

## ПОРУШЕННЯ МІСЦЕВОГО НИРКОВОГО КРОВОТОКУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ОДНОСТОРОННІХ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У НИРКАХ

*В.П. Стусь, І.С. Шпотька, К.С. Бараннік, О.В. Пославська*

*ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»*

**Вступ.** Деякі патологічні стани (гостре порушення відтоку сечі або ішемічне ураження) спричинюють стійке порушення ниркового кровообігу, яке призводить до значного порушення функції нирки, внаслідок місцевої атрофії паренхіми або склерозу, змін ангіоархітекτονіки, виникнення хронічного запалення. Згідно з останніми дослідженнями [1,2], функціональні зміни відбуваються також і в протилежній «здоровій» нирці, що стає особливо актуальним після односторонньої нефректомії [3]. Морфологія компенсаторно-присосовних 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 шурів з експериментально змодельованими найбільш розповсюдженими патологічними станами (ішемія, порушення уродинаміки) має велике практичне значення.

**Мета дослідження:** Дослідити патоморфологічні особливості нирок шурів із експериментальним порушенням кровообігу, уродинаміки й кровообігу і уродинаміки разом та стан контралатеральних «здорових» нирок для визначення їх можливих патологічних змін, таких як запалення, ураження судинного русла, за допомогою експресії імуногістохімічних маркерів CD3 та  $\alpha$ SMA.

**Матеріали та методи дослідження.** В експерименті на 24 білих половозрілих щурах лінії Вістар створювали постійну ішемію лівої нирки фіксованим перегинанням її артерії для 15 тварин (група А), робили гостре порушення уродинаміки лівої нирки фіксованим перетинанням її сечоводу на рівні в/з для 4 тварин (група В) і моделювали обидва патологічні стани для 5 тварин (група С). Стан паренхіми десяти відносно здорових шурів брали за контроль (контрольна група) для порівняння (табл. 1).

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

водили з дотриманням рекомендацій, передбачених Європейською конвенцією з нагляду за проведенням лабораторних та інших дослідів з участю лабораторних тварин різних видів, Конвенцією з біоетики Ради Європи, Гельсінською декларацією Всесвітньої медичної асоціації, 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 шурів були виготовлені на базі відділення загальної патології КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро» для подальшого проведення імуногістохімічного (ІГХ) дослідження в морфологічному відділі діагностичного центру ООО «Аптеки медичної академії», м. Дніпропетровськ. Для проведення світлової мікроскопії використовували мікроскоп «Leika DLM-E» (США) з об'єктивами  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ . Згідно зі стандартною процедурою, гістологічні зрізи 4–6 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, з проведенням депарафінізації, регідратації зрізів та температурного демаскування антигенів у цитратному буфері рН 6.0 з підгрівом у автоклаві при температурі  $+121^\circ\text{C}$ . Активність ендогенної пероксидази пригнічували 3%-вим розчином перекису водню. Інкубація зрізів з первинними антитілами відбувалася у вологих камерах при температурі  $23\text{--}25^\circ\text{C}$ . В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до CD3 та  $\alpha$ SMA (ThermoScientific, США) (табл. 2).

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

Розраховували CD3+ Т-лімфоцитів за мембранним забарвленням відповідного маркера в

## 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

Таблиця 2

## Панель первинних антитіл

Антитіло	Клон	Титр	Виробник
CD3	Клон SP7	1:500	TermoScientific
$\alpha$ SMA	Клон 1A4	1:200	TermoScientific

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  $\alpha$ SMA при збільшенні ( $\times 200$ ) у 10 полях зору [7].

