

ПАТОМОРФОЛОГІЯ

© А.О. Несен, І.І. Топчій, О.О. Васил'єв

УДК 616.36-036.12-092:546.172.6-03

А.О. Несен, І.І. Топчій, О.О. Васил'єв

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОХІМІЧНОЇ РЕАКЦІЇ НА NO-СИНТАЗУ ПРИ ХРОНІЧНИХ ХВОРОБАХ НИРОК

ДУ «Інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України» (м. Харків)

Дана робота є фрагментом НДР «Розробити методи діагностики, лікування та профілактики хронічних пієлонефриту та гломерулонефриту з урахуванням функціонального стану лейкоцитів, системної та клітинної активності NO-синтази», № держреєстрації 0106U000599.

Вступ. За останні роки дослідження в нефрології інсценували, що при хронічних хворобах нирок (ХХН) руйнується взаємодія формених елементів крові з судинним ендотелієм та міжклітинним матриксом. Такі порушення залежать від різних факторів - експресії адгезивних молекул на формених елементах та ендотеліальних клітинах; порушень секреції ендотеліальними клітинами таких продуктів як оксид азоту (NO), ендотелін, фактор активації тромбоцитів та ін [3, 5-8].

Визначено, що ішемія при ХХН асоціюється з активацією комплементу та підвищенням рівня ліпідних медіаторів, таких як лейкотрієни, що є хемотрактантами для нейтрофілів. Адгезовані та активовані лейкоцити продукують реактивні протеїнази, еластази та інші ензими, які пошкоджують ішемізовані тканини безпосередньо, підсилюють клітинну інфільтрацію та вазоконстрикцію. При ХХН процеси порушення ниркової гемодинаміки, що розвиваються при цьому, відіграють значну роль в становленні нефрогенної гіпертензії та прогресуванні ниркової недостатності [2, 4-7].

Функціональний стан нирок більш ніж інших органів залежить від стану ендотелію, так як утримує до 2-2,5 млн. судинних клубочків, кожний з яких має близько 50 капілярних петель. Ендотелій капілярів клубочку є першим шаром на шляху ультрафільтрації, що визначає важливість його функціонального стану у розвитку ниркової патології. Нейтрофіли поряд з клітинами ендотелію є важливим джерелом NO. При гломерулопатіях в клубочках нирок синтезуються цитокіни, які можуть як стимулювати, так й інгібувати NO-синтазу. Відома протективна роль NO у ранній фазі гострого гломерулонефриту, можливо у противагу гострому підвищенню вазоконстрикторних факторів. На наступних стадіях процесу NO бере участь в регуляції активності мезангіальних клітин [5-8].

Оксид азоту, який утворюється у ендотеліальних клітинах судин під впливом NO-синтази викликає розслаблення їх гладеньких м'язів, що викликає вазодилатацію, збільшення кровообігу, зниження

периферійного опору, зниження системного артеріального тиску (АТ) [3-6]. Але до цього часу не ясно, проти-, чи профіброзний ефект має NO при ХХН, цитотоксичний чи цитопротективний ефект переважає при прогресуванні захворювання.

Мета дослідження - визначити особливості гістохімічної реакції на NO-синтазу при хронічних хворобах нирок.

Об'єкт і методи дослідження. Гістохімічними і морфометричними методами здійснено вивчення морфологічних особливостей гістоструктури гломерулярного апарату нирок при хронічному гломерулонефриті (ХГ). Напівтонкі зрізи нефробіоптатів фарбували по Сато. Гістологічні зрізи аутопсії та післяопераційного матеріалу фарбували гематоксиліном-еозином, на еластику по Вейгерту на криостатних зрізах ставили гістохімічну реакцію на NO-синтазу. Індекс щільності капілярів в тканині нирки визначали по методиці Г.Г.Автанділова [1].

