

УДК 611.36:616.24-006:547.29/.914:57.084

Влияние бетулоновой кислоты и ее производных на морфологию почек животных с перевитой карциномой легких Льюис на фоне полихимиотерапии и без ее воздействия

Н. А. ЖУКОВА¹, И. В. СОРОКИНА¹, Т. Г. ТОЛСТИКОВА¹, М. П. ДОЛГИХ¹, Д. Е. СЕМЕНОВ²¹Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)E-mail: sorokina@nioch.nsc.ru²НИИ региональной патологии и патоморфологии Сибирского отделения РАМН, ул. Академика Тимакова, 2, Новосибирск 630117 (Россия)

Аннотация

Исследовано влияние бетулоновой и [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислот и их метиловых эфиров на морфологию почек мышей C57BL/6 с перевитой аденокарциномой легких Льюис на фоне проведения цитостатической полихимиотерапии (циклофосфан, адриамицин, винкристин, преднизолон) и без нее. Методом морфометрии установлено, что введение бетулоновой и [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислот и их метиловых эфиров на фоне полихимиотерапии и без ее воздействия оказывает положительное влияние на течение тубулоинтерстициальной нефропатии, значительно уменьшая степень выраженности некротических и дистрофических изменений эпителиоцитов проксимальных канальцев, а также уменьшает отек интерстициальной ткани.

Ключевые слова: полихимиотерапия, карцинома легких Льюис, нефропротективный эффект, бетулоновая кислота, [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислота и их метиловые эфиры

ВВЕДЕНИЕ

В ряду токсических проявлений противоопухолевой терапии одно из важных мест занимает нефротоксичность, развитию которой способствуют следующие факторы: 1) интенсивное кровоснабжение и чувствительность органа к гипоксии; 2) большая скорость метаболических и транспортных процессов в эпителиоцитах проксимальных канальцев, сопровождающихся в ряде случаев образованием токсичных метаболитов; 3) скорость экскреции посредством клубочковой фильтрации и канальцевой секреции [1]. Известно, что самым нефротоксичным агентом в составе схемы СНОР (циклофосфан, доксорубин, винкристин, преднизолон) является метаболит циклофосфана акролеин [2, 3]. В результате воздействия уротоксичных агентов, как правило, развиваются острое тубулярное или интерстициальное повреждение, некроз почечных сосочков, которые могут приводить к

развитию почечной недостаточности и требуют динамического наблюдения и постоянной коррекции в межкурсовый период препаратами с протективными свойствами [4]. В этом плане перспективны индивидуальные вещества, синтезированные на основе бетулина: бетулоновая кислота и ее производные [5]. Они обладают низкой токсичностью, гепато-, нефропротективным, иммуномодулирующим, цитостатическим действием и высокой антиоксидантной активностью [6, 7]. Кроме того, показано, что бетулоновая и [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислоты на фоне воздействия полихимиотерапии (ПХТ) у мышей с лимфомой RLS уменьшают степень и объем деструктивно-некротических повреждений эпителиоцитов, а также обладают антиметастатическим действием [8, 9, 6].

Цель настоящей работы – изучение влияния бетулоновой, [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислот и их метиловых эфиров на морфологию почек мышей с

перевитой карциномой легких Льюис на фоне ПХТ и без ее воздействия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Тестируемые агенты: бетулоновая кислота **I**, ее метиловый эфир **II**, [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислота **III** и ее метиловый эфир **IV** – синтезированы в лаборатории медицинской химии НИОХ СО РАН [10]. Цитопротекторное действие синтезированных соединений исследовали на мышцах линии C57BL/6 с исходной массой тела 22–25 г, содержащихся в условиях стандартного вивария. Всем животным в мышцу бедра перевивали штамм карциномы легких Льюис ($2 \cdot 10^6$ клеток в 0.1 мл физиологического раствора) из банка опухолей Института цитологии и генетики СО РАН. Через 10 сут после перевивки опухоли мышцей делили на 10 групп (по 10 особей в каждой). Половине групп животных вводили однократно внутрибрюшинно комплекс цитостатических препаратов, моделирующих ПХТ: доксорубин (“Лэнс-Фарм”, Москва) – 4 мг/кг, циклофосфан (“Биохимик”, Саранск) – 50 мг/кг, винкристин (“Гедон Рихтер”, Венгрия) – 0.1 мг/кг и преднизолон (“Гедон Рихтер”, Венгрия) – 5 мг/кг массы тела. Соединения **I–IV** вводили через зонд в желудок в дозе 50 мг/кг ежедневно в течение 8 сут на фоне ПХТ и без нее.

