеточного обмена фосфолипидов. Согласно данным литературы, при различных формах нефропатии отмечается повышение содержания фосфолипидов в сыворотке крови [8]. Предполагается, что это связано с повышенным гидролизом фосфолипидов цитоплазматических мембран нефроцитов. Вероятно, это предположение справедливо, так как нами установлено снижение содержания фосфолипидов в цитоплазматических мембранах клеток почек.

Выявленные особенности соотношения холестерин/фосфолипиды в мембранах свидетельствуют об изменении структуры и свойств мембран, которые выражаются в разнонаправленных изменениях их жесткости и микровязкости даже в пределах одной клетки, последствием чего должно быть нарушение ее функционирования. Практически все процессы в почках проходят на мембранах, поэтому выявленные нами изменения их свойств могут стать причиной развития и прогрессирования нефропатии.

Выводы

1. В районах с высоким уровнем загрязнения окружающей среды отмечается выраженное увеличение меди и снижение цинка в сыворотке крови, повышен процент заболеваемости детей нефропатиями, что может свидетельствовать о влиянии факторов окружающей среды на развитие и прогрессирование заболеваний почек у детей.

Таблица 1

Содержание продуктов липидного обмена и липопротеинов в сыворотке крови крыс при экспериментальной нефропатии (M±m, n=15)

Показатель	Контроль	Нефропатия
ТАГ, мг/мл	0,60±0,02	0,68±0,05
СЖК, мг/мл	0,27±0,02	0,085±0,003*
Фосфолипиды, мМ/л	2,85±0,12	4,03±0,29*
Общий холестерин, мМ/л	4,19±0,27	4,68±0,12*
ЛПВП, мМ/л	1,93±0,17	1,18±0,16*
ЛПНП, мМ/л	1,68±0,12	2,41±0,17*
ЛПОНП, мМ/л	0,58±0,03	0,55±0,04

Примечание: * — достоверно (p<0,05) по сравнению с контролем.

Таблица 2

Липидный состав мембран субклеточных фракций клеток почек крыс при экспериментальной нефропатии, мг/г белка (M±m, n=15)

Липиды	Субклеточные фракции	Контроль	Нефропатия
Общие липиды	Мембраны ядер	371,29±23,12	248,16±12,05*
	Мембраны митохондрий	272,63±20,07	203,57±14,62*
	Мембраны микросом	205,14±9,63	247,16±14,02*
	Плазматические мембраны	220,89±12,37	180,26±12,03*
Общий холестерин (ХС)	Мембраны ядер	8,65±0,63	7,02±0,45*
	Мембраны митохондрий	31,45±2,07	20,08±1,36*
	Мембраны микросом	27,68±3,62	18,05±1,34*
	Плазматические мембраны	74,22±3,28	70,32±3,55
Общие фосфолипиды (ФЛ)	Мембраны ядер	209,64±16,22	249,14±10,65*
	Мембраны митохондрий	197,68±11,23	232,32±12,14*
	Мембраны микросом	162,47±12,33	177,68±11,49
	Плазматические мембраны	137,66±10,22	95,42±4,13*
ХС/ФЛ	Мембраны ядер	0,052±0,005	0,044±0,002
	Мембраны митохондрий	0,17±0,01	0,089±0,003*
	Мембраны микросом	0,22±0,01	0,13±0,01
	Плазматические мембраны	0,55±0,03	0,75±0,05*

Примечание: * — достоверно (p<0,05) по сравнению с контролем.

2. Данные экспериментальных исследований подтверждают, что повышенное содержание меди в организме является фактором риска развития нефропатий; нефротоксичность меди связана с ее влиянием на структуру и свойства мембран клеток почек.

3. Данные экспериментальных и клинических исследований обосновывают целесообразность использования

растительных энтеросорбентов для профилактики развития нефропатии у детей, проживающих в экологически неблагоприятных регионах.

