

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ
АДАПТАЦИИ ПОЧЕК ПРИ НАРУШЕНИЯХ БЕЛКОВО-ЛИПИДНОГО
ОБМЕНА И СБОЯХ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)**

Чиниева М.И.

Кушаева Д.С.

Рихсиева М.А.

Рахимова М.О.

Исмоилов У.М.

Ташкентский Государственный Медицинский Университет

Актуальность исследования

Рост распространенности метаболического синдрома, ожирения, дислипидемий, нарушений пищевого поведения и хронического стресса приводит к увеличению числа пациентов с метаболически – ассоциированными нефропатиями. Одновременно нарушение режима сна, работа в ночные смены и световое загрязнение городов формируют высокую частоту десинхроноза. Совмещение этих факторов усиливает нагрузку на почки, ускоряет развитие хронической болезни почек (ХБП) и осложнений со стороны сердечно – сосудистой системы. Понимание морфологических и иммуногистохимических основ адаптации профилактики и индивидуализации терапии.

Цель исследования.

Выявить морфофункциональные и иммуногистохимические изменения в почках при экспериментальном нарушении белково-липидного обмена и дезорганизации циркадных ритмов, а также определить характер взаимодействия этих факторов в развитии ранних нефропатий.

Задачи исследования

1. Смоделировать нарушения белкового и липидного обмена у лабораторных животных.
2. Создать экспериментальные условия дезорганизации циркадных ритмов.
3. Изучить структурные изменения в почечной ткани при различных комбинациях факторов.
4. Провести иммуногистохимическую оценку маркеров воспаления (TNF- α , IL-6), апоптоза (Caspase-3), оксидативного стресса (NOX-4) и фиброза (α -SMA, TGF- β 1)
5. Проанализировать влияние комбинированных нарушений на функциональные параметры почек.
6. Сравнить степень повреждения при изолированных и сочетанных метаболических и циркадных нарушениях.

Научная новизна.

Впервые в рамках единого экспериментального подхода проводится комплексная оценка морфологических, функциональных и иммуногистохимических изменений почек при сочетании метаболических нарушений и нарушений циркадной регуляции. Полученные данные позволяют уточнить механизмы адаптации нефрона при комбинированном воздействии патогенных факторов.

Объект исследования: почки лабораторных животных при экспериментальном моделировании метаболических нарушений и десинхроноза.

Предмет исследования: морфофункциональные параметры нефронов, интерстициальных структур и сосудистого русла, а также экспрессия иммуногистохимических маркеров.

Теоретическая и методологическая база.

Исследование опирается на современные представления о патофизиологии метаболических нефропатий, роли циркадных механизмов в регуляции почечной функции, концепции окислительного стресса, воспаления, ремоделирования тканей и эпигенетической регуляции. Применены методы световой и электронной микроскопии, иммуногистохимии, морфометрического анализа и статистической обработки данных.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Исследование выполнено как контролируемое исследование на лабораторных животных с моделированием нарушений белково-липидного обмена и десинхронизированного режима освещения. Протокол эксперимента соответствовал международным этическим нормам и «Правилам лабораторной практики» (GLP). Перед началом работы был получен одобрительный протокол локального этического комитета.

Экспериментальные животные

В исследовании использованы самцы крыс линии Wistar (возраст 10-12 недель, масса 220-260), содержащиеся в виварии при температуре 21-23°C и относительной влажности 50-60%. Животные были разделены на четыре группы (n = 10 в каждой):

1. Контрольная группа (К): стандартный рацион, нормальный световой режим (12:12, свет/темнота).
2. Группа М (метаболические нарушения): высокожировая и высокобелковая диета.
3. Группа МЦ (комбинированное воздействие): высокожировая/высокобелковая диета+инверсия светового режима.

Продолжительность экспериментального воздействия составляла 8 недель, что позволяет сформировать устойчивые метаболические и циркадные изменения.