Контролем служили мыши с перевитой опухолью (**V** группа), которым вводили эквивалентное количество воды с твином. Референсную группу (**VI**) составляли животные после введения комплекса цитостатиков. Через 8 сут мышцей декапитировали под эфирным наркозом, извлекали почки, фиксировали в 10 % параформальдегиде на 0.1 М фосфатном буфере Зеренсена (рН 7.4) в течение 4 сут с последующей стандартной обработкой на гистологическом комплексе MICROM (Carl Zeiss, Германия). Срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, ставили ШИК-реакцию с докраской гематоксилином и оранжевым G. Препараты исследовали методом световой микроскопии в проходящем свете на микроскопе Axioskop 40 (ув. 400).

Морфометрический анализ срезов проводили с использованием прямоугольной окулярной сетки на 289 точек [11]. В почках подсчитывали объемную плотность эпителиоцитов с дистрофическими и некротическими изменениями, а также объем интерстициальной ткани и просвета канальцев. Статистическую обработку данных проводили методами параметрической статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel. Результаты считали достоверными при значении критерия Стьюдента $p < 0.05$. Изменение объемной плотности в опытных группах оценивали относительно контроля и референсной группы, показатели которых приняты за 100 %.

ТАБЛИЦА 1

Влияние бетулоновой кислоты и ее производных, вводимых на фоне полихимиотерапии (ПХТ), на морфометрические параметры почек мышцей с карциномой легких Льюис

| Группа | Объемная плотность | | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | Эпителиоциты | | | Интестициальная ткань | Просвет канальцев |
| | Дистрофия (1) | Дистрофия (2) | Некрозы | | |
| I (ПХТ + I) | 0.50±0.007 ^{###} | 0.23±0.016 ^{###} | 0.012±0.005 ^{##} | 0.12±0.008 | 0.13±0.009 |
| II (ПХТ + II) | 0.46±0.016 ^{###} | 0.27±0.014 ^{###} | 0.009±0.004 ^{##} | 0.13±0.007 | 0.14±0.013 |
| III (ПХТ + III) | 0.46±0.009 ^{###} | 0.19±0.011 ^{###} | 0.0026±0.001 ^{##} | 0.14±0.017 | 0.21±0.012 ^{###} |
| IV (ПХТ + IV) | 0.42±0.004 ^{###} | 0.26±0.008 ^{###} | 0.017±0.003 ^{##} | 0.13±0.004 | 0.18±0.006 ^{##} |
| V (контроль) | 0.54±0.01 | 0.19±0.02 | 0.015±0.003 | 0.14±0.004 | 0.11±0.01 |
| VI (ПХТ) | 0.18±0.015 ^{***} | 0.49±0.023 ^{***} | 0.07±0.011 ^{**} | 0.15±0.004 | 0.12±0.008 |

Примечание. Здесь и в табл. 2: 1 – дистрофия слабой степени выраженности; 2 – гидропическая и баллонная дистрофия.

^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ относительно VI группы.

