
ПАТОМОРФОЛОГІЯ

© Данилюк С. В.

УДК 616. 611-002-091. 8-018. 74

Данилюк С. В.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ПОЧЕК, СЕРДЦА И АОРТЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Харьковская медицинская академия последипломного образования

(г. Харьков)

docmorph@ya.ru

Работа является фрагментом НИР «Вдосконалення методів діагностики та підвищення ефективності лікування хронічного гломерулонефриту та хронічного пієлонефриту на підставі вивчення маркерів порушення функціонального стану нирок та ушкодження судинного ендотелію», № гос. регистрации 0112U001097.

Вступление. В последние десятилетия, как в Украине, так и во всем мире отмечается рост числа пациентов, у которых на фоне хронических воспалительных заболеваний почек развиваются сосудистые виды патологии [1, 12]. Полноценную деятельность эндотелия обеспечивает баланс между выполняемыми им разнонаправленными функциями: выработкой про- и противовоспалительных факторов, вазодилатирующих и вазоконстрикторных веществ, про- и антиагрегантов, про- и антикоагулянтов, про- и антифибринолитиков, факторов пролиферации и ингибиторов роста. В физиологических условиях преобладает вазодилатация, синтез ингибиторов агрегации, коагуляции и активаторов фибринолиза, антиадгезивных субстанций. Дисфункция сосудистых клеток нарушает этот баланс и предрасполагает сосуды к вазоконстрикции, адгезии лейкоцитов, активации тромбоцитов, митогенезу, воспалению [2]. Особенности иммунных реакций в стенках сосудов и характеризующие их морфологические изменения, включая функциональное состояние эндотелия, при наличии у пациентов хронической болезни почек (ХБП) остаются недостаточно исследованным.

Поэтому **целью исследования** было изучение морфологических характеристик в сосудах почек, сердца, аорте у больных с ХБП.

Объект и методы исследования. Нами было проведено морфологическое исследование аутопсийного материала 20 умерших пациентов в возрасте от 45 до 55 лет, которые в течении 5-7 лет наблюдались в стационарах кардиологического и неврологического профиля с диагнозом ишемическая болезнь сердца и имели клинико-анамнестические признаки хронического гломеруло- и пиелонефрита.

Проведенные исследования полностью соответствуют законодательству Украины и отвечают принципам Хельсинкской декларации прав человека, Конвенции Союза Европы относительно прав человека и

биомедицины (подтверждено заключением комиссии по биоэтике, протокол №3, 2006 г).

Работа была проведена в соответствии с требованиями «Инструкции о проведении судебно-медицинской экспертизы» (приказ МОЗ Украины №6 от 17.01.1995), в соответствии с требованиями и нормами, типичным положением по вопросам этики МОЗ Украины № 690 от 23.09.2009 г.

Образцы ткани почек, сердца и аорты фиксировали в 10% растворе формалина 24 часа, заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Для выявления особенностей иммунных клеточных реакций в зонах воспалительного процесса использовали первичные моноклональные антитела (МКАТ) фирмы DAKO (Дания), Ready-to-Use. Иммуногистохимическим методом выявляли экспрессию Т- и В-клеточных кластеров дифференцировки (CD3, CD20), маркера плазматических клеток (CD38), маркера макрофагов (CD68). Особенности эндотелизации интимы сосудов изучались по экспрессии маркера эндотелиальных клеток (CD31 JC 70A), тенденцию к васкуляризации оценивали с помощью фактора роста эндотелия сосудов (VEGF (VG1)). В качестве маркера апоптоза использовали bcl-2 (124). Материал для исследования методами иммуногистохимии фиксировали 10% нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла Super Frost и высушивали при температуре 37°C в течение 18 часов. Демаскирующая термическая обработка была выполнена по методу кипячения срезов в цитратном буфере (pH 6,0). Для визуализации первичных антител применялась система детекции Ultra-Vision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific). В качестве хромогена использовался DAB (диаминобензидин).

Для оценки степени выраженности иммуногистохимической метки использовали полуколичественную шкалу: + – слабая, . ++ – умеренная, +++ – выраженная реакция.

