

В.П.Стусь
К.С.Бараннік
І.С.Шпонька
О.В.Пославська

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: кро-
вообіг паренхіми ни-
рок, експериментальна
ішемія, порушення
уродинаміки, CD3,
 α SMA.

Надійшла: 14.11.2014

Прийнята: 22.12.2014

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2014.4.43-50>

УДК 616.61-005-089.168-085

ДОСЛІДЖЕННЯ МОДЕЛЕЙ ОДНОСТО- РОННИХ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ПО- РУШЕННЯ МІСЦЕВОГО НИРКОВОГО КРОВООБІГУ З МЕТОЮ ВИЗНАЧЕННЯ ЗМІН СТАНУ КОНТРАЛАТЕРАЛЬНОЇ НИ- РКИ: ІМУНОМОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Порушення кровообігу та мікроциркуляції паренхіми нирки, що залишилася після нефректомії, та способи їх корекції».

Реферат. Стаття присвячена дослідженню моделей патологічних станів, що найчастіше стають причиною односторонньої нефректомії через необоротні зміни місцевого ниркового кровотоку (ішемія, уростаз) на нирках шурів лінії Вістар з метою визначення стану контралатеральних «здорових» нирок та їх компенсаторних можливостей імуногістохімічним методом з використанням моноклональних антитіл до CD3 та α SMA. Всі контралатеральні нирки дослідних груп шурів демонстрували дистрофічні зміни епітелію каналців, осередки склерозу навколо крупних судин, перитубулярні та периваскулярні круглоклітинні запальні інфільтрати із вмістом CD3⁺ Т-лімфоцитів (для підгрупи АІІ – 10,3±1,2, для ВІІ – 11,9±1,1, для СІІ – 10,9±0,8), а також гіпертрофію м'язової оболонки артерій та артеріол через ренальну гіпертензію, що не було знайдено в зразках групи контролю.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 43-50.

© В.П.Стусь, К.С.Бараннік, І.С.Шпонька, О.В.Пославська, 2014

✉ kostdok@ukr.net

Stus V.P., Barannik K.S., Shponka I.S., Poslavska O.V. Investigation of models of unilateral pathological processes of breach of local renal blood flow in order to determine changes in the status of the contralateral kidney: immunomorphological aspects.

ABSTRACT. Background. Morphology of compensatory-adaptive changes and their dynamics in a single remained kidney are still not clarified. Therefore, the study of renal parenchyma lesions in rat models of the most common pathological states has a great practical importance. **Objective.** To investigate the models of unilateral pathological processes of breach of local renal blood flow (ischemia, infringement of urodynamics) in order to determine changes in the status of the contralateral kidney. **Methods.** In the experiment on white Wistar rats permanent ischemia was modeled by a fixed bending left kidney artery (15 individuals – group A), acute infringement of urodynamics was modeled by a fixed crossing of the left ureter kidney (4 individuals – group B) and both pathological conditions were simulated (5 individuals – group C). Kidneys of 10 relatively healthy rats were used as a control. The primary monoclonal antibodies for CD3 and α SMA (TermoScientific, USA) were used. **Results.** The main pathological manifestations in the contralateral right "healthy" kidneys was in degenerative changes in epithelial tubule cells, foci of edema and sclerosis around large vessels, interstitial and perivascular inflammatory infiltrates containing CD3⁺ T-cells (for A II – 10,3±1,2, for B II – 11,9±1,1, for C II – 10,9±0,8). It differs significantly from the control group ($p<0,05$), where CD3⁺ T-lymphocytes occurred as single cells of interstitium. **Conclusions.** Unilateral damage of the kidney due to experimental ischemia, or infringement of urodynamics, or both pathological conditions, affecting local renal blood flow, results in pathological changes in the contralateral "healthy" kidney prior to the nephrectomy and suggests the importance of its medicament support.

Key words: blood circulation of kidneys parenchyma, experimental ischemia, infringement of urodynamics, CD3, α SMA.

Citation:

Stus VP, Barannik KS, Shponka IS, Poslavska OV. [Investigation of models of unilateral pathological processes of breach of local renal blood flow in order to determine changes in the status of the contralateral kidney: immunomorphological aspects]. *Morphologia*. 2014;8(4):43-50. Ukrainian.