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

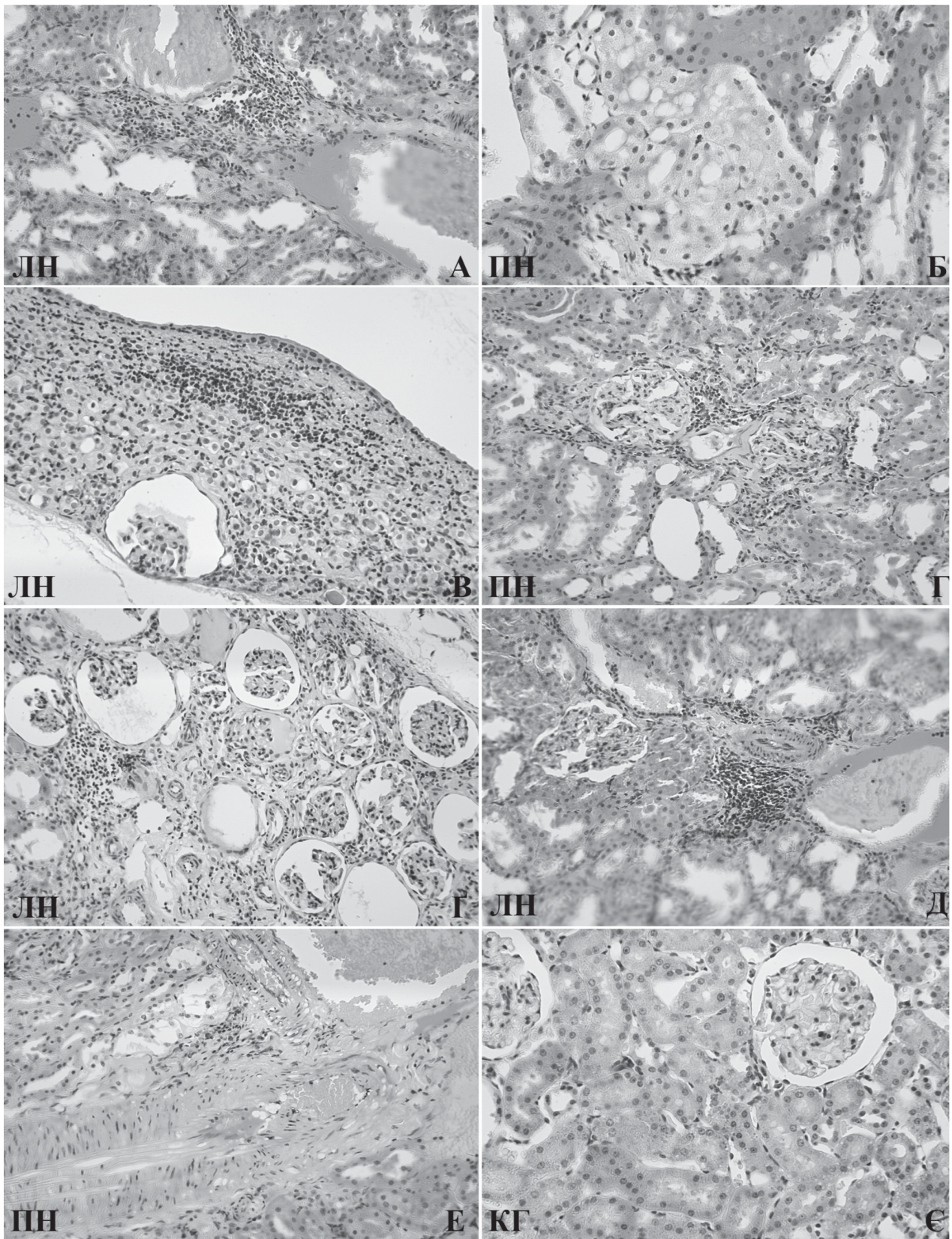
**Результати та їх обговорення.** Нирка щура, як однодольний однопірамідний орган, представляє безумовно цікавий об'єкт для дослідження змін місцевого кровообігу при різних патологічних станах, які притаманні ниркам людини. Підгрупа щурів А І (ліві нирки – ЛН), що перебувала під впливом експериментальної ішемії, при гістологічному дослідженні характеризувалася великою кількістю повнокровних дилатованих судин (рис. 1, А), що мали периваскулярну набрякту строму і звивистий хід. Більшість полів зору містила екстравазальні точкові крововиливи навколо розгалуженої капілярної сітки, розташованої навколо звивистих каналців. Епітелій більшості каналців перебував у стані гідропічної дистрофії, що також було знайдено в контралатеральних правих нирках (ПН) підгрупи А ІІ (рис. 1, Б), як і набрякту стромі. Це підтвер-

джує, що судинні захворювання нирок впливають на клубочки, судини та ниркову паренхіму із каналців та інтерстицію. І хоча останні є окремими функціональними та структурними відділеннями, вони тісно пов'язані між собою, пошкодження одного неминуче призводить до пошкодження іншого.

