

На правах рукописи

Кисиева Залина Ахсарбековна

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА,
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОФИЛАКТИКА И ТЕРАПИЯ МОДЕЛЕЙ
НЕФРОПАТИЧЕСКОГО ТИПА АМИЛОИДОЗА У СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ**

14.03.03 - патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Владикавказ – 2014

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

БРИН Вадим Борисович - заслуженный работник ВШ РФ, заслуженный деятель науки РСО-Алания, доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант:

КОЗЫРЕВ Константин Мурадиевич – заслуженный деятель науки РСО-Алания, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Петрищев Николай Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии, профессор

Кирпатовский Владимир Игоревич, доктор медицинских наук, профессор, НИИ урологии им. Н.А.Лопаткина – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. П.А.Герцена» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел экспериментального моделирования урологических заболеваний с вивариумом, зав.отделом

Ведущая организация: государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «07» апреля 2014 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.095.01 при ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.sogma.ru.

Автореферат разослан «...»_____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

И.Г. Джиоев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Амилоидоз как общий патологический процесс относится к стромально-сосудистым диспротеинозам. Характерная для амилоида химическая инертность и иммунологическая толерантность, способствуют накоплению его в различных органах и тканях, с последующим развитием в них необратимых структурных изменений, мало поддающихся лечению (В.Я. Карамышева, Т.С. Гулевская, В.В. Погодина и соавт., 2003).

Почки поражаются в 80 – 90% случаев вторичного амилоидоза и приблизительно в 30% – первичного амилоидоза. У таких больных наблюдается выраженная протеинурия, как проявление нефротического синдрома, характерного для этого страдания. По мере нарастания процесса, почки склерозируются, вызывая амилоидное сморщивание почек, что служит критерием развития хронической почечной недостаточности (R.Rysava, 2007; Грене Г.Й., Кисс Е., 2008).

Сложность патогенеза, многообразие висцеральных проявлений, трудность диагностики, малая эффективность терапии, свидетельствуют об актуальности проблемы амилоидоза в целом и нефропатического его типа в частности, что, в конечном итоге, является веским аргументом в пользу необходимости создания моделей амилоидоза и экспериментального изучения процесса.

С учетом того, что в основе развития амилоидоза лежат механизмы нарушения трофики и гипоксия пораженных органов с нарушением их функций, нами было отдано предпочтение ацизолу и милдронату в качестве профилаксирующих и лечебных средств, обладающих антигипоксическим, антиоксидантным и протекторными свойствами в частности.

Комбинированное использование милдроната и ацизола ранее не изучалось.

Цель работы - создание моделей экспериментального амилоидоза нефропатического типа, изучение их функциональных и гистос

структурных характеристик, анализ возможности корректирующего влияния на амилоидогенез милдроната в сочетании с ацизолом.

Задачи исследования.

1. Создать модель экспериментального генерализованного нефропатического амилоидоза у сирийских хомяков методом длительного введения нативной овечьей плазмы.

2. Создать модель экспериментального нефропатического генерализованного амилоидоза у сирийских хомяков, методом однократного введения нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда. Сравнить ее функционально-морфологические особенности с первой моделью при длительном введении амилоидогена.

3. Исследовать функционально-морфологические изменения в органах животных, получавших милдронат и ацизол с первых дней моделирования амилоидоза в целях профилактирующего действия.

4. Исследовать функционально-морфологические изменения в органах животных с моделью амилоидоза, получавших милдронат и ацизол в качестве лечебного воздействия при сформировавшемся амилоидозе.

Научная новизна.

Впервые получена модель системного амилоидоза, воспроизведенная длительным (60 дней) подкожным введением золотистым сирийским хомякам нативной овечьей плазмы через день из расчета 0,025 мл/г массы тела животного, с преимущественным поражением почек, а также поражением сердца, печени и селезенки.

Наряду с этим, впервые, получена модель системного амилоидоза, воспроизведенная однократным подкожным введением золотистым сирийским хомякам равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда из расчета по 0,2 мл в пять точек инъекций, с преимущественным поражением почек, а также поражением сердца, печени и селезенки.

Представлены особенности развития амилоидоза почек, сопровождающегося нарушением основных показателей электролитно-водовыделительной функции.

Выявлены изменения основных показателей мочеобразования и экскреции электролитов, как результат развития амилоидной нефропатии.

Показано, что введение милдроната и ацизола животным в конце 2-го месяца создания модели амилоидоза вызывает снижение функциональных и морфологических признаков поражения почек, приводя к снижению уровня протеинурии, частичному восстановлению ионо- и водовыделительной функции, а также регенерации стромально-сосудистых структур исследуемых органов (почки, сердце, печень, селезенка).

Установлено, что применение милдроната и ацизола с первых дней введения нативной овечьей плазмы у сирийских хомяков, способствует развитию менее выраженных нарушений электролитно- и водовыделительной функций почек, значительному уменьшению степени протеинурии, а также менее выраженной гистологически подтвержденной картиной повреждения изученных органов (почки, сердце, печень, селезенка).

По теме диссертационной работы, на основании результатов исследования получен патент Федерального института промышленной собственности Российской Федерации № 2536556, зарегистрированный 24 октября 2014 года, а также 2 приоритетные справки на предполагаемые изобретения.

Научно-практическая значимость работы.

Результаты экспериментального моделирования амилоидоза почек, воспроизведенного в 2 группах опытных животных, как с длительным введением амилоидогена, так и с однократным введением амилоидогена с адьювантом Фрейнда, создают возможность для получения новых моделей амилоидоза почек, вносят вклад в теорию этиологии и патогенеза амилоидоза.

Выявленные эффекты применения милдроната и ацизола, дают возможность апробации их лечебного и профилактического применения с целью восстановления электролитно-водовыделительной функции почек при амилоидозе.