Вступ

Деякі патологічні стани (гостре порушення відтоку сечі або ішемічне ураження) спричиню-

ють стійке порушення ниркового кровообігу, яке веде до значного порушення функції нирки, внаслідок місцевої атрофії паренхіми або склерозу,

змін ангіоархітектоніки, виникнення хронічного запалення. Згідно останнім дослідженням [1; 2], функціональні зміни стосуються також і протилежної «здорової» нирки, що стає особливо актуальним після односторонньої нефректомії [3]. Морфологія компенсаторно-приспосовних змін та динаміка їх перебігу в єдиній нирці, що залишилась, на сьогодні недостатньо з'ясовані [4; 5; 6]. Тому, дослідження імуноморфологічних аспектів патологічних змін паренхіми нирок щурів з експериментально змодельованими найбільш розповсюдженими патологічними станами (ішемія, порушення уродинаміки) має велике практичне значення.

Мета дослідження: дослідити патоморфологічні особливості нирок щурів із експериментальним порушенням кровообігу, уродинаміки й кровообігу і уродинаміки разом та стан контра-

латеральних «здорових» нирок для визначення їх можливих патологічних змін, таких як запалення, ураження судинного русла, за допомогою експресії імуногістохімічних маркерів CD3 та α SMA.

Матеріали та методи дослідження

В експерименті на 34 білих половозрілих щурах лінії Вістар створювали постійну ішемію лівої нирки фіксованим перегинанням її артерії для 15 особин (група А), робили гостре порушення уродинаміки лівої нирки фіксованим перетинанням її сечоводу на рівні 1/3 для 4 особин (група В) і моделювали обидва патологічні стани для 5 представників (група С). Стан паренхіми 10 відносно здорових щурів брали за контроль (контрольна група) для порівняння (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика груп

Групи дослідження	(n=48)	%
Група А	30	62,5%
АІ – експериментальна ішемія лівої нирки	15	
АІІ – контралатеральні праві нирки	15	
Група В	8	16,7%
ВІ – порушення уродинаміки лівої нирки	4	
ВІІ – контралатеральні праві нирки	4	
Група С	10	20,8%
СІ – ішемія і порушення уродинаміки лівої нирки	5	
СІІ – контралатеральні праві нирки	5	
Контрольна група (відносно здорові щури)	10	20,8%

Експериментальні дослідження на щурах проводили з дотриманням принципів передбачених Європейською конвенцією з нагляду за проведенням лабораторних та інших дослідів з участю лабораторних тварин різних видів, Конвенцією з біоетики Ради Європи, Першим українським національним конгресом з біоетики. Всі оперативні втручання, експериментальні дослідження та вихід з експерименту тварин здійснювали за умов адекватного знеболення, не завдаючи страждань останнім.

Парафінові блоки та скельця нирок щурів були виготовлені на базі відділення загальної патології КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро» для подальшого проведення імуногістохімічного (ІГХ) дослідження в морфологічному відділі діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії», м. Дніпропет-

ровськ. Для проведення світлової мікроскопії використовували мікроскоп "Leika DLM-E" (США) з об'єктивами $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$. Згідно із стандартної процедурою, гістологічні зрізи 4-6 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, з проведенням депарафінізації, регідратації зрізів та температурного демаскування антигенів в цитратному буфері рН 6.0 з підігрівом у автоклаві при температурі $+121^{\circ}\text{C}$. Активність ендогенної пероксидази пригнічували 3% розчином перекису водню. Інкубація зрізів з первинними антитілами відбувалася у вологих камерах при температурі $23-25^{\circ}\text{C}$. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до CD3 та α SMA (TermoScientific, США) (табл. 2).

Таблиця 2

Панель первинних антитіл

Антитіло	Клон	Титр	Виробник
CD3	клон SP7	1:500	TermoScientific
α SMA	клон 1A4	1:200	TermoScientific

У якості розчинника використовували спеціальний розчин Antibody Diluent (TermoScientific, США). Для ідентифікації реакції використовували систему візуалізації Quanto (TermoScientific, США), з нанесенням в якості хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (DAB) (TermoScientific, США). Для відокремлення незабарвлених структур зрізи додатково обробляли гематоксиліном Майєра.