Результаты работы показывают необходимость дальнейшего исследования факторов развития нефропатий у детей для проведения ранней диагностики и соответствующего лечения и профилактики экозависимой патологии почек.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учебное пособие / под ред. М. И. Прохоровой. — Ленинград : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 272 с.
2. Пат. 66957 Україна. Спосіб моделювання хронічної токсичної нефропатії / Мартинова С. М. та ін.; заявник та патентовласник Харківський національний медичний університет. — № у 2011 08317; заявл. 04. 07. 2011; надрук. 25. 01. 2012, Бюл. №2.
3. Пат. 51097 Україна, МПК А61В 10/00. Спосіб діагностики вторинної нефропатії у дітей / Одинець Ю. В., Головачова В. О.; заявник та патентовласник Харківський національний медичний університет. — № у 2010 03256; заявл. 22.03.10; опубл. 25.06.10, Бюл. № 12.
4. Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия / В. Прайс. — Москва, 1976. — С. 368.
5. Распространенность патологии органов мочевой системы у детей, проживающих в условиях крупного промышленного города / К. Е. Казакова, Е. И. Кондратьева, А. А. Терентьева, Л. П. Рихванов // Педиатрия. — 2009. — Т. 87, № 3. — С. 132—134.
6. Синяченко О. В. Металлы при остеоартрозе / О. В. Синяченко. — Донецк : Норд—Пресс, 2009. — 404 с.
7. Chronic kidney disease associated with environmental toxins and exposures / P. Soderland, S. Lovekar, D. E. Weiner [et al.] // Adv. Chronic Kidney Dis. — 2010. — Vol. 17, № 3. — P. 254—264.
8. Chronic kidney disease in the general population / S. L. White, A. Cass, R. C. Atkins, S. J. Chadban // Adv. Chronic Kidney Dis. — 2009. — Vol. 12, № 1. — P. 5—13.

Клініко-експериментальне обґрунтування ролі важких металів у розвитку нефропатії у дітей

Т.В. Горбач, Н.І. Макеева, В.О. Головачова, Г.Є. Отчик

Харківський національний медичний університет, Україна

Мета: в умовах клініко-експериментального дослідження оцінити роль важких металів у механізмах розвитку нефропатії у дітей.

Матеріали і методи. Вивчено екологічну обстановку регіону з урахуванням ряду аероecологічних факторів. Обстежено 94 дитини з нефропатіями, які розділені на два екологічні кластери. У сироватці крові дітей вивчали вміст міді і цинку методом атомно-адсорбційної спектроскопії. Експериментальна частина роботи проведена на 2-місячних щурах, яким протягом місяця щодня вводили розчин CuCl_2 . У мембранах субклітинних фракцій нирок вивчали ліпідний спектр методом тонкошарової хроматографії. Проведено морфологічне дослідження нирок щурів.

Результати. Виявлено зниження рівня цинку і підвищення рівня міді у сироватці крові в групі обстежуваних із забрудненого кластера порівняно з дітьми з чистого кластера, що свідчить про розвиток екозалежних нефропатій. Експериментальна частина роботи показала, що накопичення міді призводить до зміни структури і властивостей мембран субклітинних фракцій клітин нирок щурів, що сприяє порушенню функції нефроцитів.

Висновки. Надмірний вміст міді в організмі є фактором ризику розвитку нефропатії у дітей.

Ключові слова: нефропатія, мідь, діти, щури, ліпіди мембран.

Clinical and experimental study of role of heavy metals in development of nephropathy in children

T. Gorbach, N. Makeyeva, V. Golovachova, A. Otchik

Kharkovskiy National Medical University, Ukraine

The aim of the study: assess the role of heavy metals in the mechanisms of nephropathy development in children on the base of clinical and experimental study.

Materials and methods. The ecological situation was studied in the region based on aeroecological factors. Ninety-four children with nephropathy, who were residing in regions with different levels of environmental pollution, were examined. Determination of copper and zinc in blood serum of children was performed by atomic adsorption spectrophotometry. The experimental part of the work was carried out on 2 months-old rats which received CuCl_2 solution for 1 month daily. Lipid spectrum was studied in membranes of renal subcellular fractions by thin layer chromatographic. A morphological study of the kidneys of rats was performed.

Results of the study showed the reduced blood zinc level and elevated blood copper level in children with nephropathies from ecologically «polluted» regions compared to children from the «clean» regions of the city that indicative of development of ecology related nephropathies. The experimental part of the work showed, that the accumulation of copper in the kidneys led to changes in structure and properties of membrane's subcellular fractions and, as the result, to kidney's disturbance. Conclusion: the increased content of copper in the body is a risk factor for development of kidney disease in children.

Key words: nephropathy, copper, children, rats, membrane lipids.

Сведения об авторах:

Горбач Татьяна Викторовна — к.биол.н., доц. каф. биохимии Харьковского национального медицинского университета.

Адрес: г. Харьков, пр. Науки, 4; тел. (057) 778-24-89

Макеева Наталья Ивановна — д.мед.н., проф. каф. педиатрии №2 Харьковского национального медицинского университета.

Адрес: г. Харьков, пр. Науки, 4; тел. (0572) 95-40-93.

Головачова Виктория Александровна — к.мед.н., доц. каф. педиатрии №2 Харьковского национального медицинского университета.

Адрес: г. Харьков, пр. Науки, 4; тел. (0572) 95-40-93.

Отчик Анна Евгеньевна — студентка 6 курса 1 медицинского факультета Харьковского национального медицинского университета

Адрес: г. Харьков, пр. Науки, 4.

Статья поступила в редакцию 27.04.2016 г.