Полученные результаты исследований могут служить дополнительным материалом при преподавании патофизиологических и гистоструктурных основ стромально-сосудистых диспротеинозов, при разработке способов профилактики и лечения амилоидоза.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Многократное введение золотистым сирийским хомякам нативной овечьей плазмы в дозе 0,025 мл/г массы тела подкожно, вызывает развитие полисистемного (генерализованного) амилоидоза с поражением почек, сердца, печени, селезенки.
2. Введение равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда в дозе по 0,2 мл в 5 точек инъекций подкожно однократно, также приводит спустя 1 и 2 месяца к развитию генерализованного амилоидоза с преимущественным поражением почек, сердца, печени и селезенки.
3. Проявлениями экспериментального амилоидоза являются протеинурия, и нарушения показателей ионо - и водовыделительной функции почек.
4. Введение милдроната и ацизола животным с моделью амилоидоза нефропатического типа приводит к уменьшению степени протеинурии, некоторому восстановлению ионо - и водовыделительной функции почек, что свидетельствует о положительном протекторном действии примененных препаратов.
5. Введение милдроната и ацизола одновременно с однократным введением равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда уменьшает степень формирования нарушений водовыделительной и ионовыделительной функции почек. Таким образом, введение милдроната и ацизола оказывает положительное

профилактирующее и корригирующее влияние на морфо-функциональные изменения при экспериментальном амилоидозе.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно выполнена работа по получению экспериментальных данных, изложенных в диссертации. Проведена математическая и статистическая обработка результатов исследования. Проанализированы и обобщены полученные результаты.

Подготовлены основные публикации по теме работы.

Публикации и апробация диссертационной работы. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 научных работ, из которых 3 в журналах, рекомендованных ВАК Минобразования России.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на 11-й Юбилейной научной сессии, посвященной 75-летию СОГМА (Владикавказ, 2014), представлены в материалах IV международной научно-практической конференции «Академическая наука-проблемы и достижения»(Nort Charleston, USA 2014).

Структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 119 страницах, иллюстрирована 36 рисунками и 10 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, общих выводов, списка использованной литературы и приложения. Библиографический указатель включает 181 источников, из них 77 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал и методы исследования. Опыты проводились на 180 сирийских хомяках-самцах массой 100-120 г. Для эксперимента были отобраны половозрелые самцы, с целью исключения возможных гормональных циклов и их влияния на водно-солевой обмен. Опытные животные в период эксперимента находились на стандартном рационе и имели свободный доступ к пище и воде. Световой режим - естественный.

Эксперименты проводились в 5 группах животных.

1 группа - контрольные (интактные) животные;

2 группа - амилоидная, полученная длительным подкожным введением нативной овечьей плазмы из расчета 0,025 мл/г массы тела животного через день на протяжении 60 дней;

3 группа – амилоидная, созданная однократным подкожным введением равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда в дозе по 0,2 мл в пять точек инъекций (подмышечные и паховые области слева и справа, и внутривентриально);

4 группа – хомяки, получающие милдронат подкожно из расчета 5 мг/кг массы тела животного и ацизол внутривентриально из расчета 30 мг/кг через день с первого дня длительного подкожного введения нативной овечьей плазмы в дозе 0,025 мл/г массы тела животного на протяжении 2-х месяцев;

5 группа – леченная, хомяки, получающие милдронат подкожно из расчета 5 мг/кг массы тела животного и ацизол внутривентриально из расчета 30 мг/кг через день спустя 2 месяца от начала создания модели амилоидоза, полученной однократным подкожным введением равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда в дозе по 0,2 мл в пять точек инъекций (подмышечные и паховые области слева и справа, и внутривентриально);

Исследования основных показателей во всех опытах в группах животных проводились через один и два месяца эксперимента. Функция почек изучалась в условиях спонтанного диуреза, для чего животные помещались в обменные клетки, где у них собиралась моча в течение 6 часов. Затем проводилось определение концентрации натрия, калия, кальция, креатинина и общего белка в моче.

По окончании срока эксперимента животные забивались под тиопенталовым наркозом. Проводилось исследование крови и тканей. В плазме крови определялись - содержание Na, K, Ca и общего белка.

При проведении экспериментальной работы руководствовались 11 статьей Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.).

Для морфологических исследований образцы тканей почек, печени, миокарда и селезенки фиксировали в 10% нейтральном формалине, после чего подвергали заливке в парафин с последующим приготовлением срезов толщиной 5- 6 микрон. Окрашивание срезов производили гематоксилином, эозином, красным конго. Полученные микропрепараты изучались в проходящем свете в проходящем свете при помощи микроскопа Микмед-1 под увеличением 200х400х600.

Концентрацию натрия и калия в биологических жидкостях определяли методом пламенной фотометрии с помощью автоматического пламенного фотометра ФПА, ЮНИКО-СИС, кальция - спектрофотометрически с помощью набора «Кальций» ООО «Агат-Мед» (г. Москва, Россия) на спектрофотометре - UNICO 2800.

Содержание креатинина в моче и плазме крови (по истечении 1 и 2-х месяцев эксперимента) определяли спектрофотометрически с помощью набора «Креатинин» ООО «Агат-Мед» (г. Москва, Россия) на спектрофотометре - UNICO 2800.

Рассчитывали, скорость клубочковой фильтрации по клиренсу эндогенного креатинина, с учётом объёма выделенной жидкости, а также уровень относительной канальцевой реабсорбции воды.

Содержание белка определяли спектрофотометрически (UNICO 2800) с использованием реактива Фолина. Расчеты скорости клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции воды, показателя почечной обработки катионов проводились по известным формулам (Ю.В. Наточин, 1974).

Математическую обработку результатов исследований во всех сериях опытов проводили на ПЭВМ Pentium-4 методом вариационного анализа по «t» критерию Стьюдента с использованием программы «Graph Pad Prism 4.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительная оценка способов моделирования экспериментального амилоидоза почек.