Розрахунок CD3⁺ Т-лімфоцитів проводили за мембранним забарвленням відповідного маркера в 10 полях зору ($\times 400$) і розраховували як середнє арифметичне абсолютних значень, при цьому відмічали загальну кількість імуніцитів та їхню локалізацію [7]. Кількісний і якісний склад судин уражених нирок щурів та нирок з груп порівняння оцінювали за цитоплазматичною експресією маркера м'язової диференціації α SMA при збільшенні ($\times 200$) в 10 полях зору [7].

Дані імуногістохімічних досліджень, зазначали статистичної обробки в програмі SPSS Statistica 17.0. Для розрахунку середніх значень використовувався t-коефіцієнт. В групах з достовірною відмінністю експресії маркера значущим вважався зв'язок при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Нирка щура, як однодольний однопірамідний орган, представляє безумовно цікавий об'єкт для дослідження змін місцевого кровообігу при різних патологічних станах, які притаманні ниркам людини. Підгрупа щурів А І (ліві нирки - ЛН), що знаходилась під впливом експериментальної ішемії, при гістологічному дослідженні характеризувалася великою кількістю повнокровних ділятованих судин (рис. 1 А), що мали периваскулярну набряклу строму і звивистий хід. Більшість полів зору містила екстравазальні точкові крововиливи навколо розгалуженої капілярної сітки, розташованої навколо звивистих каналців. Епітелій більшості каналців знаходився у стані гідропічної дистрофії, що також було знайдено в контралатеральних правих нирках (ПН) підгрупи А ІІ (рис. 1 Б), як і набряк стромі. Це підтверджує, що судинні захворювання нирок впливають на клубочки, судини та ниркову паренхіму із каналців та інтерстицію. І хоча останні являють собою окремі функціональні та структурні відділення, вони тісно пов'язані між собою, й пошкодження одного неминуче призводить до пошкодження іншого. На зрізах, забарвлених гематоксиліном-еозином (Г-Е) в уражених ЛН спостерігалися великі периваскулярні круглоклітинні запальні інфільтрати. Завдяки маркеру Т-клітинної диференціації CD3 зрозуміло, що останні представляли більшу частину імуніцитів. В середньому, кількість CD3⁺ Т-лімфоцитів в підгрупі А І склала $62,7 \pm 1,5$. Цікаво, що в поодиноких випа-

дках розміри ділянок запалення розповсюджувалися навіть на навколонишкову жирову тканину (рис. 2 А), на відміну від підгрупи А ІІ, де запальні інфільтрати носили завжди осередковий характер і звичайно розташовувалися навколо судин, але могли бути й в міжтубулярних просторах (рис. 2 Б). Ці прояви характерні для хронічного тубулоінтерстиціального нефриту. В середньому, кількість CD3⁺ Т-лімфоцитів в підгрупі А ІІ склала $14,3 \pm 1,2$, на відміну від контрольної групи (КГ), де Т-лімфоцити зустрічалися рідко і тільки у вигляді поодиноких клітин інтерстицію на рівні $2,1 \pm 0,5$ ($p < 0,05$) (рис. 2 Е, Є).

Хід судин та товщину їх м'язової стінки ми оцінювали за допомогою маркера α SMA, що виявляє експресію α -гладенького актину. Порушення кровопостачання (фіксоване перегибання правої ниркової артерії) в підгрупі А І викликало спазм периферійних ділянок міждолькових артерій та артеріол з ішемією коркової речовини. Накопичення продуктів обміну таких, як сполуки азоту, призвело до дилатації та підвищення проникності стінок міждолькових, внутрідолькових артерій, вен та капілярів кортикального лабіринту, що ми і спостерігали в зразках цієї підгрупи. До того ж такі зміни судин було знайдено звичайно в осередках запалення (рис. 3 А). Треба відмітити, що підгрупа А ІІ паралельно з цим характеризувалася помірно гіперплазією м'язових стінок судин, що добре видно при цитоплазматичній експресії маркера α SMA в гладком'язових клітинах (рис. 3 Б). Скоріше за все гіперпластична реакція стінок судин «здорової» нирки виникає через підвищення артеріального тиску, внаслідок включення юктагломерулярного механізму активації ренін-ангіотензинової системи ушкодженої нирки.

