

© С. Н. Луканина, А. В. Сахаров, К. В. Жучаев, А. Е. Просенко

DOI: [10.15293/2226-3365.1605.14](https://doi.org/10.15293/2226-3365.1605.14)

УДК 576+612+616

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ УПРАВЛЕНИЯ МЕХАНИЗМАМИ НЕФРОПАТИИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

С. Н. Луканина, А. В. Сахаров, К. В. Жучаев, А. Е. Просенко (Новосибирск, Россия)

*Целью работы стало изучение свободно радикального механизма нефропатии и оценка возможности управления антиоксидантом «Тиофан» структурно-функциональными нарушениями в почках крыс при глюкокортикоид-индуцированном окислительном стрессе.*

*Содержание и локализацию в паренхиме почки белков проапоптозного фактора ARAF-1 определяли методом непрямого иммуногистохимического анализа, проведенного по общепринятой методике. Блокирование эндогенной пероксидазы проводили 3-процентным раствором перекиси водорода в депарафинированных срезах. В качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела к белку ARAF-1 (LabVision, 1:100). Для метки вторичных антител использовали авидин-биотиновый комплекс (UltraVHRPpolymerKIT, LabVision).*

*Показано, что недостаточность почечных функций у животных, длительно получающих глюкокортикоиды, обусловлена повреждением компонентов фильтрационного аппарата почечного клубочка и тубулоинтерстициальными нарушениями. Установлено, что длительное использование глюкокортикоидов приводит к повышению уровня экспрессии проапоптозного фактора ARAF-1 и летальному повреждению клеток нефротелия по механизму апоптоза. Ограничение свободно радикальных процессов путем использования полифункционального серосодержащего антиоксиданта «Тиофан» снижает развитие структурно-функциональных нарушений в почечных клубочках и количество эпителиоцитов с признаками апоптоза в канальцах нефронов.*

**Ключевые слова:** окислительный стресс, глюкокортикоиды, почка, апоптоз, антиоксиданты.

**Луканина Светлана Николаевна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности, Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: [lukanina@ngs.ru](mailto:lukanina@ngs.ru)

**Сахаров Андрей Валентинович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии и методики обучения биологии, руководитель научно-образовательного центра «Экспериментальная и прикладная биология», Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: [asakharov142@rambler.ru](mailto:asakharov142@rambler.ru)

**Жучаев Константин Васильевич** – доктор биологических наук, профессор, декан биолого-технологического факультета, Новосибирский государственный аграрный университет.

E-mail: [zhuchaev@ngs.ru](mailto:zhuchaev@ngs.ru)

**Просенко Александр Евгеньевич** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химии, Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: [chemistry@ngs.ru](mailto:chemistry@ngs.ru)

## Введение

Почки являются центральным органом осмо-, волюмо- и ионорегуляции, стабилизации кислотно-основного равновесия и от их функциональной активности во многом зависит способность организма к поддержанию гомеостаза [12]. В настоящее время отмечается неуклонный рост хронических заболеваний почек, сопровождающихся потерей действующих нефронов, развитию хронической, а в итоге – терминальной почечной недостаточности, требующей дорогостоящих методов заместительной терапии [18].

Несмотря на появление новых методов и схем лечения, арсенал иммунодепрессивных препаратов, применяемых для терапии почечных заболеваний, с начала 1970-х гг. почти не изменился и ведущие позиции в нем по-прежнему занимают глюкокортикоиды [19]. Имея достаточно широкий спектр положительных воздействий на организм, глюкокортикоидные препараты при длительном использовании приводят к ряду серьезных осложнений. Формирующаяся у пациентов стероидная зависимость (развитие рецидива при попытке отмены, а иногда и снижения дозы глюкокортикоидов) ведет к тяжелым проявлениям стероидной токсичности, проявляющейся в развитии ожирения, остеопороза, диабета, гипертонии. Активация свободнорадикального перекисного окисления липидов (СПОЛ) является одним из наименее изученных механизмов патогенеза стероидных осложнений. В немногочисленных публикациях нами было обнаружено упоминание о развитии окислительного стресса при длительном применении глюкокортикоидов [17]. Считается, что повреждение клеток различных тканей активными метаболитами кислорода (АМК) осуществляется путем окислительной модификации макромолекул (белков, липидов, ДНК) и в настоящее время описан целый класс заболеваний,

имеющих свободно радикальное происхождение [1; 3; 5; 6; 9–10; 17; 19].

Необходимо признать, что в публикациях последних лет вопрос о свободно-радикальной природе нефропатий почти не затрагивался. Это обстоятельство стало основанием для проведения данного исследования [13; 16].

**Целью** настоящей работы стало изучение свободно радикального механизма нефропатии и оценка возможности управления антиоксидантом «Тиофан» структурно-функциональными нарушениями в почках крыс при глюкокортикоид-индуцированном окислительном стрессе.