1.1. Моделирование с помощью длительного введения овечьей плазмы.

По истечении 1 месяца подкожных инъекций нативной овечьей плазмы с целью воспроизведения экспериментальной амилоидной нефропатии, было выявлено, увеличение диуреза сравнительно показателей интактных животных, обусловленное уменьшением канальцевой реабсорбции воды и повышением скорости клубочковой фильтрации (табл.1.п.2).

На 60-й день введения амилоидогена сравнительно с показателями фоновых животных наблюдалось уменьшение диуреза, обусловленное снижением скорости клубочковой фильтрации, хотя одновременно снижалась и канальцевая реабсорбция воды (табл.1.п.3).

Исследование ионовывделительной функции почек на 30-й день эксперимента, показало увеличение экскреции кальция, натрия и калия относительно показателей фоновых животных, обусловленное повышением их фильтрационного заряда (табл.2.п.2).

На 60-й день эксперимента экскреция этих катионов снизилась, но экскреция калия и кальция все же оставались выше фоновых показателей. Снижение экскреции являлось результатом выраженного снижения их фильтрационного заряда, хотя канальцевая реабсорбция кальция продолжала также снижаться (табл.2.п.3). Содержание белка в моче к концу 1-го месяца эксперимента достоверно повысилось относительно фоновых показателей, а к концу 2-го месяца эксперимента потеря белка увеличилась в 4 раза (табл.1.п.3).

При гистологическом исследовании почек у животных с длительным введением амилоидогена на 60-й день была отмечена конгофилия стенок приносящих и выносящих артериол клубочков, капиллярных петель, мезангия и базальной мембраны клубочковой капсулы имели место очаговая дистрофия и некроз эпителия канальцев, и его эксфолиация в просвет канальцев, с наличием здесь же скопления конгофильных субстанций, кистозные расширения отдельных канальцев (рис.1).

Показатели водовыделительной функции почек у животных при моделировании и профилактике амилоидной нефропатии.

Таблица 1.

Группы хомяков и кол-во животных	Стат. показатель	Диурез мл/час/100г	СКФ мл/час/100г	Реаб-сорбция воды %	Белок мг/мл
1. Фон (интактные) (n=30)	М	0,15	21,02	99,30	0,88
	m	0,005	0,739	0,024	0,02
2. Введение нативной овечьей плазмы в течение 1 мес. (n=15)	М	0,20	25,70	99,20	1,89
	m	0,007	1,135	0,016	0,071
*) достов. относит. п.1, табл. 1	Р	*)	*)	*)	*)
3. Введение нативной овечьей плазмы в течение 2 мес. (n=15)	М	0,1	14,32	99,08	3,8
	m	0,004	0,809	0,044	0,075
*) достов. относит. п.1, табл.1	Р	*)	*)	*)	*)
4. Введение нативной овечьей плазмы и милдроната с ацизолом в течение 1 мес. (n=15)	М	0,16	19,92	99,19	1,61
	m	0,011	0,517	0,062	0,071
*) достов. относит. п.1, табл.1	Р	**)	**)	-	*) **)
**) достов. относит. п.2, табл. 1					
5. Введение нативной овечьей плазмы и милдроната с ацизолом в течение 2 мес. (n=15)	М	0,13	17,14	99,07	1,01
	m	0,008	0,549	0,035	0,042
*) достов. относит. п.1, табл.1	Р	*) **)	*) **)	*)	*) **)
**) достов. относит. п.3, табл. 1					

Показатели электролитовыделительной функции почек у животных при моделировании и профилактике амилоидной нефропатии. Таблица 2.

Группы хомяков и кол-во животных	Стаг. показатель	ENa мкмоль /час/ 100г	Фз Na мкмоль /час/ 100г	RNa %	ESa мкмоль /час/ 100г	ФзСа мкмоль /час/ 100г	RSa %	ESk мкмоль /час/ 100г	Фз K мкмоль /час/ 100г
1.Фон (интактная) (n=30)	М	11,18	2705,32	99,58	0,49	32,10	99,49	6,37	91,19
	м	0,585	99,12	0,018	0,053	12,51	0,140	0,194	4,24
2.Введение нативной овечьей плазмы в течение 1 мес. (n=15)	М	16,30	3221,50	99,50	0,80	35,90	97,90	13,60	131,70
	м	0,527	147,465	0,024	0,07	1,737	0,157	0,95	7,86
*) достов.относит. п.1,табл. 2	Р	*)	*)	*)	*)	-	*)	*)	*)
3. Введение нативной овечьей плазмы в течение 2 мес. (n=15)	М	5,18	1903,99	99,72	0,64	17,27	96,25	6,49	80,5
	м	0,371	113,036	0,021	0,065	1,143	0,365	0,328	5,791
*) достов.относит.п.1,табл.2	Р	*)	*)	*)	-	*)	*)	-	-
4. Введение нативной овечьей плазмы и милдроната с ацизолом в течение 1 мес. (n=15)	М	13,48	2085,16	99,35	0,44	24,61	98,22	6,68	61,39
	м	0,998	140,437	0,024	0,058	1,661	0,202	0,455	4,367
*)достов.относит.п.1,табл.2	Р	*) **)	*) **)	*) **)	**)	*) **)	*)	**)	**)
***)достов.относит. п.2,табл.2									
5. Введение нативной овечьей плазмы и милдроната с ацизолом в течение 2 мес. (n=15)	М	11,59	2277,14	99,48	0,36	21,8	98,31	5,23	59,54
	м	0,801	78,77	0,044	0,045	1,288	0,269	0,428	2,548
*)достов. относит.п.1,табл.2	Р	**)	*) **)	*) **)	**)	*) **)	*) **)	*) **)	**)
***)достов. относит. п.3 ,табл.2									