Підгрупа щурів В І (ЛН) після перетинання їх лівих сечоводів для моделювання захворювань, що супроводжуються уростазом, характеризувалася розвитком гідронефрозу з вираженою атрофією паренхіми і клубочкового апарату (рис. 1 В). На гістологічних зрізах спостерігались зменшені атрофічні каналці серед склерозованого інтерстицію, осередки хронічного запалення, з більшою частиною CD3⁺ Т-лімфоцитів (рис. 2 В). В середньому, кількість CD3⁺ Т-клітин в підгрупі В І склала $54,1 \pm 0,9$. Зміна співвідношення кількості каналців та клубочків призвела до порушення ангіоархітектоніки в корковій речовині – судини мали звивистий хід, надмірне скупчення або закриття просвітів через здавлення та атрофію (рис. 3 В), але потовщення стінок чи паренхіматозних крововиливів ми не спостерігали, на відміну від підгрупи А І.

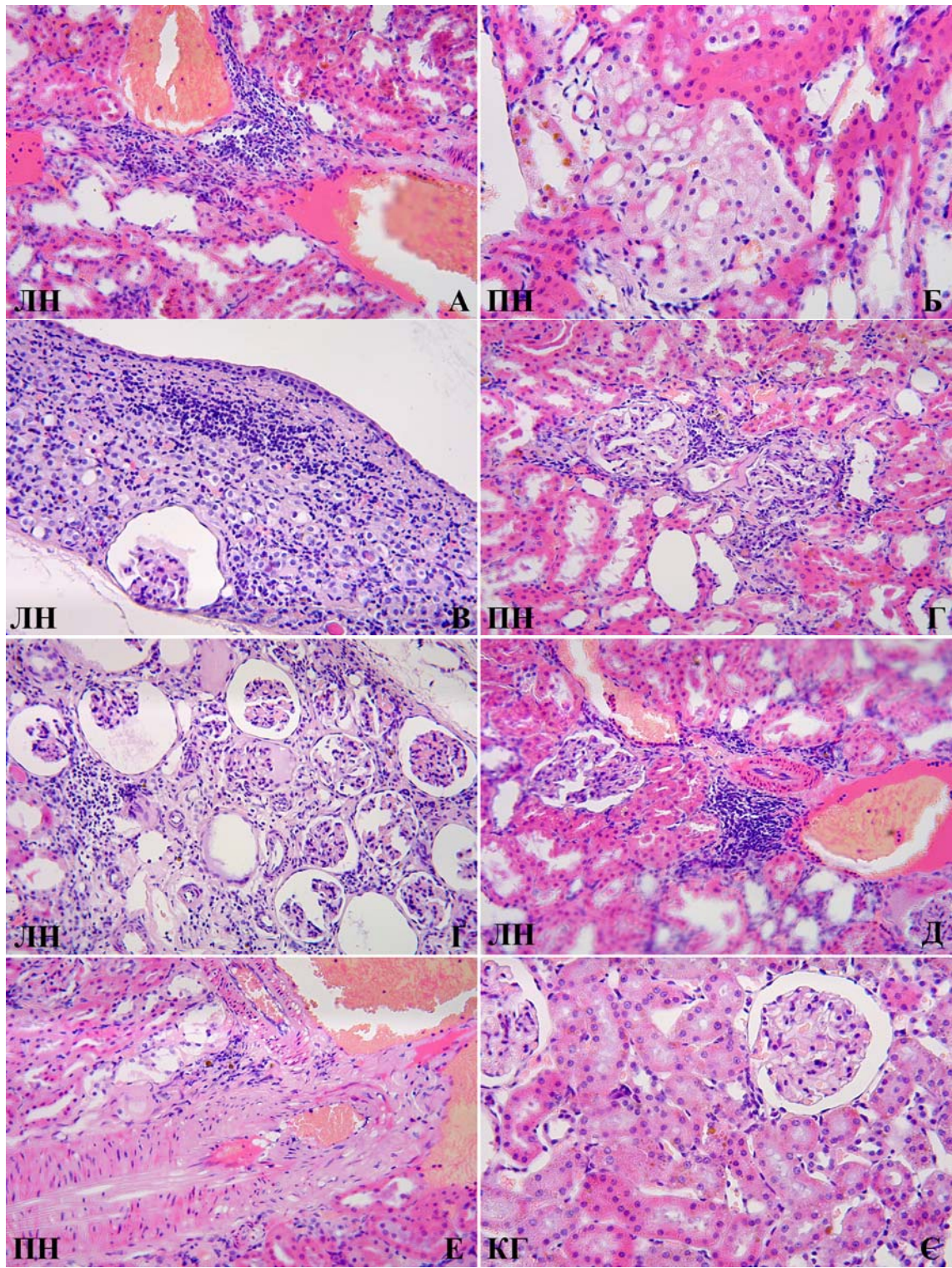


Рис. 1. Патоморфологічні зміни нирок щурів. *Експериментальна ішемія*: А – наповненні кров'ю, дилатовані судини із запальним периваскулярним інфільтратом, точкові крововиливи, Б – виражена гідропічна дистрофія епітелію каналців. *Порушення уродинаміки*: В – гідронефроз, атрофія ниркової паренхіми із зменшенням кількості клубочків, запальні інфільтрати ($\times 200$), Г – периваскулярні потовщення із сполучної тканини та осередків запалення, дистрофічні зміни епітелію каналців. *Порушення кровообігу та уродинаміки*: Г – склеротичні та атрофічні зміни коркової речовини, скупчення клубочків, запальні інфільтрати ($\times 200$), Д – периваскулярні інфільтрати навколо дилатованих та повнокровних судин, Е – потовщення судинної стінки – склероз, гіаліноз. *Контрольна група*: Є – нормальне співвідношення кількості клубочків і каналців без патологічних змін. ЛН - ліва нирка, ПН – права нирка, КГ – контрольна група. Забарвлення гематоксином та еозином, $\times 400$.