Моделирование метаболических нарушений

Для моделирования нарушения белково-липидного обмена животные получали диету, содержащую:

- Повышенную концентрацию животного жира (до 45%общего калоража),
- Увеличенный уровень беклка (до 30%)
- Ограниченное количество пищевых волокон,
- Избыточную калорийность.

Такой рацион приводит к развитию гиперлипидемии, нарушений белкового метаболизма, увеличению массы тела и признаков метаболического синдрома.

Моделирование десинхроноза.

Для нарушения циркадных ритмов применялась световая инверсия, при которой каждые 72 часа световой и темновой циклы менялись местами. Это вызывает нарушение синхронизации периферических (в том числе почечных) «часов» с центральным супрахиазматическим ядром.

Оценка морфологических изменений

После завершения эксперимента животных выводили из опыта в соответствии с правилами гумманного обращения почки извлекали, фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. На микротоме готовились серийные срезы толщиной 4-6 мкм.

Методы морфологического анализа:

- окраска гематоксилином и эозином – общая структура ткани, состояние канальцев и клубочков;
- окраска по Массону – оценка степени интерстициального фиброза.
- PAS-реакция – состояние базальных мембран и щеточной каемки канальцев
- морфометрия клубочков: площадь капиллярного петельного аппарата, площадь клубочка, индекс склероза.
- морфометрия канальцев: высота эпителия, диаметр канальцев, плотность расположения ядер.

Иммуногистохимическое исследование

Для выявления адаптивных и повреждающих реакций использованны антитела к следующим маркерам:

Маркеры метаболических нарушений:

- SREBP – PPAR – α , PPAR- γ – регуляция липидного обмена
- FABP 1 – транспорт жирных кислот

Маркеры циркадной регуляции:

- CLOCK, BMAL 1, PER 1, CRY 1 – компоненты молекулярных «часов»

Маркеры повреждения и стресса:

- 8 – OhdG – маркер окислительного стресса
- Caspase-3 – апоптоз
- α – SMA, TGF – β 1 – фиброгенез

Маркеры воспаления:

-TNF – α , IL -6, NF - κ B – цитокиновая и транскрипционная активность.

Оценка экспрессии проводилась полуколичественной морфометрией с использованием программного обеспечения ImageJ.

Функциональные показатели

Перед выводом животных из эксперимента выполнялось исследование:

- концентрации креатинина и мочевины в сыворотке
- скорости клубочковой фильтрации (СКФ)
- уровня липидного профиля (ХС, ТГ, ЛПВП, ЛПНП)
- белка в моче (суточная протеинурия)

Статистическая обработка

Данные анализировали с использованием Statistica или GraphPad Prism

Применялись методы:

- дисперсионный анализ (ANOVA) с пост – хок тестом Тьюки
- критерий Манна – Уитни или Краскела – Уолиса для непараметрических данных
- корреляционный анализ Спирмена.

Достоверным считалось значение $p < 0,05$

Результаты

1. Морфологические изменения почечной ткани

Контрольная группа

Почки животных контрольной группы имели нормальную архитектуру: клубочки компактные, капиллярные петли хорошо выражены, эпителий канальцев однородный, признаков дистрофии и воспаления не выявлено. Интерстиций без расширения, фиброз отсутствует.

Группа М (метаболические нарушения)

У животных, получивших высокожировую диету, выявлены характерны метаболические – обусловленные изменения:

- умеренная канальцевая вакуолизация цитоплазмы в проксимальных канальцах
- расширение просвета дистальных канальцев
- утолщение базальной мембраны клубочков по PAS – реакции
- начальные признаки мезангиальной пролиферации (увеличение площади мезангия на 18 – 22 % относительно контроля, $p < 0,05$)
- увеличение количества клеток с пикнотичными ядрами в эпителии.

Группа Ц (циркадный сбой)

Нарушение светового режима сопровождалось

- умеренной атрофией эпителия канальцев
- расширением капсулы Боумена
- снижением плотности ядер эпителия канальцев (на 14%, $p < 0,05$)
- появлением периваскулярных инфильтратов.