^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ относительно V группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные патологические изменения в почках животных контрольной группы проявляются преимущественно в проксимальных канальцах в виде умеренно выраженных дегенеративно-некротических изменений эпителиоцитов. Доля клеток с гидропической дистрофией и некрозами составляет 19 и 1,5 % соответственно (табл. 1). Обращает на себя внимание минимальный характер патологических изменений в клубочках, интерстициальной ткани и отсутствие метастазов. Так, в отдельных клубочках выявлялись лишь незначительное расширение мезангиального матрикса и отложения фибрина в виде ШИК-положительной субстанции между петлями капилляров (рис. 1). Выявленные поражения почек у животных с перевитой опухолью (отсутствие метастазов, повреждение сосудов клубочков и интерстициальной ткани, минимальные патологические изменения в канальцах) позволяют сделать заключение о паранеопластическом характере нефропатии [12]. Развитие и степень выраженности нефропатии зависят от вида опухоли и состояния клеточного и гуморального иммунитета [13]. Ранее у мышей с перевитой лимфомой RLS отмечалось развитие тяжелого некротического нефроза и тубулоинтерстициального нефрита [9]. В данном опыте у мышей с карциномой легких Льюис выявляются лишь минимальные поражения тубулярных клеток проксимальных канальцев.

При проведении ПХТ основным патогенетическим механизмом развития лекарственного поражения почек является прямое дозозависимое нефротоксическое действие метаболитов цитостатиков. Так, введение комплекса цитостатиков привело к развитию у мышей тубулоинтерстициального нефрита в сочетании с мембранозной нефропатией. Основные патологические изменения выявлены в эпителиоцитах проксимальных канальцев: набухание цитоплазмы, фрагментация щеточной каймы, очаговая гидропическая и баллонная дистрофия (пикноз ядер, конденсация ядерного хроматина по периферии ядра в виде глыбок с последующим лизисом ядра и клетки), некрозы отдельных канальцев (рис. 2). По данным морфометрического анализа, объем эпителиоцитов с гидропической и бал-

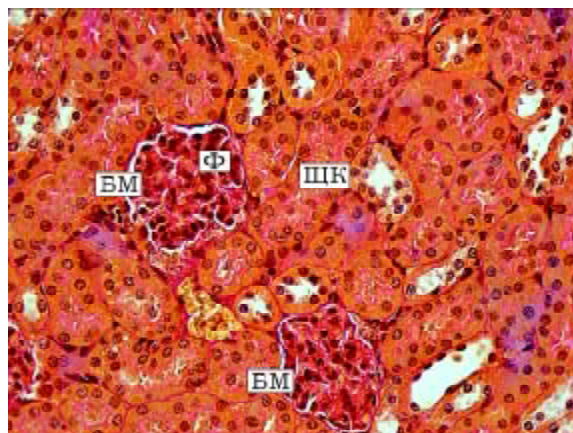


Рис. 1. Почка мыши с перевитой карциномой легких Льюис. Дистрофия эпителиоцитов проксимальных канальцев, расширение мезангиального матрикса и отложения фибрина между петлями капилляров. Окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G. Ув. 400. Здесь и на рис. 2–6: БМ – базальные мембраны, ШК – щеточная кайма, Ф – фибрин, НК – некрозы клеток, ПО – периваскулярный отек.

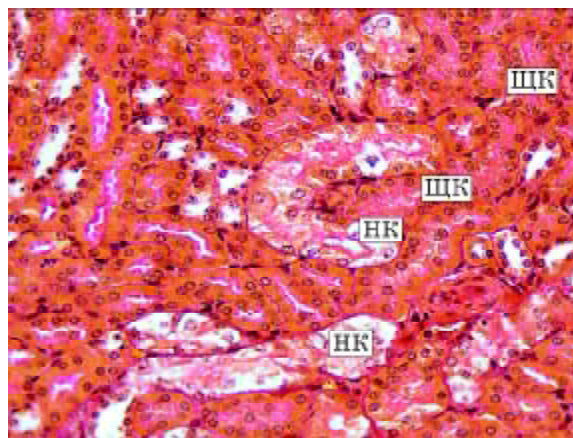


Рис. 2. Почка мыши с перевитой карциномой легких Льюис после введения цитостатиков. Гидропическая и баллонная дистрофия эпителиоцитов проксимальных канальцев, некрозы клеток, периваскулярный отек. Окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G. Ув. 400. Обозн. см. рис. 1.