На зрізах, забарвлених гематоксилином-еозином (ГЕ) в уражених ЛН спостерігалися великі периваскулярні круглоклітинні запальні інфільтрати. Завдяки маркеру Т-клітинної диференціації CD3 зрозуміло, що останні представляли більшу частину імуніцитів. У середньому кількість CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцитів у підгрупі А І склала  $62,7 \pm 1,5$ . Цікаво, що в поодиноких випадках розміри ділянок запалення розповсюджувалися навіть на навколониркову жирову тканину (рис. 2, А), на відміну від підгрупи А ІІ, де запальні інфільтрати мали завжди осередковий характер і звичайно розташовувалися навколо судин, але могли бути в міжтубулярних просторах (рис. 2, Б). Ці прояви характерні для хронічного тубулоінтерстиціального нефриту. Кількість CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцитів в підгрупі А ІІ у середньому склала  $14,3 \pm 1,2$ , на відміну від контрольної групи (КГ), де Т-лімфоцити зустрічалися рідко і лише 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  $\alpha$ SMA, що виявляє експресію  $\alpha$ -гладенького актину. Порушення кровопостачання (фіксоване перегинан-





**Рис. 1.** Патоморфологічні зміни нирок щурів (ЛН – ліва нирка, ПН – права нирка, КГ – контрольна група), забарвлення ГЕ (×400). *Експериментальна ішемія:* А – наповнені 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 (×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 (×200); Д – периваскулярні інфільтрати навколо дилатованих та повнокровних судин; Е – потовщення судинної стінки – склероз, гіаліноз. *Контрольна група:* Е – нормальне співвідношення кількості клубочків і каналців без патологічних змін