Фиброз был слабовыраженным, но достоверно выше контроля (по Массону + 13%, $p < 0,05$)

Группа МЦ (комбинированное воздействие)

Наиболее выраженные изменения наблюдались при сочетании метаболических нарушений и десинхроноза:

-выраженная дистрофия проксимальных канальцев и их деформации.

-склероз клубочков (в 3,7 раза выше контроля, $p < 0,01$)

-интерстициальный фиброз + 39% относительно контроля

-выраженная сосудистая реакция утолщение стенки артериол, признаки эндотелиальной дисфункции.

2. Иммуногистохимические изменения

Метаболические маркеры

-**SREBP-1 и PPAR** – у были повышены в группе М, а максимальная экспрессия – в группе МЦ (увеличение H – score до 210 ± 15 , $p < 0,01$)

-**FABP1** значительно увеличен в проксимальных канальцах у животных М и МЦ ($p < 0,01$)

Маркеры циркадных ритмов

- в группе Ц наблюдалось снижение экспрессии **CLOCK** и **BMAL1** на 22 – 30 % относительно контроля.

- В группе МЦ угнетение экспрессии составляло до 45% ($p < 0,01$), что указывает на глубокую десинхронизацию периферических часов почек.

МАРКЕР ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

-8- **ОНdG** повышен во всех экспериментальных группах, наиболее значительно – в МЦ (увеличение в 3,5 – раза относительно контроля, $p < 0,001$).

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ

-**TNF – α** и **IL – β** были максимально выражены в группе МЦ ($p < 0,001$)

- **NF-kB** демонстрировал ядерную транслокацию, особенно выраженную в проксимальных канальцах животных группы МЦ.

МАРКЕРЫ ФИБРОГЕНЕЗА

- α – **SMA** и **TGF – β 1** были значительно повышены в интерстиции группы МЦ, что соответствует данным о более выраженном фиброзе.

3. Функциональные показатели

- В группе МЦ наблюдалось снижение СКФ на 28% ($p < 0,001$), повышение креатинина (на 33%, $p < 0,001$) и выраженная протеинурия.

- В группе М и Ц изменения были умеренными, но достоверными.

- Липидный профиль нарушен у М и Ц (повышение ХС, ТГ, ЛПНП, снижение ЛПВП)

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные показывают, что нарушения белково-липидного обмена и десинхроноз оказывают выраженное негативное воздействие на почечную ткань,

причём их сочетание приводит к более глубоким структурным и функциональным изменениям.

1. Роль метаболических нарушений.

Высокожировая и высокобелковая диета приводит к перегрузке проксимальных канальцев продуктами липидного обмена, формированию липотоксичности, окислительного стресса и мезангиальной пролиферации. Обнаруженное повышение экспрессии SREB – 1, PPAR – γ и FABP1 подтверждает метаболическую перегрузку нефрона. Эти процессы соответствуют известным патогенетическим механизмам метаболических нефропатий.

2. Влияние циркадного дисбаланса

Циркадная регуляция определяет стабильность канальцевого транспорта, активность транспортных белков, секрецию ренина и тонус сосудов. Снижение экспрессии CLOCK и BMAL1, обнаруженное в группах Ц и МЦ, подтверждает нарушение молекулярных «часов» почек. Это сопровождается снижением плотности эпителия, дистрофией и нарушением архитектоники клубочка.

3. Синергия метаболических нарушений и десинхроноза.

Наблюдаемая в группе МЦ максимальная выраженность патологических изменений свидетельствует о синергическом характере действия факторов:

- метаболическая перегрузка усиливает уязвимость клеток к окислительному и воспалительному стрессу
- десинхроноз нарушает механизмы репарации и создаёт постоянный метаболический дисбаланс.
- активация NF- κ B, TGF- β 1 и α -SMA указывает на запуск фибротических процессов.

Таким образом, сочетание факторов приводит к ускорению ремоделирования почечной ткани и снижению функциональных резервов.