лонной дистрофией увеличился на 157 %, а доля эпителиоцитов со слабо выраженными дистрофическими процессами уменьшилась на 77 % (см. табл. 1). На фоне цитостатического воздействия отмечается значительное увеличение (на 366 %) объемной плотности некрозов эпителиоцитов. В просвете собирательных трубочек определяются гиалиновые цилиндры, в интерстициальной ткани – умеренное полнокровие и периваскулярный отек. В результате морфометрического исследования

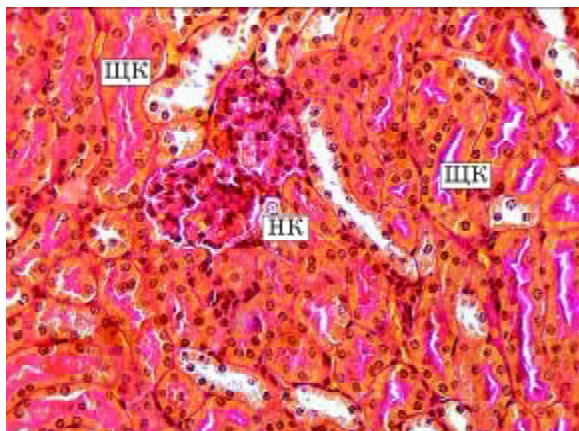


Рис. 3. Почка мыши с перевитой карциномой легких Льюис после введения цитостатиков и [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислоты. Умеренная дегенерация эпителиоцитов проксимальных канальцев, уменьшение отека щеточной каймы. Окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G. Ув. 400. Обозн. см. рис. 1.

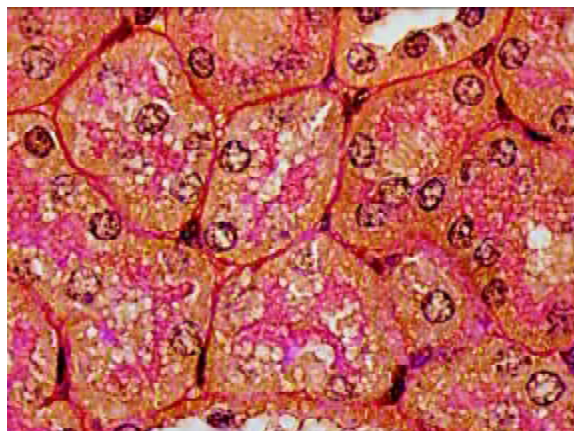


Рис. 4. Почка мыши с перевитой карциномой легких Льюис после введения [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислоты. Мелковезикулярная липидная инфильтрация эпителиоцитов проксимальных канальцев. Окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G. Ув. 1000 с иммерсией. Обозн. см. рис. 1.

не выявлено существенного изменения показателей объема интерстициальной ткани и просвета канальцев у животных референтной группы по сравнению с контролем. Таким образом, введение цитостатиков в данном эксперименте осложняет течение нефропатии и сопровождается увеличением дегенеративно-некротических повреждений нефроцитов.

Введение тестируемых соединений **I–IV** на фоне ПХТ привело к уменьшению степени альтерации эпителиоцитов проксимальных канальцев. Под действием тритерпеноидов на 80–98 % уменьшилась объемная плотность эпителиоцитов в состоянии некроза и на 54–60 % – с гидропической и баллонной дистрофией. Кроме того, наблюдалось увеличение

объема эпителиоцитов с признаками слабо выраженной дегенерации (на 170–180 %) (см. табл. 1, рис. 3). Уменьшение отека эпителиоцитов и щеточной каймы на фоне введения соединений **III** и **IV** сопровождается увеличением объемной плотности просвета проксимальных канальцев на 50–75 %. Показатели объемной плотности интерстициальной ткани в группах с введением тритерпеноидов достоверно не отличались от контрольных. Наиболее выраженная положительная динамика репаративных процессов наблюдалась на фоне введения соединения **III**.