Проводилось дослідження пофарбованих Суданом ІУ клітин і тканин людини. Тест система Вейбеля являє собою прозору лінійку на яку нанесено 126 ліній постійної довжини Z, причому лінії розміщені паралельними рядками, які лежать на рівній відстані один від одного. Візулізується сітка з рівносторонніх трикутників, що мають 252 кінцеві точки, які використовують у якості тестових точок для вимірювання відсотка площі морфологічного об'єкту, та об'ємного відсотка клітинних елементів у тканинах.

Результати досліджень та їх обговорення. При мезангіальному гломерулонефриті визначено гіперплазію ендотеліальної сітки і пластинчатого комплексу, наявність секреторних гранул, виражену гіпертрофію і гіперплазію мезангіоцитів з наявністю в їх цитоплазмі лізосомоподібних тілець. Також визначені невеликі зміни в каналцях та інтерстиції. В інтерстиції в більшості випадків виявляється слабке набухання, інколи дифузне розростання сполучної тканини і потовщення базальних мембран каналців. В проксимальних відділах каналців спостерігається білкова дистрофія епітеліальних клітин, деінде в їх просвіті попадаються еритроцити (рис. 1, 2).

Для мезангіопроліферативного гломерулонефриту характерно розширення мезангію судинного пучка клубочків нирки за рахунок незначної проліферації мезангіоцитів і гіперпродукції ними речовини базальної мембрани з «відшаруванням» від базальної мембрани ендотелію (рис. 1).

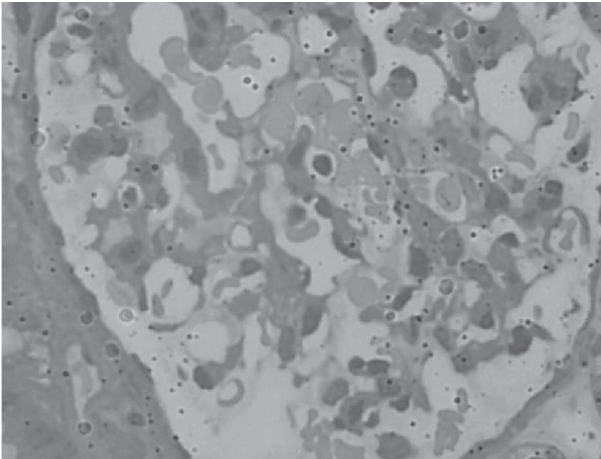


Рис. 1. Значне потовщення базальної мембрани капілярів зі звуженням їх просвіту, «відшарування» ендотеліоцитів. ХГ. Х400. Напівтонкий зріз. Забарвлення метиленовим синім.

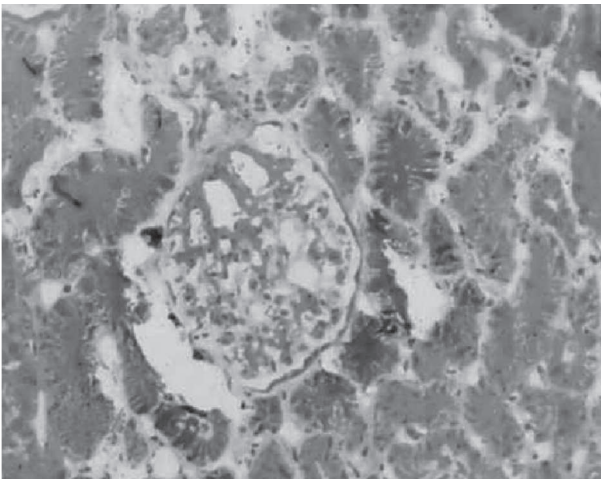


Рис. 2. Проліферація мезангіальних клітин, розширення мезангію. ХГ. Забарвлення метиленовим синім, Х200.

При дослідженні нефробиопсії наступного хворого на ХГ визначено, що капіляри клубочків нирки склерозовані, стінка артеріол стовщена, епітелій каналців нирки сплюснений, порожнина їх розширена, заповнена білковими масами (рис. 3).