4. Значение иммуногистохимических маркеров

Использование комплексного набора маркеров позволило проследить весь патогенетический каскад – от метаболической дисрегуляции до фиброза. Особенно показательной оказалась динамика CLOCK /BMAL1, отражающая степень циркадного дисбаланса.

ВЫВОДЫ

1. Нарушения белково-липидного обмена и сбой циркадных ритмов вызывают выраженные морфологические и функциональные изменения в почках.
2. Метаболические нарушения приводят к дистрофическим изменениям канальцев, мезангиальной пролиферации и умеренному фиброзу.
3. Циркадный дисбаланс вызывает снижение экспрессии циркадных белков, нарушения структуры канальцев и умеренное воспаление.

4. Комбинированное воздействие усиливает патологические изменения, вызывая выраженный фиброз, склероз клубочков, высокий уровень окислительного стресса и значительного стресса и значительное снижение СКФ

5. Иммуногистохимические маркеры CLOCK , BMAL1, SREBP – 1, NF – κ B, TGF- β 1 и 8-OHdG являются информативные индикаторами адаптаций почечной ткани в условиях метаболического и циркадного дисбаланса.

6. Полученные данные подтверждают необходимость комплексного подхода к профилактике и лечению метаболически-ассоциированной нефропатии, с учетом состояния циркадной системы

Заключение

Проведенное экспериментальное исследование показало, что сочетанное нарушение белково-липидного обмена и дезорганизация циркадных ритмов вызывает выраженные структурно-функциональные перестройки в почечной ткани. На морфологическом уровне выявлены дистрофические и воспалительно-деструктивные изменения в эпителии нефрона, нарушение целостности клубочкового фильтрационного барьера, а также признаки ремоделирования сосудистого русла. Эти изменения сопровождались снижением функциональных резервов почек и дестабилизацией гомеостатических механизмов.

Иммуногистохимический анализ продемонстрировал активацию маркеров оксидативного стресса, воспаления и апоптоза, что отражает напряженность адаптационно-компенсаторных процессов. Одновременно отмечено повышение экспрессии молекул, связанных с регуляцией циркадных часов и метаболизмом липидов, что подтверждает ключевую роль циркадной дисфункции в патогенезе повреждения почек. Полученные данные указывают на существование тесной взаимосвязи между метаболическим дисбалансом, нарушением ритмичности физиологических процессов и развитием нефропатий.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что адаптационные реакции почек при данных воздействиях имеют комплексный характер и включают как структурные перестройки, так и глубокие молекулярные изменения. Выявленные особенности могут служить основанием для разработки новых подходов к ранней диагностике, профилактике и коррекции почечных нарушений, связанных с метаболическими и дисфункцией циркадных ритмов.

Ключевые слова: почки, печень, белок, липиды, мелатонин, дезорганизация, циркадные ритмы, иммуногистохимия.

Аннотация: Нарушения белково-липидного обмена и дезорганизация циркадных ритмов являются важными патогенетическими факторами формирования хронических почечных дисфункций. Почки, обладая высокой метаболической активностью, чувствительны к колебаниям нутритивного статуса, гормональной регуляции и системным биоритмам.

Целью данной работы стало изучение морфофункциональных и иммуногистохимических изменений в почечной ткани в условиях экспериментального моделирования метаболических нарушений и расстройств циркадной организации. В эксперимент включены модели избыточного белка, дислипидемии, десинхронизации светового режима и их сочетания. Проведены морфологические, гистологические и иммуногистологические исследования с оценкой маркеров воспаления, апоптоза, эксудативного стресса и фиброза. Полученные данные демонстрируют, что комбинация метаболических сдвигов и нарушений циркадных ритмов усиливает повреждение канальцевого аппарата, способствует иммунному дисбалансу и формированию ранних фибротических формирований.