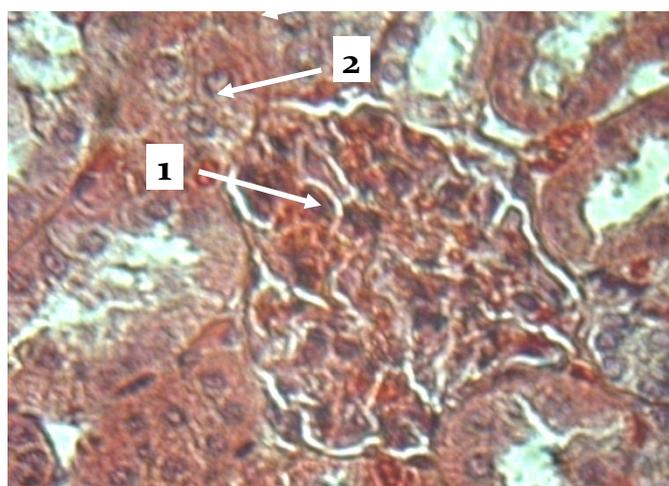


Рис.1. Почка у сирийских хомяков на 60-й день введения нативной овечьей плазмы. Отложение амилоида в клубочках (1) и канальцах почек (2) при длительном введении амилоидогена. Выраженная паренхиматозная дистрофия нефроцитов. Окраска красным конго (x 400).

1.2. Моделирование амилоидоза с помощью однократного введения амилоидогена с полным адъювантом Фрейнда.

Изучение показателей основных процессов мочеобразования, выявило, что после однократного введения амилоидогена с полным адъювантом Фрейнда у животных на 30-й день эксперимента отмечалось увеличение объема диуреза, обусловленное уменьшением величины канальцевой реабсорбции и некоторым ускорением клубочковой фильтрации относительно показателей интактных животных (табл.3.п.2).

Через 2 месяца эксперимента, выявлено снижение объема диуреза относительно фоновых показателей, обусловленное значительным снижением скорости клубочковой фильтрации, несмотря на низкую канальцевую реабсорбцию воды (табл.3.п.3).

Изучение ионоуретической функции почек у экспериментальных животных к концу 1-го месяца выявило значительное повышение экскреции кальция по сравнению с данными интактных животных, что было обусловлено снижением канальцевой реабсорбции катиона, несмотря на некоторое снижение его фильтрационного заряда (табл.4.п.2). Увеличивалась и экскреция калия, что вероятно, было обусловлено увеличением его фильтрационного заряда, а экскреция натрия снижалась. Через 2 месяца эксперимента уровень экскреции кальция и калия снизился, но все же оставался выше фоновых значений, хотя фильтрационный заряд продолжал снижаться, наряду с чем уменьшалась и канальцевая реабсорбция кальция. Уровень экскреции натрия резко снижался, что было обусловлено уменьшением фильтрационного заряда катиона (табл.4.п.3).

Потеря белка с мочой у амилоидных животных к концу эксперимента превышала в 4 раза показатели у фоновых животных (табл.3.п.3).

Показатели водовыделительной функции почек у животных при моделировании и терапии амилоидной нефропатии.

Таблица 3.

Группы хомяков и кол-во животных	Стат. показатель	Диурез Мл/час/100г	СКФ мл/час/ 100г	Реабсорбция воды %	Белок мг/мл
1.Фон (интактная) (n=30)	М	0,15	21,02	99,30	0,88
	m	0,005	0,739	0,024	0,02
2. Через 1 мес., введения нативной овечьей плазмы с адьювантом Фрейнда (n=15)	М	0,21	22	99,03	1,79
	m	0,007	0,905	0,031	0,046
*)достов.относит.п.1,табл.3 **)достов.относит. п.4, табл. 1	Р	*)	**))	*) **)	*)
3. Через 2 мес., введения нативной овечьей плазмы с адьювантом Фрейнда (n=15)	М	0,11	11,66	99,05	3,82
	m	0,004	0,460	0,030	0,007
*)достов. относит.п.1,табл.3 **)достов. относит. п. 5 , табл. 1	Р	*)	*)	*)	*)
4.Введение милдроната и ацизола амилоидным животным через 1 мес. (n=15)	М	0,14	24,28	99,42	2,62
	m	0,006	1,323	0,011	0,107
*) достов. относит.п.1, табл.3 **)достов.относит. п.2, табл.3	Р	**))	*)	*) **)	*) **)
5. Введение милдроната и ацизола амилоидным животным через 2 мес. (n=15)	М	0,18	33,27	99,47	1,61
	m	0,006	1,701	0,012	0,071
*) достов.относит. п.1, табл.3 **)достов.относит. п.3, табл. 3	Р	*)**)	*) **)	*) **)	*) **)

При изучении препаратов почек на 60-й день после однократного введения нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда (рис.2), отмечалась выраженная конгломерация стенок приносящих и выносящих артериол клубочков, капиллярных петель, мезангия и базальной мембраны клубочковой капсулы, а также некроз и кистозные расширения просвета канальцев. Отложение амилоида кроме этого наблюдалось в печени, миокарде и селезенке.

Показатели электролитовыделительной функции почек у животных при моделировании и терапии амилоидной нефропатии.

Таблица 4.