При проведенні гістохімічної реакції на NO-синтазу визначено сукцинатдегідрогеназну активність навколо капсули склерозованого клубочка нирки, а також незначну активність NO-синтаз у стінці артеріол (рис. 4).

У нирках наявні та активні усі три ізоформи NOS: pNOS переважно синтезується у *macula densa* та внутрішньому модулярному збираючому протоці; eNOS найбільш активна у ендотелії клубочкових капілярів, аферентних та еферентних артеріолах та внутрішньониркових артеріях; iNOS загалом локалізована у декількох сегментах каналців, клубочка, міждольових та дугоподібних артеріях.

Існують дані про постійний синтез оксиду азоту у ендотеліальних та гладко-м'язових клітинах ниркових судин, мезангіальних та епітеліальних каналцевих клітинах, що відіграє важливу роль у регуляції

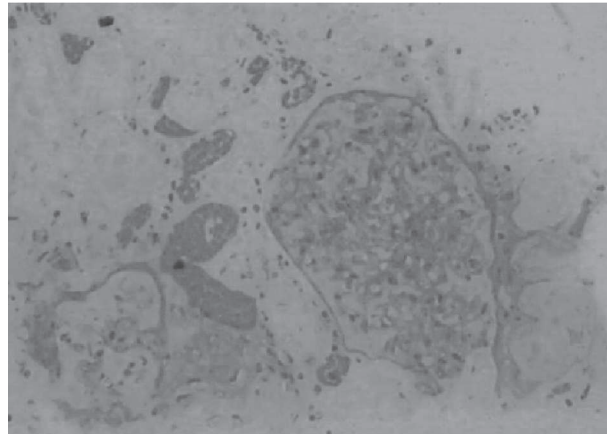


Рис. 3. Склерозування капілярів клубочків нирки. ХГ. Напівтонкий зріз, забарвлення метиленовим синім. Кріостатний зріз. Х200.

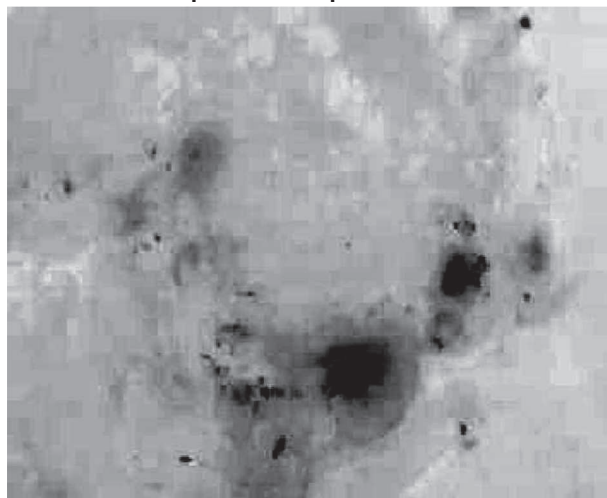


Рис. 4. Гістохімічна реакція на NO-синтазу. ХГ. Активність (гранули темно-синього кольору) виявляється навколо капсули склерозованого клубочка нирки та в стінці артеріоли. Кріостатний зріз. Х200.

ниркового кровообігу, екскреторної функції нирок, тубулогломерулярного балансу. Зрушення в активності L-аргінін — оксид азоту беруть участь у механізмах протеїнурії, мезангіальної проліферації, лейкоцитарної інфільтрації, патогенезі ниркової гіпертонії, обструктивних нефропатій з порушенням пасажу сечі. Розподіл експресії ізоформ NOS в нирках має суттєве значення, так як порушення активності NO виявлено при багатьох нирково-залежних патологічних станах. NO приймає участь у регуляції ниркової гемодинаміки; модуляції транспорту рідини та електrolітів; корекції функції нирок у відповідь на ураження [4-8].