## Материалы и методы исследования

Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар массой 250–300 г. Манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с международными принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Все крысы были распределены на четыре группы по десять особей в каждой. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и корму. Крысам контрольной и двух групп сравнения (ГС) ежедневно в течение 14 суток вводили водную суспензию синтетического глюкокортикоида «Преднизолон Никомед» («Никомед Австрия ГмбХ», Линц, Австрия) в дозе 50 мг/кг с помощью внутрижелудочного зонда, инициируя у них развитие окислительного стресса [11]. Для чистоты эксперимента и стандартизации манипуляций, связанных с введением в организм веществ, крысам первой группы сравнения через три часа после преднизолона вводили 0,2 мл водопроводной воды. Животные второй группы сравнения по аналогичной схеме получали антиоксидант «Тиофан» (НП «Новосибирский институт антиоксидантов», Новосибирск, Россия) (в дозе

100 мг/кг веса), растворенный в 0,2 мл растительного масла производства ОАО «ЭФКО» торговой марки *Altero Golden*. В связи с тем, что «Тиофан» – жирорастворимый антиоксидант, крысам контрольной группы после приема преднизолона внутривентрикулярно вводили только растворитель антиоксиданта – растительное масло производства ОАО «ЭФКО» торговой марки *Altero Golden* (0,2 мл).

На пятнадцатые сутки наблюдения крыс выводили из эксперимента путем передозировки эфирным наркозом. У животных всех групп забирали равные половины левой почки. Для проведения иммуногистохимического исследования образцы почки крыс фиксировали в 10-процентном растворе нейтрального формалина, обезживали в растворах изопропанола возрастающей концентрации и заливали в гистомикс. С помощью полуавтоматического ротационного микротомы (*SLEE CUT 5062*, Германия) изготавливали серийные срезы толщиной 3–5 микрон.

Имуногистохимическое (ИГХ) исследование содержания и локализации в паренхиме почки белков апоптозного фактора *APAF-1* проводили на базе группы микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (руководитель группы – д-р биол. наук, профессор Е. И. Рябчикова).

Имуногистохимические реакции ставили по общепринятой методике. Блокирование эндогенной пероксидазы проводили 3 %

раствором перекиси водорода в депарафинированных срезах. Демаскировку антигенов осуществляли в СВЧ печи в течение 20 минут в цитратном буфере с  $pH = 6,0$ . В качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела к белку *APAF-1* (*LabVision*, 1:100). Для метки вторичных антител использовали авидин-биотиновый комплекс (*UltraVHRPpolymerKIT*, *LabVision*). Для визуализации места связывания антигена с антителом использовали метку – фермент пероксидазу хрена в присутствии субстрата пероксида водорода и колориметрического реактива с 3,3-диаминобензидином (*DABsubstrate + chromogen*, *LabVision*). В результате образовывался нерастворимый в органических растворителях конечный продукт реакции, который визуализировался в виде светло-коричневого окрашивания структур клеток. Для облегчения визуализации локализации антигенов в тканях проводили окраску ядер гематоксилином. Ставили негативный и позитивный контроль.

Результаты ИГХ реакций для *APAF-1* оценивали в баллах по количеству позитивно окрашенных клеток [4], а также оценивали локализацию продукта реакции (мембранная и цитоплазматическая) и интенсивность окрашивания [14]. Оценку интенсивности реакции проводили по шести балльной системе (табл.).

Таблица

**Балльная шкала оценки иммуногистохимических реакций**

Table

**Point scale of evaluation of immunohistochemical reactions**

Баллы	6 баллов	4 балла	2 балла	1 балл	0 баллов
Яркость окраски	++++	+++	++	+	–
Количество окрашенных клеток	более 40 %	20–40 %	10–20 %	5–10 %	0 или менее 5 %

Статистический анализ результатов исследования проводили на основе определения медианы и квартилей ( $Me (Q25; Q75)$ ). Различия показателей между группами оценивали методом вариационной статистики по непараметрическому  $U$ -критерию Манна–Уитни для независимых выборок и считали статистически значимыми при уровне  $p \leq 0,05$ . Расчеты производили по общепринятым формулам с использованием стандартных программ пакета *Statistica 7.0 for Windows*.

### Результаты исследования

При изучении уровня экспрессии белка *APAF-1* в образцах почек интактных животных изменения тинкториальных свойств ткани нами не обнаружены и реакция клеток характеризуется как негативная. Это свидетельствует об отсутствии выраженных апоптотических процессов в структурных элементах почечных телец и канальцев нефронов (рис. 1).