Введение агентов **I–IV** без ПХТ оказывает положительное влияние и на течение паранеопластической нефропатии: в прокси-

ТАБЛИЦА 2

Влияние бетулоновой кислоты и ее производных на морфометрические параметры почек мышей с карциномой легких Льюис без полихимиотерапии

| Группа | Объемная плотность | | | | |
|--------------|--------------------|---------------|---------------|------------------------|-------------------|
| | Эпителиоциты | | | Интерстициальная ткань | Просвет канальцев |
| | Дистрофия (1) | Дистрофия (2) | Некрозы | | |
| I | 0.46±0.01** | 0.23±0.018 | 0.007±0.004 | 0.14±0.005 | 0.17±0.004** |
| II | 0.48±0.007** | 0.19±0.018 | 0±0** | 0.14±0.009 | 0.17±0.004** |
| III | 0.5±0.011** | 0.22±0.017 | 0.0023±0.001* | 0.11±0.011* | 0.17±0.009* |
| IV | 0.47±0.006** | 0.21±0.011 | 0.0021±0.001* | 0.15±0.011 | 0.18±0.005** |
| V (контроль) | 0.54±0.01 | 0.19±0.02 | 0.015±0.003 | 0.14±0.004 | 0.11±0.01 |

Примечание. См. табл. 1.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ относительно контрольной группы.

мальных канальцах отмечается уменьшение объемной плотности некрозов эпителиоцитов, в среднем на 56 % (табл. 2). Доля эпителиоцитов с отежной цитоплазмой, мелкоvesикулярной липидной инфильтрацией и фрагментированной щеточной каймой уменьшается в этих группах в среднем на 8–13 % по сравнению с контролем (рис. 4). При морфометрическом исследовании почек мышей в группах с изолированным введением тритерпеноидов не выявлено значительных отличий от контроля доли эпителиоцитов в состоянии гидрорической и баллонной дистрофии. Во всех группах после введения тритерпеновых соединений отмечается уменьшение отека эпителиоцитов проксимальных канальцев и щеточной каймы, приводящее к увеличению объемной плотности просвета канальцев на 54 %. Введение соединения III сопровождалось незначительным (на 22 %) уменьшением отека интерстициальной ткани.

Следует отметить, что введение тритерпеновых соединений, как на фоне ПХТ, так и без ее воздействия, не приводит к существенным положительным изменениям состояния гломерулярного аппарата. У всех животных по-прежнему сохраняются признаки мембранозной нефропатии: в клубочках утолщены базальные мембраны, увеличен объем мезангиального матрикса с отложением в петлях капилляров фибрина (ШИК-позитивная субстанция) (рис. 5)

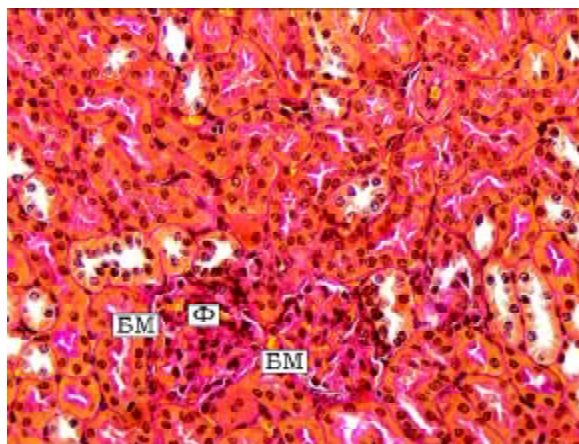


Рис. 5. Почка мыши с перевитой карциномой легких Льюис после введения цитостатиков и метилового эфира бетулоновой кислоты. Утолщение базальной мембраны клубочков, расширение мезангиального матрикса. Окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G. Ув. 400. Обозн. см. рис. 1.