Группы хомяков и кол- во животных	Стат. пока-затель	ENa Мкмоль /час/ 100г	Фз Na Мкмоль /час/ 100г	RNa %	ЕСа Мкмоль /час/ 100г	ФзСа Мкмоль /час/ 100г	R Ca %	ЕК Мкмоль /час/ 100г	Фз К Мкмоль /час/ 100г
1.Фон (интактная) (N=30)	M	11,18	2705,32	99,58	0,49	32,10	98,49	6,87	91,19
	m	0,585	99,12	0,018	0,053	1,251	0,140	0,194	4,424
2. Через 1 мес., введения нативной овечьей плазмы с адьювантом Фрейнда (n=15)	M	10,82	2752,70	99,35	0,99	30,31	96,76	11,67	119,25
	m	0,805	116,58	0,024	0,093	1,300	0,285	0,492	7,284
*)достов.относит.п.1,табл.4 **) достов.относит.п. 2,табл.2	P	**))	*) **))	*) **))	*))	**))	*)**)))	*))	*))
3. Через 2 мес. введения нативной овечьей плазмы с адьювантом Фрейнда (n=15)	M	5,85	1548,73	99,48	0,73	14,15	94,84	7,33	65,62
	m	0,417	62,894	0,044	0,077	0,841	0,477	0,324	4,024
*)достов.относит.п.1,табл.4 **) достов. относит. п.3 ,табл. 2	P	*))	*) **))	*) **))	*))	*) **))	*) **))	-	*) **))
4.Введение милдроната и ацизола амилоидным животным через 1 мес. (n=15)	M	8,43	3142,60	99,73	0,83	39,83	97,93	9,74	122,65
	m	0,639	173,211	0,015	0,094	2,119	0,230	0,550	7,404
*)достов.относ. п.1,табл. 4 **) достов.относит.п.3, табл.4	P	*) **))	*))	*)**)))	*))	-	*)**)))	*)**)))	*))
5. Введение милдроната и ацизола амилоидным животным через 2 мес. (n=15)	M	15,51	4147,53	99,62	0,48	70,30	99,30	7,01	40,92
	m	0,773	197,404	0,011	0,058	4,146	0,091	0,471	2,418
*) достов.относит. п.1, табл.4 **) достов.относит.п.3,табл. 4	P	*) **))	*)**)))	-	**))	*)**)))	**))	-	*)**)))

Сравнительная оценка вышеприведенных способов моделирования амилоидоза почек свидетельствуют о достаточной эффективности моделирования экспериментального амилоидоза, причем, применение смеси нативной овечьей плазмы с полным адьювантом Фрейнда, способствует

укорочению сроков развития нефропатического типа экспериментального амилоидоза у животных.

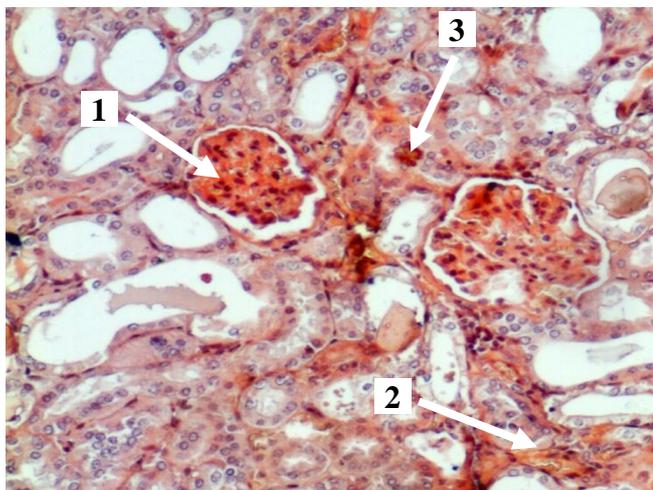


Рис.2. Морфологические изменения в почках у сирийских хомяков через 60 дней после однократного введения равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы с полным адьювантом Фрейнда. Конгофилия сосудистых клубочков (1) и базальных мембран канальцев (2) и стромально-сосудистых структур почки (3). Окраска красным конго (x200).

2. Экспериментальная профилактика развития амилоидоза (применение милдроната и ацизола с 1-го дня моделирования).

Перед проведением основных исследований, нами, смесь ацизола и милдроната вводилась фоновым (интактным) животным. Причем, существенных изменений изученных показателей при этом не наблюдалось. Через 1 месяц введения милдроната и ацизола на фоне длительного введения амилоидогена относительно амилоидной группы животных, наблюдалось снижение степени нарушений основных процессов мочеобразования, т.е., меньшее увеличение диуреза, обусловленное менее значимым снижением фильтрационной способности почек (табл.1.п.4). Через 2 месяца диурез снизился ниже показателей интактных животных, что было обусловлено падением скорости клубочковой фильтрации, несмотря на уменьшение канальцевой реабсорбции воды (таблица 1.п.5).

Изучение показателей ионоуретической функции почек, показало что, на 30-й день эксперимента экскреция калия была достоверно ниже, что было обусловлено меньшим увеличением его фильтрационного заряда относительно амилоидных животных. При изучении экскреции натрия отмечалось менее значимое увеличение катиона, что было обусловлено меньшим увеличением его фильтрационного заряда. При исследовании экскреции кальция с мочой у сирийских хомяков на 30-й день эксперимента, было выявлено, что введение милдроната и ацизола на фоне длительного введения нативной овечьей плазмы, вызывает нормализацию экскреции кальция, что обусловлено уменьшением его фильтрационного заряда, при восстановлении канальцевой реабсорбции катиона (таблица 2.п.4).

Через 2 месяца эксперимента экскреция натрия относительно амилоидной группы животных значительно повысилась, приближаясь к фоновым значениям, что было обусловлено тенденцией к восстановлению его фильтрационного заряда и реабсорбции его канальцами почек, а экскреция калия и кальция продолжала снижаться, что было обусловлено уменьшением их фильтрационного заряда. Степень протеинурии значительно снизилась, но все же превышая фоновые показатели (таблица 2.п.5).