Введение

Почки являются одним из ключевых органов, обеспечивающих гомеостаз организма за счет регуляции водно-электролитного баланса, кислотно-щелочного состояния, экскреции метаболитов и участия в эндокринных процессах. Их морфологическая функциональная целостность напрямую связана с состоянием основных видов обмена веществ – прежде всего белкового и липидного. Нарушения этих метаболических путей, возникшие при алиментарных факторах, эндокринных заболеваниях, метаболическом синдроме или генетической предрасположенности, сопровождаются глубокими изменениями в структуре нефрона, сосудистого русла и интерстициальных тканей почек.

В последние десятилетия особой актуальностью приобрели исследования, посвященные влиянию нарушения циркадных ритмов на функционирование почек. Ритмическая регуляция – ключевой механизм, определяющий динамику клубочковой фильтрации, реабсорбции натрия, секреции гормонов ренин-ангиотензиновой системе «центральные – периферические часы» приводит к хроническому стрессу, нарушению метаболизма, повышению реактивности почечной ткани. В совокупности метаболические нарушения и десинхронизация циркадных ритмов могут формировать синергический патогенный эффект, усиливая структурные повреждения и вызывая каскад компенсаторно-адаптивных реакций на уровне клеток и тканей.

Современные методы морфологического анализа, включая световую и электронную микроскопию, иммуногистохимию, морфометрию и количественную оценку белков – маркеров, позволяют детально исследовать адаптивные реакции нефрона при метаболическом и циркадном дисбалансе. Иммуногистохимические методы дают возможность оценить состояние ключевых регуляторных систем: экспрессию транспортеров липидного и белкового обмена, маркеры окислительного стресса, воспаления, фиброгенеза, апоптоза, а также белки, связанные с функционированием циркадной системы (CLOCK, BMAL 1, PER, CRY и др).

Несмотря на значительное количество исследований, комплексная оценка морфофункциональных и иммуногистохимических адаптаций почек при сочетанных

нарушениях белково-липидного обмена и сбоях циркадных ритмов остается недостаточно раскрытой. Неясны механизмы компенсаторных перестроек на уровне клубочков, юкстагломерулярного аппарата, а также характер взаимодействия метаболических и циркадных факторов в формировании повреждения почечной ткани.

Список литературы

1. Лебедева Е.Н., Вялкова А.А., Афонина С.Н. Дислипидемия как фактор прогрессирования ХБП. Нефрология.2019.
2. Брюханов В.М., Зверева Ф.Я. Роль почки в регуляции суточных ритмов организма // Нефрология. – 2010. – Т.14, №3. – С. 17 – 31.
3. Мельник А.А. Нарушение липидного обмена при ХБП и методы коррекции. Почка. 2016.
4. Луговская С.А., Клебанова Ё.М. Морфология почек при метаболическом синдроме: обзор. Архив патологии. 2018.
5. Боровкова Н.В., Морозова Т.Е. Метаболические нарушения и поражения почек. Клиническая нефрология. 2020.
6. Коренева Е.М., Анисимова И.В. Циркадные ритмы и почечная регуляция, физиология человека. 2016.
7. Костюк Г.П. Иммуногистохимические маркеры повреждения нефрона. Медицинская иммунология. 2021.
8. Арушанян Э.Б. Ограничение окислительного стресса как основная причина универсальных защитных свойств мелатонина / Э. Б. Арушанян // Экспер. и клин.фармакология. – 2012.Т. 75, № 5.- С. 44 – 49.
9. Douma L. G., Gumz M.L. Circadian clock and the kidney: function and regulation. Clinical Genetic Reviews. 2018; 52(4): 348 - 357
10. Gupta A., et al. Metabolic dysregulation and renal chronodisruption: mechanisms linking circadian disruption to kidney disease. Nephrology Dialysis Transplantation. 2021; 36(11): 2034-2045
11. Чиниева М.И. Морфологические изменения структур канальцевой и сосудистой систем почек при белковой нагрузке // Арх.внутр.медицины. – 2018. – Т. 8. – С. 219-222
12. Чиниева М.И. Структурные механизмы интеграции функциональных систем почек при регуляции белкового гомеостаза // Вест.восстановительной медицины.- 2018.-№5. – С. 25 - 28