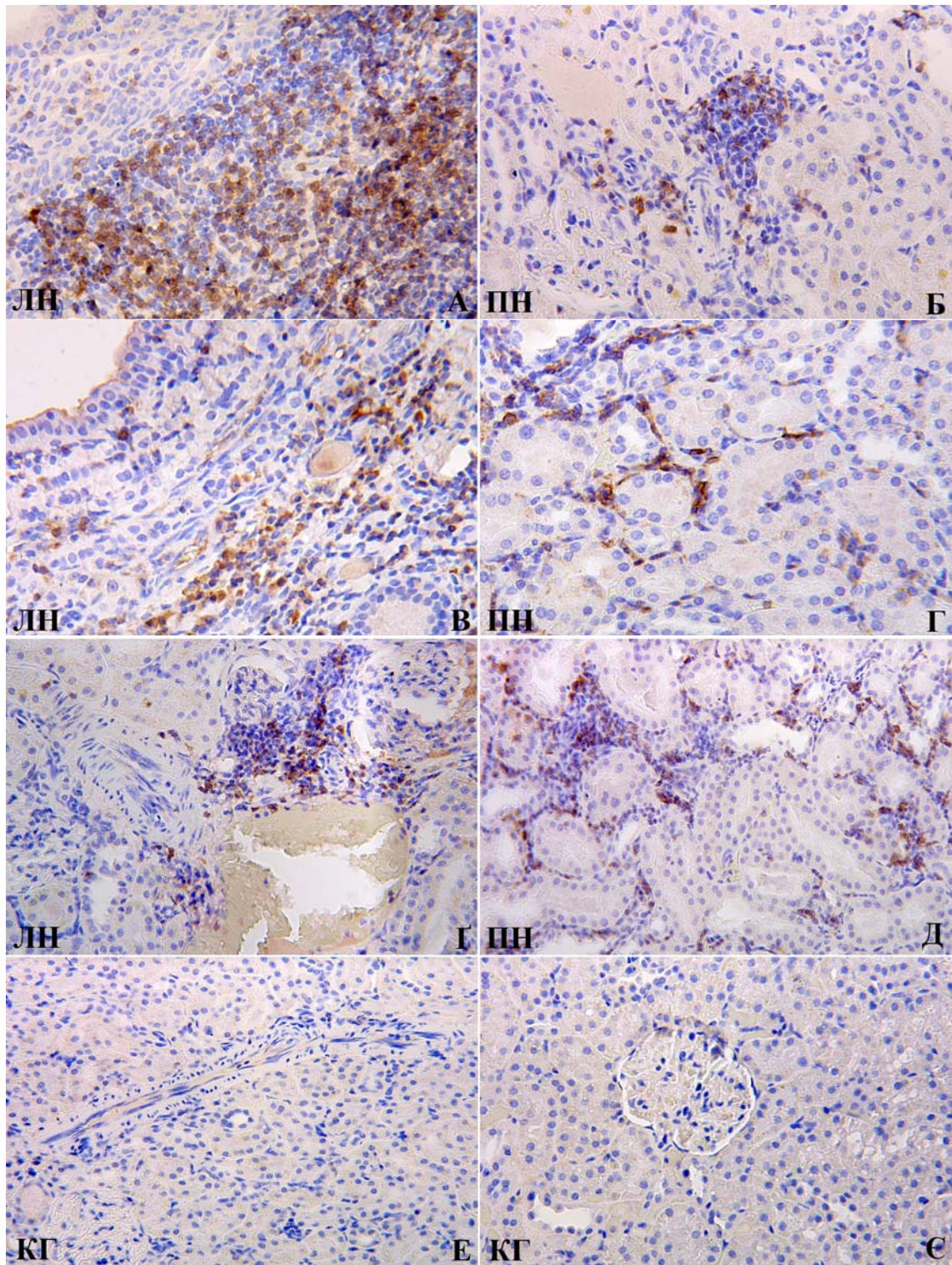


Рис. 2. Експресія маркера CD3 на мембранах Т-лімфоцитів. *Експериментальна ішемія*: А – масивний паранефральний запальний інфільтрат, Б – скупчення Т-лімфоцитів навколо судин. *Порушення уродинаміки*: В – дифузний запальний інфільтрат серед атрофічної паренхіми, Г – перитубулярні Т-лімфоцитарні інфільтрати. *Порушення кровообігу та уродинаміки*: І – запальні інфільтрати навколо дилатованих, перенаповнених кров'ю судин, Д – перитубулярні Т-лімфоцитарні інфільтрати. *Контрольна група*: Е – відсутність CD3⁺ Т-лімфоцитів навколо судин, Є - відсутність CD3⁺ Т-лімфоцитів навколо каналців і клубочків нирки. ЛН - ліва нирка, ПН – права нирка, КГ – контрольна група. ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра, $\times 400$.