Гістохімічний метод виявлення загальної активності NOS у тканинах заснований на визначенні NADPH-діафоразної активності та проводиться з використанням гістохімічної реакції з нітросинім тетразолієм. Цей метод найбільш часто використовується для діагностики ішемічної стадії інфаркту міокарду. Крім м'язової тканини висока активність цього ферменту виявляється у ендотелії судин, і меншій мірі - у гладенько-м'язових клітинах судинної стінки. У

нормі гістохімічна реакція проявляється відновленням у осередках активності ферменту зерен формазану, які мають під світловим мікроскопом синій колір. Зниження NADPH-діафоразної активності виявляється зміною кольорової гамми від синього до блідо-рожевого кольору, що вказує на зниження NO-синтазної активності клітин.

У нормі NADPH-діафоразної активність NOS виявляється у ендотелії капілярів клубочків нирок, а також у стінках та ендотелії артеріол, що приносять та виносять кров. Найбільша активність виявляється у місцях ділення капілярів нирки на сегменти. По мірі прогресування хвороби ступінь NADPH-діафоразної активності у ендотелії капілярів клубочку нирки знижується, тоді як у стінках артеріол, що приносять та виносять кров клубочку нирки залишається незмінною. При термінальних стадіях ХХН активність NOS у капілярах клубочків нирок не виявляється. У стінках артеріол, що приносять та виносять кров NADPH-діафоразної реакція дає відтінок від синього до блідо-рожевого кольору, що вказує на прогресування склерозу стінок артеріол.

Запальні клітини та системи, які присутні у гладеньких м'язках є джерелом активних форм кисню (АФК), котрі мають можливість впливати на функцію судин. Запальні клітини містять регулюючу рецептором NADPH-оксидазу, яка може продукувати цитотоксичні рівні АФК. Дві інші ендотеліальні системи - ксантиноксидаза та циклооксигеназа також можуть продукувати вазоактивні рівні АФК. Циклооксигеназа каталізує утворення супероксиданіону у ході окислення таких кофакторів як NADPH. Пряма взаємодія цих кофакторів з такими АФК як супероксиданіон є важливим моментом у механізмі передачі

сигналу у судинах, що слідує з високої ефективності хімічних реакцій між супероксидом та NO [5-8].

Отже під впливом імуногенних та прозапальних стимулів (ендотоксини, бактеріальні ліпополісахариди, інтерлейкін-1, некротизивний пухлинний фактор) відбувається експресія гена відповідального за синтез індукованої NO-синтази. Стимуляція ядра клітини в цих цілях включає кілька ще маловивчених регуляторних ланок у ланцюгу відповідних внутрішньоклітинних реакцій, які закінчуються утворенням стимулюючих ядро факторів. При цьому клітини (макрофаги, нейтрофіли, моноцити та ін.) продукують та виділяють протягом багатьох годин, інколи днів, оксид азоту у тисячі разів більше, ніж під впливом інгредієнтної NO-синтази [3-7]. Оксид азоту у цьому випадку робить могутню ушкоджуючу дію на мікробні та інші чужорідні клітини, виконуючи таким чином захисну дію в організмі.

Висновки. Таким чином, при проведенні гістохімічної реакції на NO-синтазу визначено сукцинатдегідрогеназну активність навколо капсули склерозованого клубочка нирки, а також незначну (знижену) активність NO-синтаз у стінці артеріол, що призводить до вазоконстрикції судин нирок і в подальшому до нефроангіосклерозу.

Перспективи подальших досліджень. Зважаючи на визначені морфологічні зміни, які відбуваються в нирках при ХГ, а саме зниження активності NO-синтаз у стінці артеріол, перспективним напрямком подальших досліджень є визначення впливу нефропротекторних препаратів на активність NO-синтаз з метою можливості їх довготривалого призначення для досягнення уповільнення темпів прогресування ХХН.