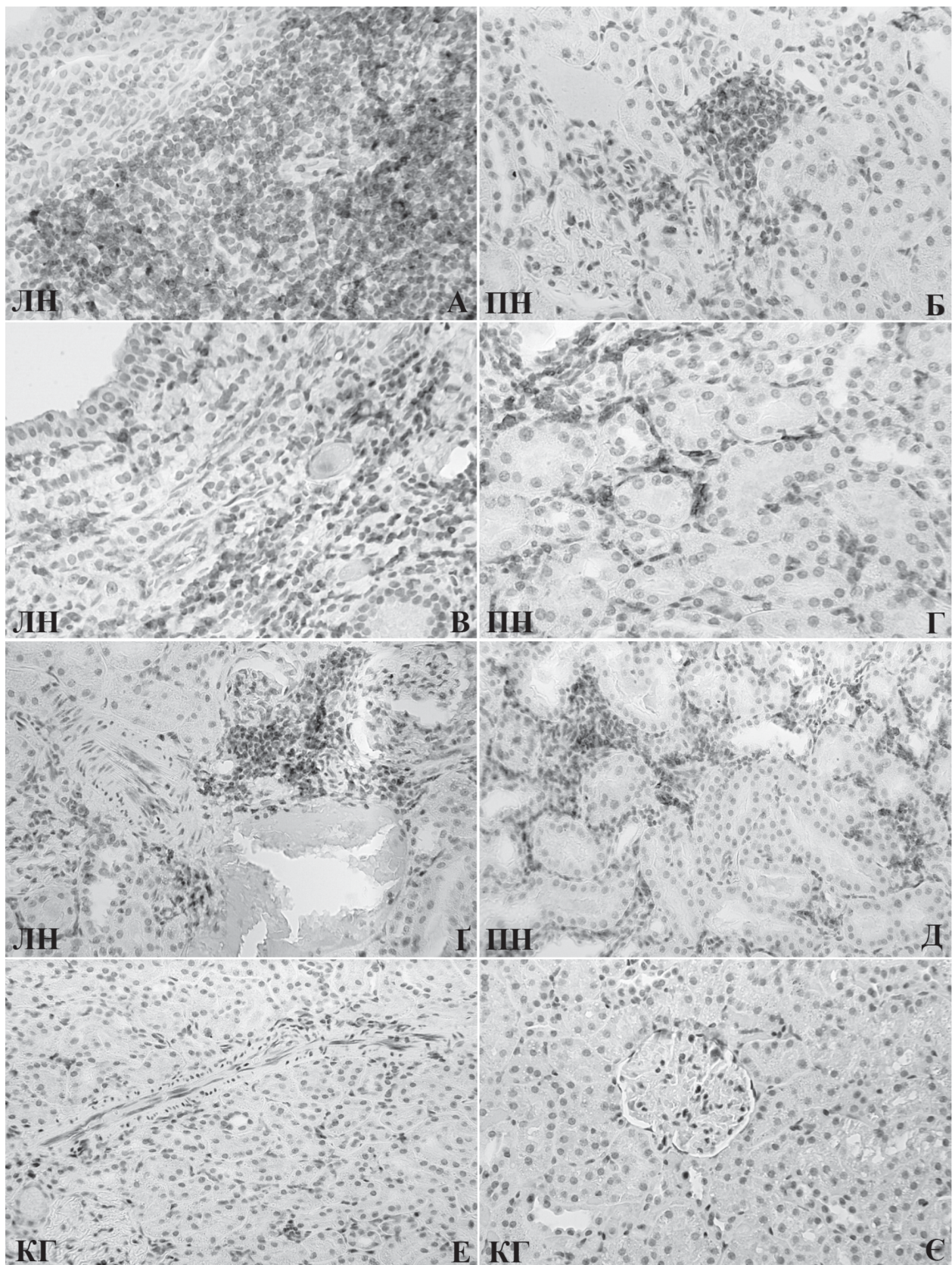


Рис. 2. Експресія маркера CD3 на мембранах Т-лімфоцитів (ЛН – ліва нирка, ПН – права нирка, КГ – контрольна група), ГХ метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (×400). *Експериментальна ішемія:* А – масивний паранефральний запальний інфільтрат; Б – скупчення Т-лімфоцитів навколо судин. *Порушення уродинаміки:* В – дифузний запальний інфільтрат серед атрофічної паренхіми; Г – перитубулярні Т-лімфоцитарні інфільтрати. *Порушення кровообігу та уродинаміки:* Д – запальні інфільтрати навколо дилатованих, перенаповнених кров'ю судин; Е – перитубулярні Т-лімфоцитарні інфільтрати. *Контрольна група:* Ж – відсутність CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцитів навколо судин; З – відсутність CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцитів навколо каналців і клубочків нирки



ня правої ниркової артерії) у 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, внутрішньодолькових 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). Слід зазначити, що підгрупа А ІІ паралельно з цим характеризувалася помірною гіперплазією м'язових стінок судин, що добре видно при цитоплазматичній експресії маркера  $\alpha$ SMA в гладком'язових клітинах (рис. 3, Б). Швидко за все гіперпластична реакція стінок судин «здорової» нирки виникає через підвищення артеріального тиску, внаслідок включення юкстагломерулярного механізму активації ренін-ангіотензинової системи ушкодженої нирки.

Підгрупа шурів В І (ЛН) після перетинання їхніх 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 канальці серед склерозованого інтерстицію, осередки хронічного запалення, з більшою частиною CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцитів (рис. 2, В). У середньому кількість CD3<sup>+</sup> Т-клітин у підгрупі В І склала 54,1±0,9. Зміна співвідношення кількості канальців 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. Стосовно патологічних змін контралатеральних ПН підгрупи В ІІ можна виокремити периваскулярні осередки розростання сполучної тканини (рис. 1, Г), що зазвичай мали запальний інфільтрат та інтерстиційний набряк, дистрофічні зміни епітелію канальців і значне потовщення стінок судин через гіпертрофію м'язового шару (рис. 3, Г), що підтверджує наявність ренальної гіпертензії у шурів із одностороннім уростазом. CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцити спостерігалися нами і в периваскулярній сполучній тканині, і в перитубулярних інтерстиціальних проміжках (рис. 2, Г), у середньому на рівні 16,9±1,1, що вірогідно відрізнялось від КГ ( $p < 0,05$ ).

Нирки підгрупи шурів С І (ЛН), які мали обидва патологічні процеси, зазнавали найбіль-

ших та найтяжчих патологічних змін паренхіми (рис. 1, Г, Д), що поєднували гідронефроз, склероз, запалення (рис. 2, Г) з ураженням судин (дилатація, крововиливи, інтерстиційний набряк, значне порушення ангіоархітектоніки (рис. 3, Г), на відміну від контрольної групи (рис. 3, Е, Є). CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцити налічувалися в середньому близько 58,9±1,1. Контралатеральні ПН підгрупи С ІІ 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<sup>+</sup> 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).