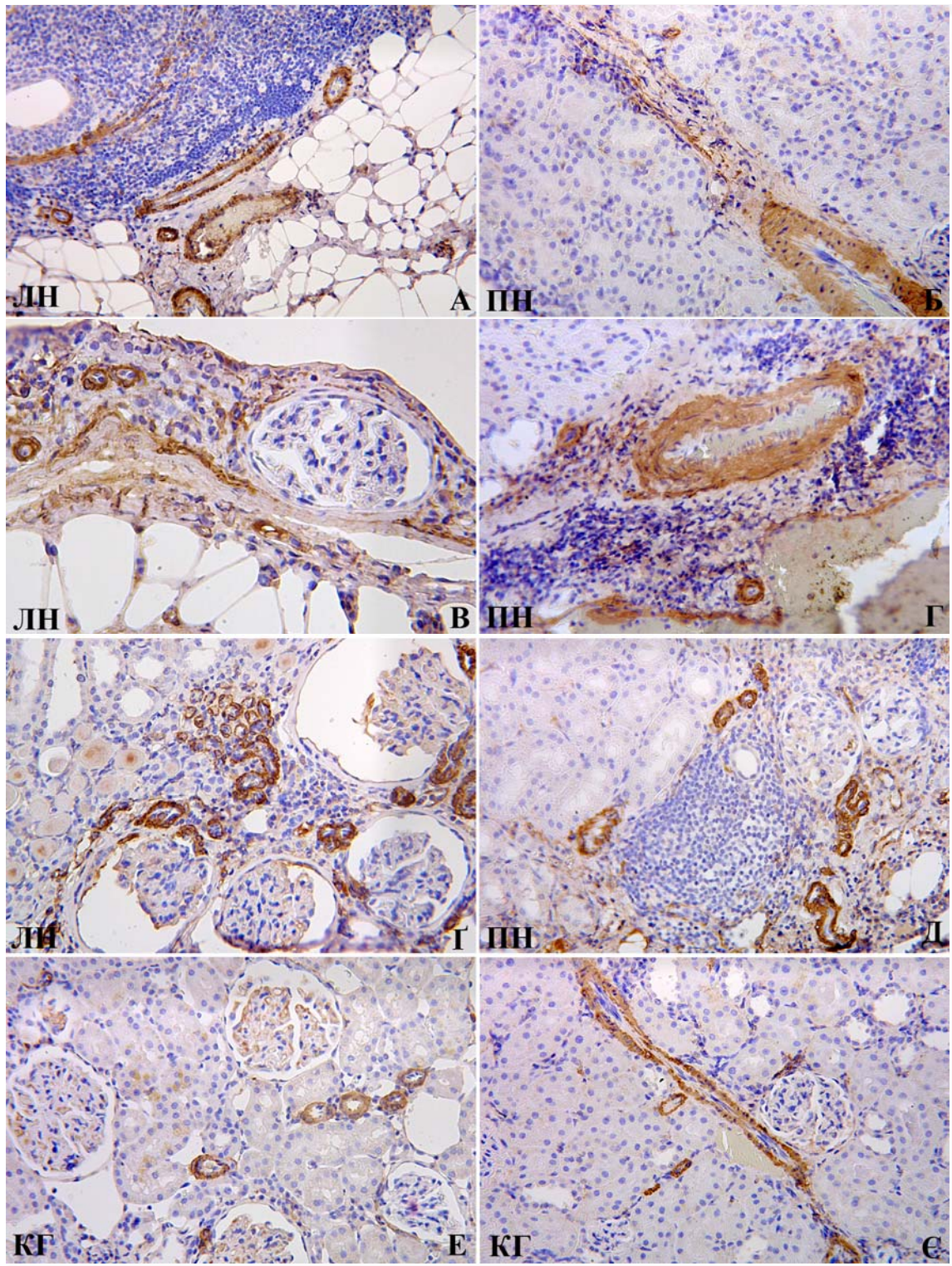


Рис. 3. Експресія маркера α SMA в цитоплазмі гладком'язових клітин стінок судин. *Експериментальна ішемія*: А – наповненні, дилатовані судини навколо запального паранефрального інфільтрату, Б – стовщена гіпертрофована стінка судини. *Порушення уродинаміки*: В – зміна ангіоархітекtonіки в атрофічній паренхімі, Г – стовщена гіпертрофована стінка судини, запальний інфільтрат. *Порушення кровообігу та уродинаміки*: Г – збільшення кількості судин навколо скупчення клубочків, зміна ангіоархітекtonіки Д – периваскулярні інфільтрати, дилатовані та повнокровні судини, *Контрольна група*: Е – збереження структур паренхіми, правильне розташування судин, Е - відсутність дилатації та потовщення стінок судин). ЛН - ліва нирка, ПН – права нирка, КГ – контрольна група. ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, $\times 400$.

Стосовно патологічних змін контралатеральних ПН підгрупи В II можна відокремити периваскулярні осередки розростання сполучної тканини (рис. 1 Г), що зазвичай мали запальний інфільтрат та інтерстиційний набряк, дистрофічні зміни епітелію каналців і значне потовщення