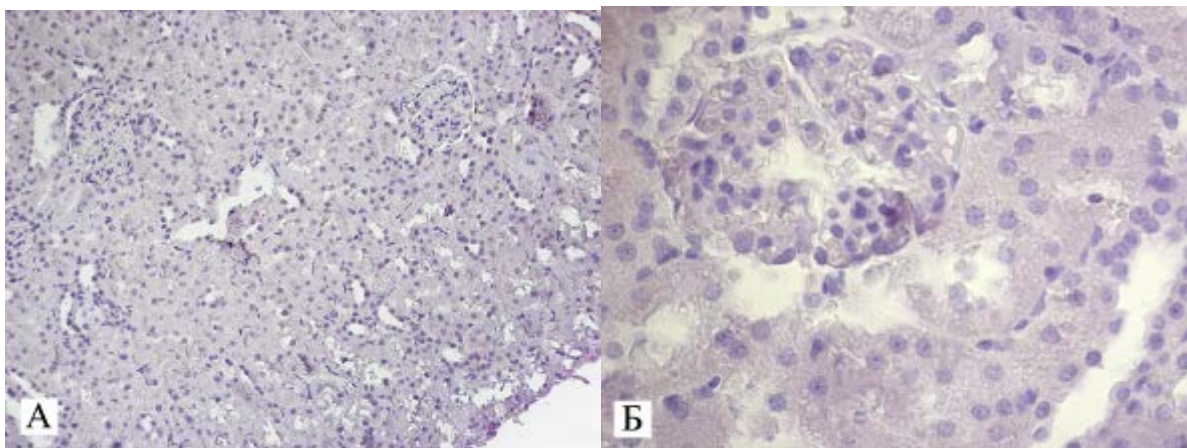


Рис. 1. Выявление экспрессии белка *APAF-1* в образцах почек животных интактной группы

*Fig. 1. Detection of protein expression APAF-1 in kidney samples intact group of animals*

#### Примечание.

А – негативная иммуногистохимическая реакция в корковом и мозговом веществе почки. Ув. 100 х; Б – негативная иммуногистохимическая реакция среди клеток почечного тельца и нефротелия проксимального и дистального отделов канальца нефрона. Ув. 400 х.

При анализе активности апоптоза в препаратах почек животных, длительно принимавших глюкокортикоиды, обнаружена выраженная позитивная реакция на окрашивание белка *APAF-1*. Локализация клеток нефротелия с позитивной реакцией на данный белок обнаруживается преимущественно в корковом веществе почки (рис. 2 А).

Следует отметить, что высокий уровень экспрессии данного фактора обнаружен в нефроцитах проксимального и дистального

отделов канальцев нефрона (рис. 2 В, Г). Среди клеток мезангия почечного тельца реакция на данный белок характеризуется как негативная (рис. 2 Б). Слабая реакция на исследуемый белок отмечается среди клеток эндотелия и подоцитов. По балльной шкале уровень экспрессии фактора *APAF-1* в образцах ткани крыс данной группы в эпителии почечных телец составил  $1,71 \pm 0,24$ , а в эпителии канальцев –  $4,29 \pm 0,31$  баллов.