Список літератури

1. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии / Г.Г. Автандилов / М., «Медицина». - 1973. - 248 с.
2. Бабак О.Я. Рациональная диагностика и фармакотерапия заболеваний внутренних органов [Под ред. О.Я. Бабака]. - К., ООО «Доктор-Медиа», 2011. - 618 с.
3. Топчій І.І. Нітрити як джерело оксиду азоту у хворих із хронічною хворобою нирок / І.І. Топчій, Т.М. Бондар, А.О. Несен [та ін.] // Журнал Академії медичних наук України - 2008. - № 3, Т.14. - С. 517-526.
4. Топчій І.І. Вплив нефропротекторної терапії на вміст стабільних метаболітів оксиду азоту у хворих на хронічну хворобу нирок / І.І. Топчій, А.О. Несен [та ін.] // [Матеріали науково-практичної конференції «Внутрішні хвороби. Нові аспекти»], (Харків, 18 жовтня 2007 р.) - Харків, 2007. - С. 130.
5. Arellano-Mendoza M.G. Prevention of renal injury and endothelial dysfunction by chronic L-arginine and antioxidant treatment. / M.G. Arellano-Mendoza, H. Vargas-Robles, L. Del Valle-Mondragon [et al.] // Ren. Fail. - 2011.- № 33(1). - P. 47-53.
6. Jin U.H. Inhibitory effect of Panax notoginseng on nitric oxide synthase, cyclo-oxygenase-2 and neutrophil functions / U.H. Jin, S.G. Park, S.J. Suh [et al.] // Phytother. Res. - 2007.- Vol. 21.- № 2.- P.142-148.
7. Patel J.D. iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils / J.D. Patel, T. Krupka, J.M. Anderson // J. Biomed. Mater. Res. A.- 2007.- Vol.80. - № 2.- P.381-390.
8. Yamamoto S. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction / S. Yamamoto, Kon Valentina // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. - 2009. - №18(3). - P.181-188. **УДК** 616.36-036.12-092:546.172.6-03

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОХІМІЧНОЇ РЕАКЦІЇ НА NO-СИНТАЗУ ПРИ ХРОНІЧНИХ ХВОРОБАХ НИРОК

Несен А.О., Топчій І.І., Васил'єв О.О.

Резюме. В статті надана коротка патоморфологічна характеристика гістологічних варіантів хронічних хвороб нирок. При проведенні гістохімічної реакції на NO-синтазу визначено активність навколо капсули склерозованого клубочка нирки, а також незначну (знижену) активність NO-синтаз у стінці артеріол, що призводить до вазоконстрикції судин нирок і в подальшому до нефроангіосклерозу.

Ключові слова: хронічні хвороби нирок, патоморфологічна діагностика, нефробіопсія, гломерулосклероз.

УДК 616.36-036.12-092:546.172.6-03

ОСОБЕННОСТИ ГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА NO-СИНТАЗУ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПОЧЕК

Несен А.А., Топчий И.И., Васильев А.А.

Резюме. В статье представлена короткая патоморфологическая характеристика гистологических вариантов хронических болезней почек. При проведении гистохимической реакции на NO-синтазу исследовано активность вокруг капсулы склерозированного клубочка почки, а также незначительную (сниженную) активность NO-синтаз в стенке артериол, которая приводит к вазоконстрикции сосудов почек и в дальнейшем к нефроангиосклерозу.

Ключевые слова: хронические болезни почек, патоморфологическая диагностика, нефробиопсия, гломерулосклероз.

UDC 616.36-036.12-092:546.172.6-03

Features Of Gistochemical Reaction On NO- Synthase In Chronic Kidney Disease

Nesen A.A., Topchiy I.I., Vasilyev A.A.

Summary. In the article is reviewed short pathomorphological characteristics of histological variants of chronic kidney disease. As a result it has been established in during conducting of gistochemical reaction on NO- synthase certainly activity round the capsule of sclerosis ball in kidney, and also in the wall of arteriole, which brings insignificant (reduced) activity over of NO- synthase to vasoconstriction of vessels in kidney and in future to nephroangiosclerosis.

Key words: chronic renal disease, pathomorphological diagnostics, kidney biopsies, glomerulosclerosis.

Стаття надійшла 23.11.2011 р.