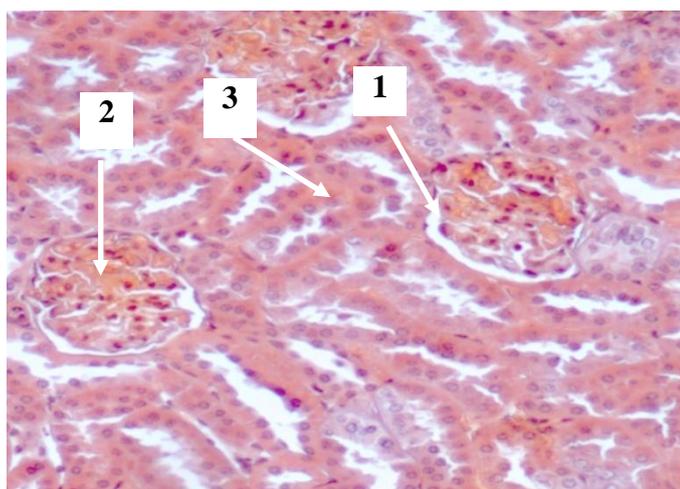


Рис.3. Почка у сирийских хомяков через 60 дней от начала введения в качестве протектора милдроната и ацизола. Снижение признаков конгофилии базальной мембраны клубочковой капсулы (1) и капиллярных петель сосудистого клубочка (2), восстановление базальной мембраны канальцев (3). Окраска красным конго (x400).

Морфологически, профилактирующее действие на почки выразалось достоверными признаками регенерации клеточных и стромально-сосудистых

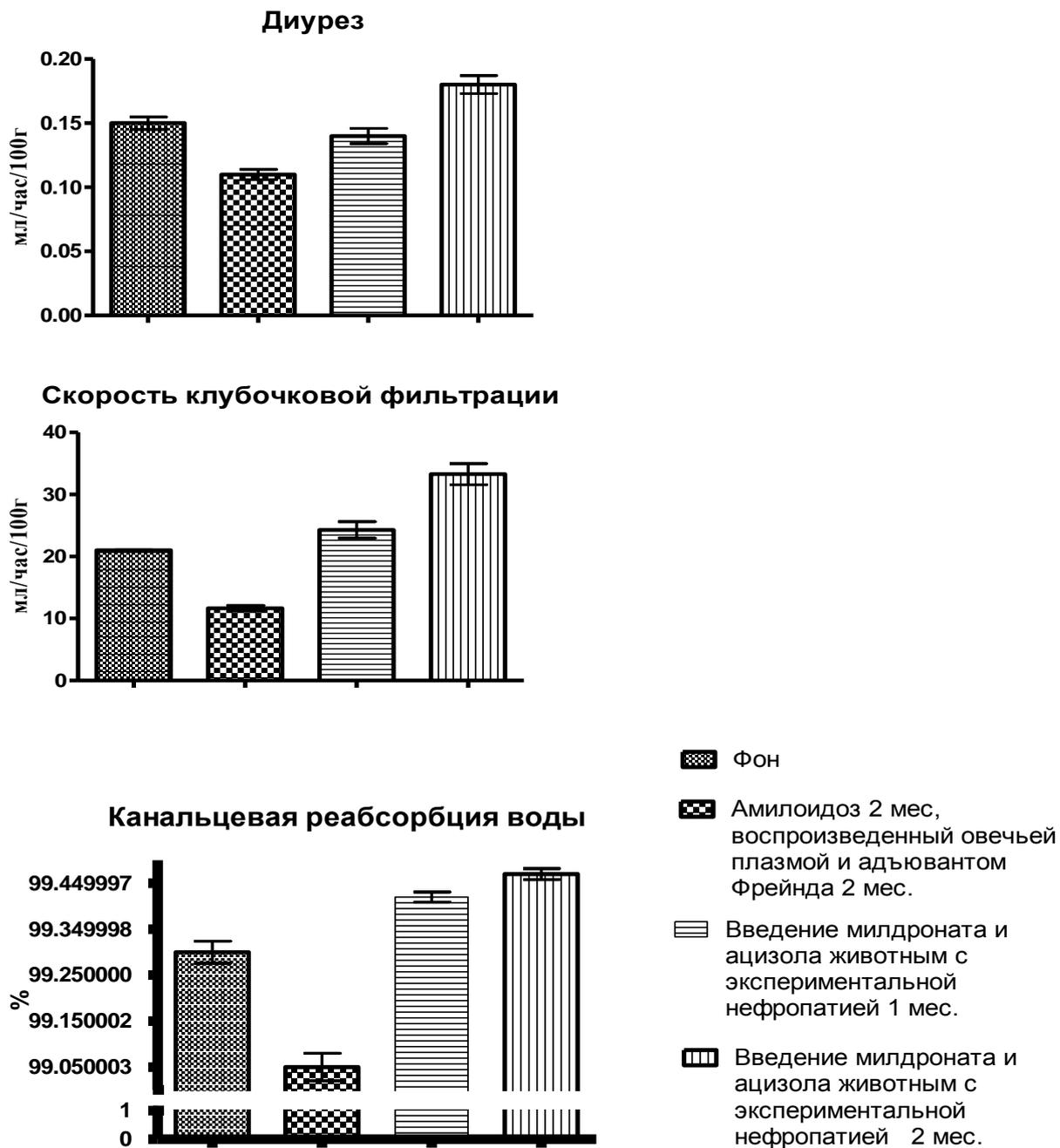


Рис. 4. Изменения основных процессов мочеобразования при моделировании амилоидоза и его лечении.

структур, заключающимися в снижении их конгофильности, активной регенерации нефротелия, гипертрофии отдельных клубочков, пролиферации лимфогистиоцитарных элементов, снижении конгофильных масс в просвете канальцев, уменьшении отека и лимфостазов (рис.4.6).

3. Экспериментальная терапия модели амилоидоза .

При введении милдроната подкожно из расчета 5 мг/кг массы тела животного и ацизола внутривентрикулярно из расчета 30 мг/кг через день золотистым сирийским хомякам спустя 2 месяца создания модели экспериментального амилоидоза почек, моделированного однократным введением равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда, на 30-й день имело место увеличение объема диуреза относительно показателя амилоидных животных, обусловленное ускорением клубочковой фильтрации с одновременным повышением величины канальцевой реабсорбции (рис.4; табл.3.п.4).