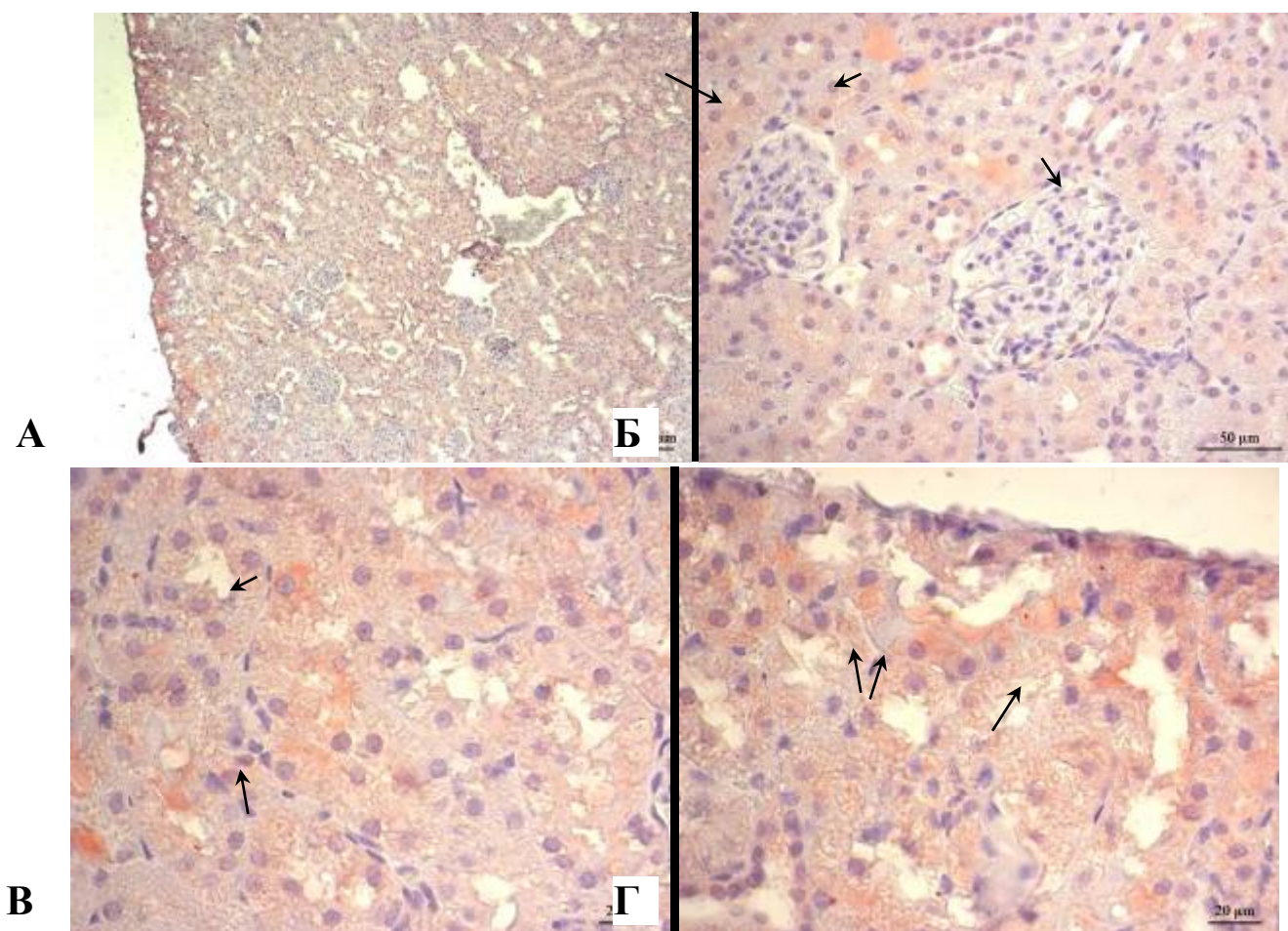


Рис. 2. Выявление экспрессии белка APAF-1 в образцах почек животных первой группы сравнения  
*Fig. 2. Detection of the protein expression of Apaf-1 in kidney samples animals of the first group of comparison*

*Примечание.*

А, Б – положительная иммуногистохимическая реакция в корковом и мозговом веществе почки. Ув. 100 х и 200 х; В, Г – положительная иммуногистохимическая реакция среди клеток почечного тельца и нефротелия проксимального и дистального отделов канальца нефрона. Ув. 400 х. Стрелками показаны очаги положительной иммуногистохимической реакции.

По тинкториальным характеристикам ИГХ реакции, количеству позитивно реагирующих клеток и их гистотопографии, образцы почек животных контрольной группы не имели различий с тканью почек крыс первой группы сравнения.

При изучении уровня экспрессии проапоптозного фактора *APAF-1* в почках крыс

второй ГС установлено, что локализации продуктов реакции аналогична таковой у животных первой группы сравнения. Однако количество клеток с молекулярным маркером апоптоза в ткани почек животных, получавших антиоксидант «Тиофан» было достоверно меньше, а интенсивность ИГХ реакции ниже, чем у крыс, принимавших только глюкокортикоиды (рис. 3).