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

#### Висновки

1. Таким чином, при односторонньому ураженні 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 свідчить про необхідність їх медикаментозної підтримки.

2. Основні патологічні прояви в правих контралатеральних «здорових» нирках досліджуваних груп шурів проявлялися в наявності дистрофічних змін епітелію канальців, осередків набряку та склерозу навколо крупних судин, перитубулярних та периваскулярних круглоклітинних запальних інфільтратів із вмістом CD3<sup>+</sup> Т-клітин (для підгрупи А ІІ – 10,3±1,2, для В ІІ – 11,9±1,1, для С ІІ – 10,9±0,8), що вірогідно відрізнялися від контрольної групи ( $p < 0,05$ ), де CD3<sup>+</sup> 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 у змодельованих патологічних станах.



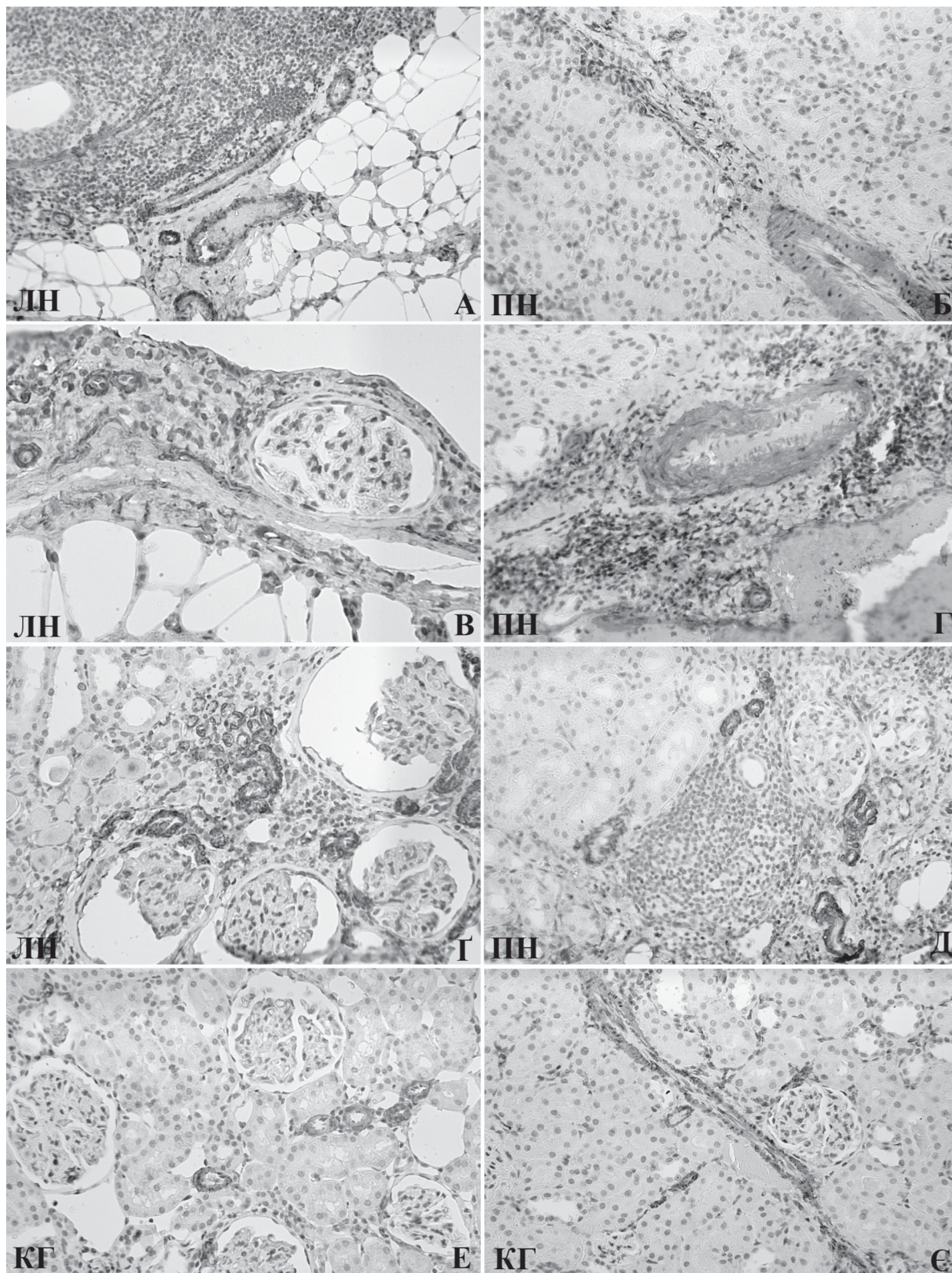


Рис. 3. Експресія маркера  $\alpha$ SMA в цитоплазмі гладком'язових клітин стінок судин (ЛН – ліва нирка, ПН – права нирка, КГ – контрольна група), ГХ метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (Ч400).