стінок судин через гіпертрофію м'язового шару (рис. 3 Г), що доводить наявність ренальної гіпертензії у шурів із однобічним уростазом. CD3⁺ Т-лімфоцити спостерігалися нами і в периваскулярній сполучній тканині, і в перитубулярних інтерстиціальних проміжках (рис. 2 Г), в середньому на рівні 16,9±1,1, що вірогідно відрізнялось від КГ (p<0,05).

Нирки підгрупи шурів С I (ЛН), що мали обидва патологічні процеси, демонстрували найбільші та найтяжчі патологічні зміни паренхіми (рис 1 Г, Д), що поєднували гідронефроз, склероз, запалення (рис 2 Г) з ураженням судин (дилатація, крововиливи, інтерстиційний набряк, значне порушення анігіоархітектоніки (рис 3 Г)), на відміну від контрольної групи (рис. 3 Е, Є). CD3⁺ Т-лімфоцити налічувалися в середньому біля 58,9±1,1. Контралатеральні ПН підгрупи С II показали ті ж патологічні зміни, що були притаманні ПН попередніх груп – інтерстиційний набряк, осередковий склероз, паренхіматозні крововиливи (рис. 1 Е), потовщення м'язових шарів артерій та артеріол. Вміст CD3⁺ Т-лімфоцити в ділянках хронічного запалення коливався в межах 10,9±0,8, що також показало вірогідну різницю з КГ (p<0,05) (рис. 2 Д).