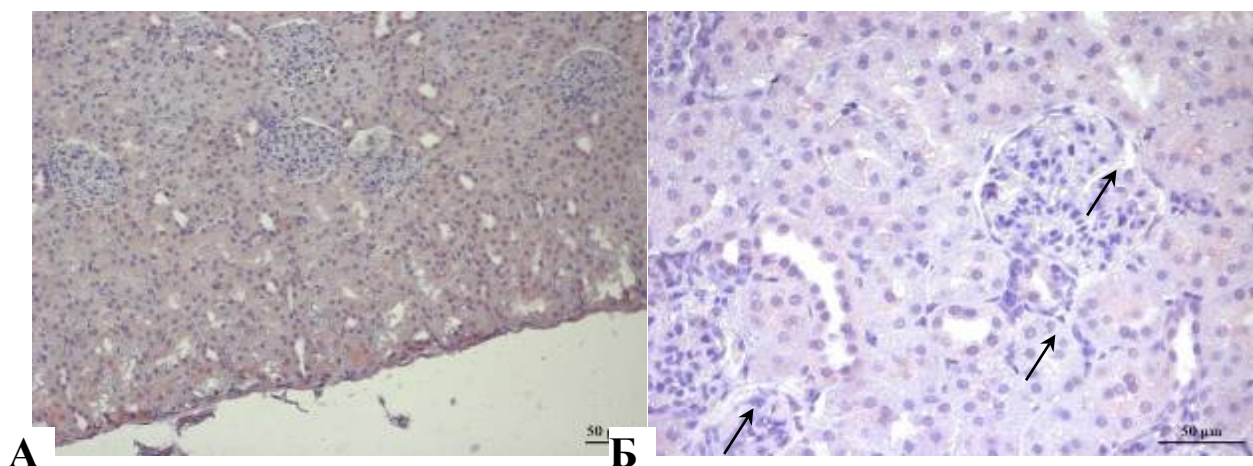


Рис. 3. Выявление экспрессии белка *APAF-1* в образцах почек животных второй группы сравнения  
 Fig. 3. Detection of protein expression *Apaf-1* in kidney samples animals of the second group of comparison

Примечание.

А – положительная иммуногистохимическая реакция в корковом и негативная иммуногистохимическая реакция в мозговом веществе почки. Ув. 100 х; Б – негативная иммуногистохимическая реакция среди клеток почечного тельца и слабая положительная реакция в нефротелии проксимального и дистального отделов канальца нефрона. Ув. 400 х. Стрелками обозначены клетки с положительной реакцией на белок *APAF-1*.

По балльной шкале содержание данного маркера в почках этих животных оказалось достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже показателей крыс пер-

вой ГС и составило:  $0,97 \pm 0,11$  баллов в структурных элементах почечных телец и  $2,13 \pm 0,19$  – в канальцах нефронов (рис. 4).

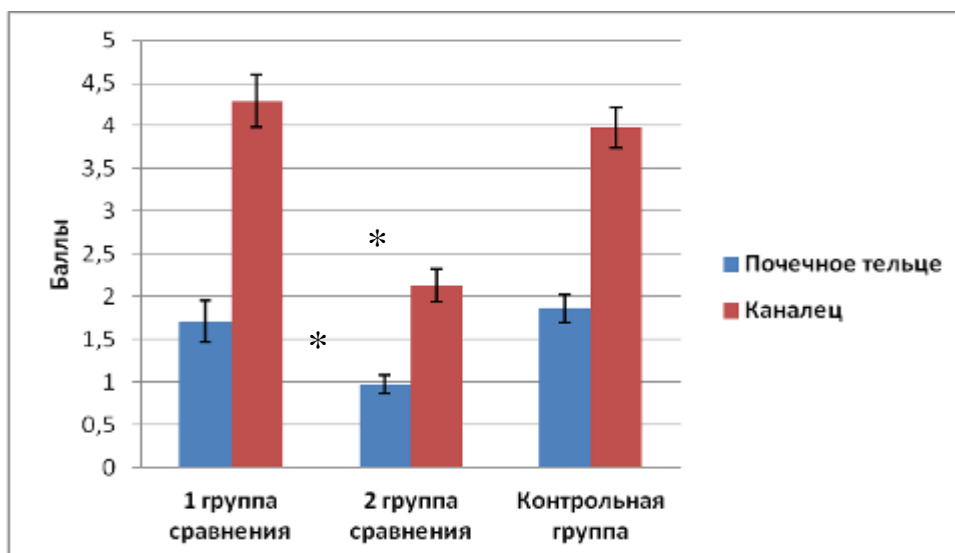


Рис. 4. Иммуногистохимические показатели экспрессии белка *APAF-1* в тканях почек крыс исследуемых групп (баллы)

Fig. 4. Immunohistochemical indicators of protein expression *APAF-1* in renal tissues of rats studied groups (points)

Примечание.

\* – статистически значимые различия между показателями животных первой и второй ГС ( $p \leq 0,05$ ).

### Обсуждение

При обсуждении полученных результатов, хочется отметить, что к нефропатиям относятся процессы, провоцирующие развитие нарушений и снижающие активную деятельность почечной ткани вследствие поражения структурных элементов нефрона и интерстиция, фиброза паренхимы клубочкового аппарата и канальцев органа. Несмотря на различную этиологию, прогрессирование нефропатий имеет одну общую особенность. Она характеризуется клеточной пролиферацией с накоплением внеклеточного матрикса и последующим сморщиванием ткани. При этом компоненты матрикса влияют на чувствительность мезангия к различным индукторам апоптоза, что приводит к значительным потерям гломерулярных клеток и развитию гломерулосклероза [2; 7].

В настоящее время многие исследователи считают, что апоптоз при стрессе является одним из ключевых механизмов, определяющих специфику реакции организма на стрессор [2; 8; 20]. Превышение в течение длительного времени физиологической концентрации глюкокортикоидов в крови стимулирует избыточную продукцию высокоактивных АМК, провоцирующих нарушение целостности различных клеточных структур.