*Експериментальна ішемія:* А – наповнені, 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; Є – відсутність дилатації та потовщення стінок судин



## Список літератури

1. Люлько О.В. Патоморфологічні зміни нирок під час ішемії / О.В. Люлько, С.І. Баранник, Я.М. Підгірний // *Медичні перспективи*. – 2006. – Т. 11, № 3. – С. 16–25.
2. Люлько О.В. Зміни мікроциркуляторного руслу та АТФ-азної активності паренхіми нирок при експериментальній ішемії однієї нирки / О.В. Люлько, С.І. Баранник // *Урологія*. – 2005. – № 4. – С. 22–27.
3. Марченко Т.В. Функциональное состояние единственной почки после нефрэктомии у живых доноров родственной почки: так ли все просто? / Т.В. Марченко, Ю.А. Морозов, Л.Г. Долецкая // *Почки*. – 2014. – № 1(7). – С. 14–17.
4. Petersen R.O., Sesterhenn I.A., Davis Ch.J. *Urologic Pathology, 3rd Edition*. – USA: Washington: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. – 612 p.
5. Bostwick D.G., Cheng L. *Urologic Surgical Pathology, 2nd Edition*. – USA: Washington: MOSBY Elsevier, 2008. – 1026 p.
6. Fogo A.B., Cohen A.H., Jennette J.Ch., Bruijn J.A., Colvin R.B. *Fundamentals of Renal Pathology*. – USA: New York: Springer, 2006. – 221 p.
7. Howie A.J. *Handbook of Renal Biopsy Pathology, 2nd edition*. – USA: New York: Springer, 2008. – 337 p.

## Реферат

НАРУШЕНИЕ МЕСТНОГО ПОЧЕЧНОГО КРОВОТОКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОДНОСТОРОННИХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПОЧКАХ

В.П. Стусь, И.С. Шпонька,  
К.С. Баранник, А.В. Пославская

В эксперименте на 24 белых половозрелых крысах линии Вистар создавали постоянную ишемию левой почки путем перевязывания ее артерии на 15 крысах (группа А), острое нарушение уродинамики левой почки путем перевязывания мочеточника на уровне в / 3 на 4 крысах (группа В) и моделировали оба патологических состояния на 5 крысах (группа С). Состояние паренхимы почки десяти относительно здоровых крыс брали за контроль (контрольная группа) для сравнения. При гистологическом исследовании использовались основные моноклональные антитела к CD3 (воспалительный маркер) и  $\alpha$ SMA (сосудистый маркер) (TermoScientific, США).

В экспериментальных почках подгруппы А I (левая почка), которая находилась под влиянием экспериментальной ишемии, при гистологическом исследовании выявлено большое количество полнокровных дилатированных сосудов, отмечался переваскулярный отек стромы и извитой ход. Эпителий большинства канальцев находился в состоянии гидropической дистрофии. Содержание CD3+ Т-клеток для подгруппы А I составило  $62,7 \pm 1,5$ . В подгруппе В I (уростаз левой экспериментальной почки) на гис-

## Summary

VIOLATION OF THE LOCAL KIDNEY BLOOD-GROOVE WHEN MODELLING UNILATERAL PATHOLOGICAL PROCESSES IN KIDNEYS

V.P. Stus, I.S. Shpon'ka,  
K.S. Barannik, O.V. Poslavs'ka

In experiment on 24 white polovozrelykh rats of the line Vistar created constant ischemia of the left kidney by a perevyazyvaniye of her artery on 15 rats (group A), sharp violation of an urodinamika of the left kidney by a perevyazyvaniya of a mochetochnik at the level in / 3 on 4 rats (group B) and modelled both pathological states on 5 rats (group C). The condition of a parenchyma of a kidney of ten rather healthy rats was taken for control (control group) for comparison. At histologic research the main monoclonal antibodies to CD3 (an inflammatory marker) and  $\alpha$ SMA (a vascular marker) were used (TermoScientific, the USA).