Висновки

1. Таким чином, при однобічному пошкодженні нирок шурів, внаслідок експериментальної

ішемії, або порушення уродинаміки, або обох цих патологічних станів разом, що завдають шкоди місцевому нирковому кровотоку, в інших контралатеральних «здорових» нирках виникають патологічні зміни ще до проведення нефректомії, і це говорить про необхідність їх медикаментозної підтримки.

2. Основні патологічні прояви в правих контралатеральних «здорових» нирках досліджуваних груп шурів проявлялися в наявності дистрофічних змін епітелію каналців, осередків набряку та склерозу навколо крупних судин, перитубулярних та периваскулярних круглоклітинних запальних інфільтратів із вмістом CD3⁺ Т-клітин (для підгрупи А II – 10,3±1,2, для В II – 11,9±1,1, для С II – 10,9±0,8), що вірогідно відрізнялися від контрольної групи (p<0,05), де CD3⁺ Т-лімфоцити зустрічалися у вигляді поодиноких клітин інтерстицію на рівні 2,1±0,5.

3. Гіпертрофія гладком'язових клітин стінок артерій та артеріол правих контралатеральних «здорових» нирок досліджуваних груп шурів, порівняно з контрольною групою, підтверджує наявність ренальної гіпертензії, що виникає при односторонньому ураженні нирок в змодельованих патологічних станах.

Перспективи подальших розробок

Дослідження процесів проліферації та апоптозу за допомогою імуногістохімічних маркерів в ушкоджених та контралатеральних «здорових» нирках шурів при експериментально змодельованих однобічних патологічних станах, які призводять до порушення місцевого кровотоку, є перспективним напрямком подальших розробок.

Літературні джерела References

1. Lyulko OV, Pidhirny YaM, Barannik SI. [Pathomorphologic changes of kidneys during ischemia]. Medical perspectives. 2006;11(3):16-25. Ukrainian.
2. Lul'ko OV, Barannik SI, authors. Zmini mikrocirkulatsionogo rusla ta ATF-asnoi aktivnosti parenhimi nirok pri eksperementalnyi ishemii [Changes in microcirculation and ATPase activity in experimental ischemia of the one kidney parenchyma] Urology. 2005;4:22-7. Ukrainian.
3. Marchenko TV, Morozov YA, Doletskaya LG, authors. [Functional status of solitary kidney after nephrectomy in living kidney donors of related kidney: is all that simple?] Pochki. 2014;(1):14-7. Russian.
4. Petersen RO, Sesterhenn IA, Davis ChJ. Urologic Pathology. 3rd ed. Washington, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 612 p.
5. Bostwick DG, Cheng L. Urologic Surgical Pathology. 2nd ed. Washington, USA: MOSBE Elsevier; 2008. 1026 p.
6. Fogo AB, Cohen AH, Jennette JCh, Bruijn JA, Colvin RB. Fundamentals of Renal Pathology. New York, USA: Springer; 2006. 221 p.
7. Howie AJ. Handbook of Renal Biopsy Pathology. 2nd ed. New York, USA: Springer; 2008. 337 p.

Стусь В.П., Баранник К.С., Шпонька И.С., Пославская А.В. Исследование моделей односторонних патологических процессов нарушения местного почечного кровотока, с целью определения изменений состояния контралатеральной почки: иммуноморфологические аспекты.

Реферат. Статья посвящена исследованию моделей патологических состояний, которые чаще всего становятся причиной односторонней нефрэктомии из-за необратимых изменений местного почечного кровотока (ишемия, уростаз) на почках крыс линии Вистар с целью определения состояния контралатеральных «здоровых» почек и их компенсаторных возможностей иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител к CD3 и α SMA. Все контралатеральные почки исследуемых групп крыс продемонстрировали дистрофические изменения эпителия канальцев, очаги склероза вокруг крупных сосудов, перитубулярные и периваскулярные круглоклеточные воспалительные инфильтраты с CD3⁺ Т-лимфоцитами (для подгруппы А II – $10,3 \pm 1,2$, для В II – $11,9 \pm 1,1$, для С II – $10,9 \pm 0,8$), а также гипертрофию мышечной оболочки артерий и артериол, вследствие почечной гипертензии, что не было обнаружено в образцах группы контроля.

Ключевые слова: кровоток паренхимы почек, экспериментальная ишемия, нарушение уродинамики, CD3, α SMA.