В исследованиях по изучению морфологии почек крыс при глюкокортикоид-индуцированном окислительном стрессе, проведенных ранее, нами показано, что в условиях хронической глюкокортикоидной нагрузки в организме крыс происходит усиление свободно радикальных процессов, локальным проявлением которого являются глубокие нарушения структурной организации паренхимы органа [15]. При этом установлено, что наиболее выраженные повреждения регистрируются в сосудистых клубочках, главным образом, корковых нефронов. В качестве основного механизма

этих повреждений рассматривается возникающая под влиянием глюкокортикоидов гипертензия, которая приводит к ишемии органа и, впоследствии, к гипоксии. Корковые нефроны по сравнению с юкстамедуллярными оказываются более ишемизированными и в большей степени подверженными гипоксическому повреждению. В связи с тем, что при гипоксии происходит разобщение окислительного фосфорилирования и, как следствие, повышенная генерация клетками АМК, механизм свободнорадикального повреждения данного компонента нефрона предлагается как доминирующий.

Вместе с тем результаты настоящей работы дают все основания полагать, что недостаточность почечных функций у животных, длительно получающих глюкокортикоиды, обусловлена не только повреждением клубочкового аппарата, но и летальным повреждением клеток нефротелия. Об этом свидетельствует повышенный уровень экспрессии проапоптозного фактора *APAF-1* преимущественно в клетках эпителия канальцев нефронов, и в меньшей степени в клетках почечного тельца (рис. 2, 4). Считается, что гибель тубулярных эпителиоцитов может происходить по двум молекулярным маршрутам. Один из них связан с передачей сигналов *FAS/FAS-L* (белок *Fas/APO-1*, также называемый *CD95* (*CD – cluster differentiation*)), способен запускать в клетке апоптоз после взаимодействия с его лигандом (*FasL*) посредством *JNK* (*c-Jun N-terminal kinase*). Другой молекулярный маршрут связан с *RANK/RANK-L* (*receptor activator of NFkB*) [2]. С нашей точки зрения, механизм программируемой гибели клеток нефротелия в группе животных с моделью окислительного стресса опосредуется высвобождением цитохрома *C* из митохондрий, поврежденных АМК, который в цитоплазме связывается с фактором *APAF-1*. Образовавшийся комплекс

активирует каспазу-9 – участника, так называемого, «каспазного каскада». В конечном счете, происходит фрагментация ядра, что завершает процесс гибели клетки.

Анализ полученных результатов позволяет считать, что использование полифункционального серосодержащего антиоксиданта «Тиофан» при моделировании глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса снижает уровень апоптоза в клетках нефротелия относительно образцов почек крыс первой группы сравнения (рис. 3, 4). Благодаря высокой специфической антиоксидантной активности, «Тиофан» способствует сни-

жению уровня свободно радикальных процессов и оказывает протективный эффект на структурные компоненты нефрона.

#### Заключение

Таким образом, результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют о том, что длительное использование глюкокортикоидов приводит к интенсивной гибели эпителиоцитов нефрона по механизму апоптоза. Использование полифункционального серосодержащего антиоксиданта «Тиофан» оказывает нефропротективный эффект, ограничивает развитие выраженных структурно-функциональных нарушений паренхимы почек.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Bonda D. J., Wang X., Perry G.** Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention // *Neuropharmacology*. – 2010. – Vol. 59 (4-5). – P. 290–294. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.005>.
2. **Bonegio R., Lieberthal W.** Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure // *Curr Opin Nephrol Hypertens*. – 2002. – Vol. 11 (3). – P. 301–308.
3. **Darvesh A. S., Carroll R. T., Bishayee A., Geldenhuys W. J., Van der Schyf C. J.** Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents // *Expert Rev Neurother*. – 2010. – Vol. 10 (5). – P. 729–745. DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/ern.10.42>.
4. **Colvin R. B., Bhan A. K., Cluskey M. R. T.** Diagnostic immunopathology. – New York: Raven Press, 1995. – 820 p.
5. **Giacco F., Brownlee M.** Oxidative stress and diabetic complications // *Circ. Res*. – 2010. – Vol. 107 (9). – P. 1058–1070. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.
6. **Kaneto H., Katakami N., Matsuhisa M., Matsuoka T. A.** Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis // *Mediators Inflamm*. – 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/453892>.
7. **Kashihara N., Sugiyama H., Makino H.** Implication of apoptosis in progression of renal disease // *Contrib. Nephrol*. – 2003. – Vol. 139. – P. 156–172.
8. **Mannick J. B., Hausladen A., Liu L.** Fas-induced caspase denitrosylation // *Science* – 1999. – Vol. 284. – P. 651–654.
9. **Rodrigo R., González J., Paoletto F.** The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension // *Hypertens Res*. – 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/hr.2010.264>.
10. **Uno K., Nicholls S. J.** Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis // *Biomark Med*. – 2010. – Vol. 4 (3). – P. 361–373. DOI: <http://dx.doi.org/10.2217/bmm.10.57>.
11. **Валеева И. Х., Зиганшина Л. Е., Бурнашова З. А., Зиганшин А. У.** Влияние димефосфона и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2002. – Т. 65, № 2. – С. 40–43.