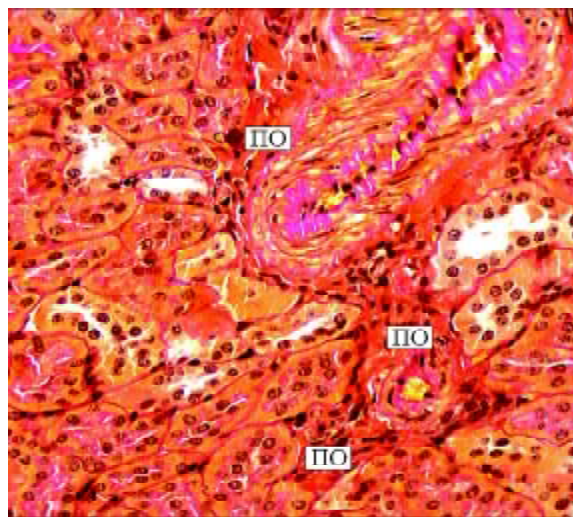


Рис. 6. Почка мыши с перевитой карциномой легких Льюис после введения метилового эфира бетулоновой кислоты. Периваскулярный отек и плазматическое пропитывание стенок артерий. Окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G. Ув. 400. Обозн. см. рис. 1.

и явлениями системной дезорганизации соединительной ткани в виде плазматического пропитывания стенок артериол (рис. 6).

ВЫВОДЫ

1. Выявлена способность бетулоновой, [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислот и их метиловых эфиров оказывать протективное действие на морфологию почек животных, как на фоне полихимиотерапии, так и без ее воздействия.

2. Установлено, что основой патологического процесса почек животных с перевитой карциномой легких Льюис, по-видимому, является паранеопластическая нефропатия.

3. Показано, что полихимиотерапия животных сопровождается токсическим повреждением эпителиоцитов с развитием тубулоинтерстициального нефрита.

4. Все исследуемые тритерпеноиды обладают способностью уменьшать на фоне полихимиотерапии степень деструктивно-некротических процессов только в канальцах почек.

5. Бетулоновая, [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислоты и их метиловые эфиры в режиме изолированного введения уменьшают выраженность паранеопластической нефропатии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 93 (“Развитие исследований в области медицинской химии и фармакологии как научной основы разработки отечественных лекарственных препаратов”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Гершанович М. Л., Филов В. А., Акимов М. А., Акимов А. А. Введение в фармакотерапию злокачественных опухолей. С-Пб.: Сатис, 1999.
- 2 Волкова М. А. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2001.
- 3 Зборовский А. Б., Тюренков И. Н. Осложнения фармакотерапии. М.: Медицина, 2003.
- 4 Арефьева А. К., Рыков В. А., Митрохина Л. Н. // *Вопр. онкологии*. 1990. Т. 36, № 3. С. 331.
- 5 Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Жукова Н. А., Петренко Н. И., Шульц Э. Э., Узенкова Н. В., Грек О. Р., Позднякова С. В., Толстиков Г. А. // *Докл. РАН*. 2004. Т. 399, № 2. С. 274.
- 6 Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Жукова Н. А., Шульц Э. Э., Петренко Н. И., Узенкова Н. В., Попова Н. А. // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 2006. Т. 142, № 7. С. 78.
- 7 Толстикова Т. Г., Сорокина И. В., Толстиков Г. А., Флехтер О. Б. // *Биоорг. химия*. 2006. Т. 1, № 32. С. 42.
- 8 Толстикова Т. Г., Сорокина И. В., Толстиков Г. А., Флехтер О. Б. // *Биоорг. химия*. 2006. Т. 3. С. 291.
- 9 Жукова Н. А., Семенов Д. Е., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Позднякова С. В., Грек О. Р. // *Сиб. науч. вестн.* 2006. № IX. С. 49.
- 10 Петренко Н. И., Еланцева Н. В., Петухова В. З. // *Химия природ. соед.* 2002. № 4. С. 276.
- 11 Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990.
- 12 Козловская Л. В., Туганбекова С. К., Сейсембеков Т. З., Тэгай С. В., Фомин В. В., Варшавский В. А. // *Нефрология и диализ*. 2002. Т. 4, № 2. С. 34.
- 13 Тареева И. Е., Андросова С. О. // *Нефрология*. / под ред. И. Е. Тареевой. М.: Медицина, 1995. С. 101.