Комплекс морфологических исследований проводился на микроскопе Primo Star (Carl Zeiss) с использованием программы AxioCam (ERc 5s).

Результаты исследований и их обсуждение. Эндотелиоциты интимы сосудов и капилляров почек

в большинстве случаев были уплощены, цитоплазматические органеллы практически отсутствовали. Наблюдались клетки с ячеистой структурой цитоплазмы вследствие расширенных полостей гладкого эндоплазматического ретикулума. Размеры некоторых эндотелиальных клеток были увеличены, наблюдался эффект «плюс мембраны» – возрастание инвагинаций и выростов плазмолеммы в просвет сосуда, причем величина таких отростков иногда превосходила величину ядра. Строение клеточных стыков было нарушено, так как межклеточные щели расширялись, образуя крупные полости. При этом на отдельных участках наблюдалось нарушение взаимоотношений между эндотелиоцитами и базальной мембраной за счет деструкции и отека.

В части сосудов было выявлено отслоение эндотелиоцитов в просвет сосуда и разрушение их стенки. Часто в сосудах отмечались явления «иммунного прилипания» эритроцитов и тромбоцитов к плазмолеммам эндотелиоцитов и адгезии эритроцитов между собой – сладж-эффект, кроме того наблюдались выраженные десквамация и очаговые некрозы эндотелия со слабо выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Наряду с этим отмечались зоны, находящиеся в состоянии реэндотелизации, где на границе участка повреждения обнаруживается распластывание краевых эндотелиоцитов с формированием у них структурированной ламеллоплазмы.

Помимо этого прослеживались различные стадии вступления клеток в апоптотическое состояние. Апоптоз представляет собой физиологическую гибель клеток, необходимую для обновления клеточного пула, дифференцировки и развития органа [5, 10, 13]. В неповрежденной ткани апоптоз находится под строгим генетическим контролем белка bcl-2, который блокирует митохондриальный путь запуска апоптоза. Репрессия гена Bcl-2, повышает экспрессию генов, продукты которых вызывают оксидативный стресс и активацию киллерных рецепторов. В результате клетка задерживается в определенных точках клеточного цикла для возможной репарации повреждения или, при отсутствии таковой, подвергается апоптозу вследствие нарушения проницаемости митохондриальной и ядерной мембран. Такие агенты, как ионы кальция, факторы воспаления, свободные радикалы и оксид азота могут также «включать» гены, инициирующие апоптоз [4, 7].

Апоптотические изменения на нашем материале сопровождалось мелкоглыбчатым распадом ядер клеток, окруженных мембраной, сморщиванием органелл, разрушением внутренних мембран набухших митохондрий, плазмоллизом цитоплазмы и фрагментацией клеточного содержимого на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. В ультраструктуре других клеток отмечалось появление пикнотических ядер, ядер с кариорексисом и кариолизисом, резко выраженным микроплазматозом. При этом, если в цитоплазме эпителиальных клеток канальцев почки экспрессию маркера bcl-2 можно было оценить как умеренную и даже выраженную (+++), в интимах сосудов почки, эндотелиоцитах капилляров клубочков она была негативной (-), что расценивалось нами как проявление оксидативного стресса и неспособности к восстановлению

целостности эндотелиального пласта. Кроме того, позитивная реакция с МКАТ к bcl-2 была обнаружена в лимфоцитах воспалительного инфильтрата интерстиция и в единичных межэпителиальных лимфоцитах.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), биологически активная субстанция, способная запускать сигнальный каскад, стимулирующий рост и пролиферацию эндотелиальных клеток сосуда. После образования новых сосудов, VEGF выступает фактором выживаемости через подавление апоптоза эндотелиоцитов. Уровень экспрессии VEGF в структурах стенок сосудов почек демонстрировал сходную картину: фактор роста эндотелия либо не выявлялся вовсе, либо показывал слабую (+), и в единичных случаях, умеренную (++) иммунную реакцию.