12. **Джиоев И. Г., Козаев А. В., Гагагонова Т. М., Хубулов И. Г., Клочков Д. А.** Функциональные и морфологические особенности почек и состояние антиоксидантной системы при экспериментальной острой почечной недостаточности // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 9. – С. 346–350.
13. **Джиоев И. Г., Козаев А. В., Кабоева Б. Н., Батагова Ф. Э.** Механизмы водовыделительной функции почек при экспериментальной острой почечной недостаточности на фоне гиперкальциемии // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10. – С. 1924–1928.
14. **Коган Е. А., Игнатова В. Е., Унанян А. Л., Сидорова И. С.** Соотношение процессов пролиферации и апоптоза в различных гистологических типах лейомиомы матки // *Архив патологии*. – 2005. – Т. 67, № 4. – С. 32–36.
15. **Луканина С. Н.** Оценка эффективности защиты почек крыс антиоксидантом тиофаном при окислительном стрессе // *Вестник КрасГАУ*. – 2010. – № 11. – С. 136–140.
16. **Мышкин В. А., Еникеев Д. А., Срубиллин Д. В., Галимов Д. М.** Мочевыделительная функция и состояние антиоксидантной системы почек крыс при моделировании некоторых форм патологии совтолом-1 // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 2. – С. 129–131.
17. **Назаров И. П., Винник Ю. С., Михайлович П. Ю., Теплякова О. В., Шарова Т. С.** Окислительный стресс в клинической анестезиологии, его диагностика и коррекция // *Актуальные вопросы интенсивной терапии*. – 2010. – № 27. – С. 42–44.
18. **Цебоева А. А., Кокаев Р. И., Бибаева Л. В., Оганесян Д. Х., Маликиев И. Е., Гуцаева Э. А., Ислаев А. А.** Возможности применения клеточной терапии на фоне токсического нефрита // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10. – С. 1394–1398.
19. **Шилов Е. М.** Достижения и проблемы лечения гломерулонефрита // *Лечащий врач*. – 2002. – № 11. – С. 34–37.
20. **Ярилин А. А.** Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // *Актуальные проблемы патофизиологии*. – М.: Медицина, 2001. – С. 13–56.

DOI: [10.15293/2226-3365.1605.14](https://doi.org/10.15293/2226-3365.1605.14)

Svetlana Nikolaevna Lukanina, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Anatomy, Physiology and Life Safety Department, Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-5067-9208>

Researcher ID: O-4524-2016

E-mail: [lukanina@ngs.ru](mailto:lukanina@ngs.ru)

Andrey Valentinovich Sakharov, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Zoology and Biology Teaching Techniques, Head of the Research and Education Center Experimental and Applied Biology, Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5076-2113>

Researcher ID: G-5188-2016

Scopus Author ID: 23009729100

E-mail: [asakharov142@rambler.ru](mailto:asakharov142@rambler.ru)

Konstantin Vasil'evich Zhuchaev, Doctor of Biological Sciences, Professor, Dean of the Faculty of Biology and Technology, Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russian Federation.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5748-1525>

Researcher ID: 0-5707-2015

Scopus Author ID: 6505872104

E-mail: [zhuchaev@ngs.ru](mailto:zhuchaev@ngs.ru)

Alexandr Evgen'evich Prosenko, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of Chemistry Department, Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5167-4094>

Researcher ID: H-4534-2016

Scopus Author ID: 6603436721

E-mail: [chemistry@ngs.ru](mailto:chemistry@ngs.ru)

## EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF THE MANAGEMENT OF MANAGING NEPHROPATHY MECHANISMS WITH PROLONGED USE OF GLUCOCORTICOIDS

### Abstract

*The aim of this work was to study free radical mechanism of nephropathy and to assess the capabilities of managing structural and functional impairment in the kidneys of rats with glucocorticoid-induced oxidative stress by the antioxidant "Thiophane".*

*The content and localization of proapoptotic protein factor Apaf-1 in the kidney parenchyma was identified by indirect immunohistochemical analysis carried out by the standard method. Blocking endogenous peroxidase was performed with 3% solution of hydrogen peroxide in the dewaxed sections.*

Specific monoclonal antibodies to a protein APAF-1 (LabVision, 1: 100) were used as primary antibodies. The avidin-biotin complex (UltraVHRPpolymerKIT, LabVision) was used for labelling secondary antibodies.