В конце второго месяца введения препаратов, наблюдалось более выраженное восстановление объема диуреза, обусловленное повышением скорости клубочковой фильтрации более чем в 2,5 раза, несмотря на нарастание величины канальцевой реабсорбции (рис.4; табл.3.п.5).

При изучении ионоуретической функции на 30-й день эксперимента отмечалось повышение кальций и калийуреза, нарастание экскреции натрия (табл.4.п.4), а также наблюдалось значительное снижение потери белка. На 60-й день потеря белка снизилась почти в 2 раза, относительно показателя амилоидных животных (табл.3.п.5). Имело место также достоверное повышение натрийуреза, при мало меняющейся реабсорбции этого катиона, снижение калий и кальцийуреза, при уменьшении фильтрационного заряда калия, и увеличении фильтрационного заряда натрия и кальция (табл.4.п.5)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективном корригирующем влиянии милдроната и ацизола на показатели

основных процессов мочеобразования, экскрецию электролитов и белка у животных с имеющейся моделью амилоидной нефропатии. Перечисленные показатели приближались к показателям интактных животных.

Морфологически на 60-е сутки лечения милдронатом и ацизолом (рис.5), в почках отмечалась активная регенерация капилляров и эндотелия клубочков почек, снижение количества амилоида в клубочках и в базальных мембранах канальцев и сосудов.

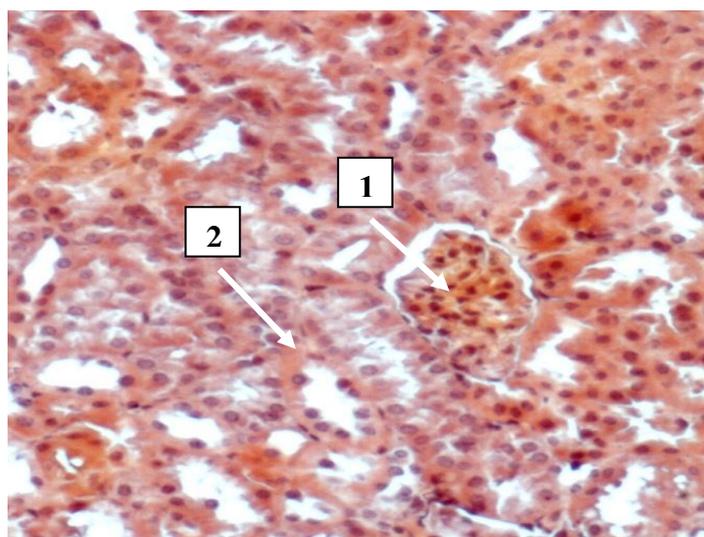


Рис.5. Почка у сирийских хомяков на 60-е сутки лечения милдронатом и ацизолом. Снижение отложения амилоида в клубочках (1) и в базальных мембранах канальцев (2). Окраска красным конго (x 400).

Сосудистые клубочки округлой формы с хорошо выраженным просветом клубочковой капсулы, содержащей фильтрат и слущенные эпителиальные клетки наружного листка капсулы. Базальные мембраны канальцев несколько утолщены, в просвете канальцев небольшое количество фильтрата. Количество ядер клубочковых капилляров и канальцев приближено к норме.

Результаты исследования позволили сформировать следующую схему патогенеза амилоидоза почек и механизмов действия препаратов. В приведенной ниже патогенетической схеме показано, что способ длительного введения нативной овечьей плазмы, также как и однократного введения ее с

адьювантом Фрейнда, приводят к развитию структурно-морфологических нарушений, характерных для амилоидной нефропатии: снижение диуреза, обусловленное уменьшением скорости клубочковой фильтрации (при снижении канальцевой реабсорбции воды), протеинурия и нарушение электролитного баланса.