In experimental kidneys of subgroup of А I (the left kidney) which was under the influence of experimental ischemia, at histologic research a large number full-blooded the dilyatirovannykh of vessels is revealed, revascular hypostasis of a stroma and izvity the course was noted. An epithelium of the majority of tubules were in a condition of gidropichesky dystrophy. The maintenance of CD3+ of T-cages for subgroup А I made  $62,7 \pm 1,5$ . In subgroup В I (urostaz the left experimental kidney) on histologic cuts the atrophy of tubules among sclerous an interstition, the centers of a chronic inflammation with the most part of CD3+ of



тологических срезах наблюдалась атрофия канальцев среди склеротического интерстиция, очаги хронического воспаления с большей частью CD3+ Т-лимфоцитов. Количество CD3+ Т-клеток для подгруппы В I составило  $54,1 \pm 0,9$ . В экспериментальных почках подгруппы С I выявлены наиболее тяжелые патологические нарушения в паренхиме, которые проявлялись гидронефрозом, склерозом, воспалением с поражением сосудов (дилатация, кровоизлияние, интерстициальный отек). Содержание CD3+ Т-лимфоциты для подгруппы С I составило  $58,9 \pm 0,1$ .

Основные патологические изменения в контралатеральных «здоровых» почках исследуемых групп крыс проявились в наличии дистрофических изменений в эпителии канальцев, очагов отека и склероза вокруг крупных сосудов, перетубулярных и переваскулярных круглоклеточных воспалительных инфильтратов с содержанием CD3+ Т-клеток (для подгруппы А II –  $10,3 \pm 1,2$ ; для В II –  $11,9 \pm 1,1$ ; для С II –  $10,9 \pm 0,8$ ), которые отличались от контрольной группы ( $p < 0,05$ ), где CD3+ Т-лимфоциты встречались в виде одиночных клеток интерстиция на уровне  $2,1 \pm 0,5$ .

Таким образом, одностороннее поражение почек у крыс, вследствие экспериментальной ишемии или нарушения уродинамики или одновременно двух патологических состояний приводит к резкому нарушению местного почечного кровотока. В контралатеральных «здоровых» почках также возникают патологические изменения еще до проведения нефрэктомии, что указывает на необходимость их медикаментозной поддержки.

**Ключевые слова:** кровообращение паренхимы почек, экспериментальная ишемия, нарушения уродинамики, CD3,  $\alpha$ SMA.

#### Адреса для листування

В.П. Стусь  
E-mail: viktor.stus@gmail.com

T-lymphocytes was observed. The quantity of CD3+ of T-cages for subgroup В I made  $54,1 \pm 0,9$ . In experimental kidneys of subgroup of С I the heaviest are revealed pathological violation in a parenchyma which were shown gidronefrozy, by a sclerosis, an inflammation with defeat of vessels (a dilyatation, hemorrhage, interstitsialny I swelled). The maintenance of CD3+ With I made T-lymphocytes for subgroup  $58,9 \pm 0,1$ .

The main pathological changes in contralateral “healthy” kidneys of the studied groups of rats were shown available dystrophic changes in an epithelium of tubules, the centers of hypostasis and a sclerosis round large vessels, the peretubulyarnykh and revascular the kruglokletochnykh of inflammatory infiltrates with the maintenance of CD3+ of T-cages (for subgroup А II –  $10,3 \pm 1,2$ ; for В II –  $11,9 \pm 1,1$ ; for С II –  $10,9 \pm 0,8$ ) which differed from control group ( $p < 0,05$ ) where CD3+ T-lymphocytes met in the form of single cages an interstition at the level of  $2,1 \pm 0,5$ .

Thus, unilateral damage of kidneys at rats, owing to experimental ischemia or violation of an urodinamika or at the same time two pathological states leads to sharp violation of a local kidney blood-groove. In contralateral “healthy” kidneys also there are pathological changes even before carrying out a nefrektomiya that indicates the need of their medicamentous support.

**Keywords:** blood circulation of a parenchyma of kidneys, experimental ischemia, violations of an urodinamika, CD3,  $\alpha$ SMA.