It is shown that the renal insufficiency in the animals receiving long-term glucocorticoid, is caused by damaging filtration apparatus components in the kidney glomerulus and by tubulointerstitial impairment. It is found that the prolonged use of glucocorticoids leads to increased expression of proapoptotic factors APAF-1 and lethal damage of nephrothelium by the apoptosis mechanism. Restriction of free radical processes through the use of polyfunctional sulfur-containing antioxidant "Thiophane" reduces the development of structural and functional disorders in the renal glomeruli and the number of epithelial cells with signs of apoptosis in the tubules of the nephrons.

#### Keywords

Oxidative stress, glucocorticoids, kidney, apoptosis, antioxidants.

## REFERENCES

1. Bonda D. J., Wang X., Perry G. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology*. 2010, vol. 59 (4-5), pp. 290–294. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.005.20>
2. Bonegio R., Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002, vol. 11 (3), pp. 301–308.
3. Darvesh A. S., Carroll R. T., Bishayee A., Geldenhuys W. J., Van der Schyf C. J. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Rev Neurother*. 2010, vol. 10 (5), pp. 729–745. DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/ern.10.42>
4. Colvin R. B., Bhan A. K., Cluskey M. R. T. Diagnostic immunopathology. New York, Raven Press Publ., 1995, 820 p.
5. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res*. 2010, vol. 107 (9), pp. 1058–1070. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.
6. Kaneto H., Katakami N., Matsuhisa M., Matsuoka T. A. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/453892>.
7. Kashihara N., Sugiyama H., Makino H. Implication of apoptosis in progression of renal disease. *Contrib. Nephrol*. 2003, vol. 139, pp. 156–172.
8. Mannick J. B., Hausladen A., Liu L. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*. 1999, vol. 284, pp. 651–654.
9. Rodrigo R., González J., Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res*. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/hr.2010.264>.
10. Uno K., Nicholls S. J. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis. *Biomark Med*. 2010, vol. 4 (3), pp. 361–373. DOI: <http://dx.doi.org/10.2217/bmm.10.57>.
11. Valeeva I. Kh., Ziganshina L. E., Burnashova Z. A., Ziganshin A. U. Influence dimefosfon and ksifidifon on parameters of lipid peroxidation and antioxidant system of rats receiving long-term prednisone. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2002, vol. 65, no. 2, pp. 40–43. (In Russian)
12. Dzhoiev I. G., Kozaev A. V., Gatagonova T. M., Khubulov I. G., Klotchkov D. A. Functional and morphological features of the kidneys and the state of the antioxidant system in experimental acute renal failure. *Basic Research*. 2013, no. 9, pp. 346–350. (In Russian)

13. Dzhioev I. G., Kozaev A. V., Kaboeva B. N., Batagova F. E. Mechanisms of hydroexcretory renal function in experimental acute renal failure in the face of hypercalcemia. *Basic Research*. 2014, no. 10, pp. 1924–1928. (In Russian)
14. Kogan E. A., Ignatova V. E., Hunanyan A. L., Sidorova I. S. The ratio of proliferation and apoptosis in different histological types of uterine leiomyoma. *Archives of Pathology*. 2005, vol. 67, no. 4, pp. 32–36. (In Russian)
- i. Lukanina S. N. Evaluation of the effectiveness of the protection of kidney in rats by antioxidant thiophane at oxidative stress. *The Bulletin of KrasGAU*. 2010, no. 11, pp. 136–140. (In Russian)
15. Myshkin V. A., Enikeev D. A., Srubilin D. V., Galimov D. M. Urinary function and antioxidant system of the kidneys of rats in the modeling of some forms of pathology Sovtol-1. *Basic Research*. 2013, no. 2, pp. 129–131. (In Russian)
16. Nazarov I. P., Vinnik Yu. S., Mikhailovich P. Yu., Teplyakova O. V., Sharov T. S. Oxidative stress in clinical anesthesiology, its diagnosis and correction. *Actual questions of intensive therapy*. 2010, no. 27, pp. 42–44. (In Russian)
17. Tseboeva A. A., Kokajev R. I., Bibaeva L. V., Oganessian D. Kh., Malikiev I. E., Gutsaeva E. A., Islaev A. A. Possible applications of cell therapy on a background of toxic nephritis. *Basic research*. 2014, no. 10, pp. 1394–1398. (In Russian)
18. Shilov E. M. Achievements and problems of treatment of glomerulonephritis. *Treating physician*. 2002, no. 11, pp. 34–37. (In Russian)
19. Yarilin A. A. Apoptosis: the nature of the phenomenon and its role in health and disease. *Actual problems of pathophysiology*. Moscow, Medicine Publ., 2001, pp. 13–56. (In Russian)