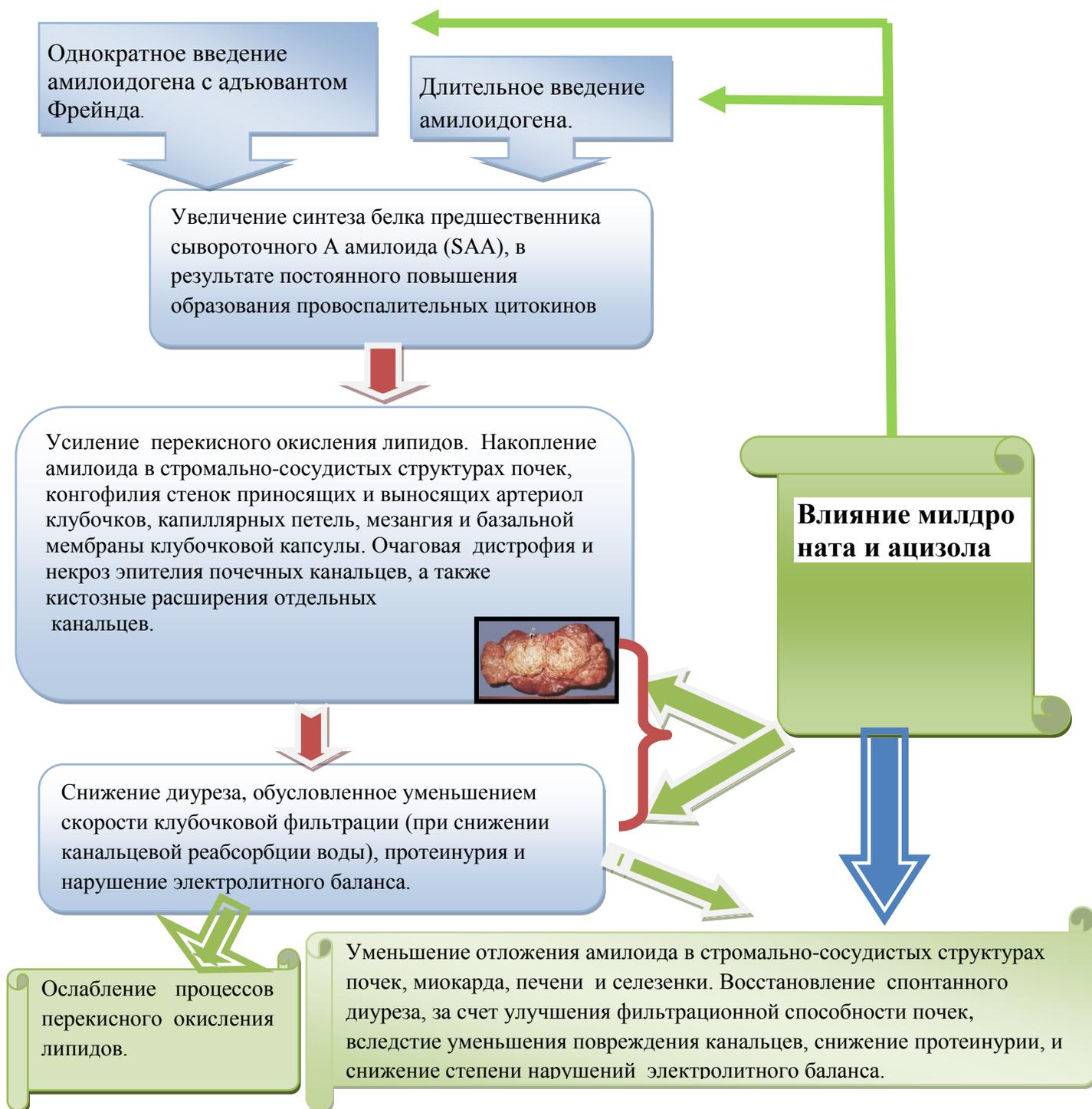


Рис. 6. Патогенетическая схема развития моделей полисистемного амилоидоза у сирийских хомяков, а также влияния милдроната и ацизола.

Применение милдроната и ацизола, оказывает положительное профилактирующее и корригирующее влияние на морфофункциональные изменения при экспериментальном амилоидозе.

ВЫВОДЫ

1. Многократное подкожное введение нативной овечьей плазмы сирийским золотистым хомякам в течение 2-х месяцев вызывает развитие экспериментального амилоидоза с отложениями амилоида в структурах почек, селезенки, миокарда, стенках кровеносных сосудов. Амилоидная нефропатия проявляется выраженной протеинурией, снижением объема 6-ти часового спонтанного диуреза при уменьшении скорости клубочковой фильтрации, экскреции электролитов.

2. Однократное введение нативной овечьей плазмы в равнодолевой смеси с адьювантом Фрейнда золотистым сирийским хомякам через 1 и 2 месяца эксперимента вызывает развитие системного амилоидоза с выраженными морфофункциональными признаками амилоидной нефропатии.

3. Сравнительная оценка результатов проведенных экспериментов, выявила, что однократное введение равнодолевой смеси нативной овечьей плазмы и полного адьюванта Фрейнда в сравнении с длительным введением нативной овечьей плазмы, является более эффективным способом моделирования экспериментального амилоидоза, что обусловлено развитием более выраженных морфофункциональных нарушений.

4. Введение ацизола в дозе 30 мг/кг внутрижелудочно и милдроната в дозе 5 мг/кг подкожно через день на протяжении 2-х месяцев с первого дня введения амилоидогена способствует уменьшению степени выраженности нарушения ионо - и водовыделительной функции, а также протеинурии, значительно снижает развитие гистоструктурных изменений, характерных для амилоидоза, т.е. оказывает профилактирующее действие.

5. Применение милдроната в дозе 5 мг/кг подкожно и ацизола в дозе 30 мг/кг интрагастрально через день в конце 2 –го месяца создания модели

амилоидоза оказывает положительное корригирующее влияние на показатели основных процессов мочеобразования и экскрецию электролитов у животных с имеющейся моделью амилоидной нефропатии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кисиева, З.А. Патоморфологическая характеристика новой модели экспериментального амилоидоза нефропатического типа у золотистых сирийских хомяков / З.А. Кисиева, К.М. Закс, К.М. Козырев // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. -Т. XX, №1. – С.109-113.
2. Кисиева, З.А. Влияние милдроната и ацизола на основные процессы мочеобразования и экскрецию электролитов у сирийских золотых хомяков с моделью экспериментальной амилоидной нефропатии / З.А.Кисиева, В.Б. Брин, К.М. Козырев // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 2.
3. Кисиева, З.А. Экспериментальный амилоидоз почек, воспроизводимый смесью овечьей плазмы с адьювантом Фрейнда / З.А. Кисиева // Владикавказский медико-биологический вестник. - 2014. - Т. XIX, № 28. – С. 64-67.
4. Кисиева, З.А. Сравнительная оценка способов моделирования экспериментального амилоидоза почек / З.А. Кисиева // Материалы 11-й юбилейной научной сессии, посвященной 75-летию СОГМА.- Владикавказ. - 2014. - С.119-125.
5. Кисиева, З.А. Экспериментальная терапия амилоидоза у сирийских хомяков / З.А. Кисиева // Материалы IV международной научно-практической конференции «Academic science problems and achievements IV» North Charleston, USA. - 2014г. - VOL.1. - P.33-37.
6. **Патент № 2536556 Российская Федерация, МПК G 09 В 23/28.**
Способ моделирования генерализованного амилоидоза у животных [Текст] Кисиева З.А., Брин В.Б., Козырев К.М.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ.
Заявка № 2013104070/14; заявл., 30.01.2013; опубл. 27.12. 14, Бюл.№.-36
1 пр., 2 табл., 4 ил.