Морфологическим выражением иммунного ответа при хронической патологии почек является инфильтрация стромы лимфоцитами, плазматическими клетками, тучными клетками и макрофагами, миграцией лимфоцитов в эпителий с формированием лимфоэпителиальных контактов [3]. На нашем материале клеточность воспалительного инфильтрата носила умеренный и выраженный характер – от 4-8 до 10-12 мононуклеара в поле зрения при увеличении на 400. В части наблюдений преобладали клетки лимфоидного ряда, демонстрировавшие CD3+ статус. При равных размерах, форма ядер лимфоцитов была округлой, почкообразной, бобовидной. Отмечались выраженные единичные ядерные инвагинации. Хроматин грубо конденсирован по периферии ядра. Ядрышки, как правило, были расположены центрально. Лимфоциты контактировали с эпителием почечных канальцев в виде цитоплазматических отростков, взаимодействующих с эпителиальными клетками в определенных точках или же вклиниваясь вглубь их цитоплазмы. Цитолемма некоторых отростков была распльвчатой.

В некоторых случаях в интерстиции было отмечено большое количество плазматических CD38+ клеток. Уровень экспрессии CD38 молекул является маркером пролиферативной активности клеток иммунной системы, отражает способность к хематтракции [11], их дефицит ассоциирован с восприимчивостью к бактериальным инфекциям и отражает уровень иммуносупрессии [6, 8, 9]. Форма и размеры плазматоцитов варьировали. Многие из них демонстрировали секрецию по голокриновому типу и в них наблюдался клазматоз, что является морфологическим отражением активности гуморального иммунитета.

CD20+ лимфоциты, CD68+ макрофаги и тучные клетки, а также плазматоциты в строме почек обнаруживались как свободно, так и в просвете и периваскулярном пространстве сосудов. В последних выявлены ультраструктурные изменения в виде выраженного пиноцитоза, отека цитоплазмы, наличия трансэндотелиальных щелей и образования в данных сосудах многослойной базальной мембраны, что указывает на повышенную проницаемость эндотелия микрососудов.

Большинство лимфоцитов в клеточном инфильтрате имели признаки апоптотических клеток. Ядра приобретали лопастной вид, с последующим их

коллапсом и фрагментацией. В клетках обнаруживалась маргинация хроматина в виде полусфер или глыбок.

В основных стволах коронарных артерий и в крупных их ветвях обнаруживались признаки спазма и эндотелиальной дисфункции. Их стигмами являлись: «частокольное» расположение эндотелия, фестончатость контуров просвета артерий, с ущемлением втянутых в них гладкомышечных волокон срединной оболочки сосуда, плазматическое пропитывание стенок сосудов тромбообразование. В мелких ветвях – сужение просвета артерий, отслоение эндотелия; иногда под ним обнаруживались эритроциты или скопления плазмы. Реакция с маркером эндотелиальных клеток в интима коронарных артерий была слабой, неравномерной, местами комковатой, с обнажением широких межклеточных соединений.

Клеточная инфильтрация как стенок артерий, так и стромы миокарда была крайне скудной. В миокарде позитивно окрашенные клетки располагались поодиночке в интерстиции, перимизии, иногда периваскулярно и показывали плазмоклеточную дифференцировку (CD38+). В интима коронарных артерий и их ветвей воспалительный инфильтрат выявлялся в зонах отека, деструкции стенки сосуда, причем в нем преобладали CD68+ гранулоциты – макрофаги и тучные клетки.

Во внутренней оболочке аорты четко визуализировались эндотелий, подэндотелиальный слой, сплетение эластических волокон. Эндотелий состоял из крупных плоских одноядерных, реже многоядерных, полигональных клеток, расположенных на базальной мембране. Обнаруживались участки укрупнения сосудистых клеток, очажки десквамации. Подэндотелиальный слой был хорошо развит, образован рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью, которая содержала тонкие коллагеновые и эластические волокна, много аморфного вещества и малодифференцированных клеток типа гладкомышечных фибробластов, макрофагов. В подавляющем большинстве случаев в нем наблюдались участки отека, разволокнения, отложения холестерина и жирных кислот. Реакция клеток эндотелия с CD31 была достаточно выраженной, выявлялась практически в каждой клетке, которые отличались разными размерами и формой, образовывали выпячивания и углубления и демонстрировали расширенные межклеточные контакты. Число воспалительных клеточных элементов в стенке аорты было немногочисленным, качественный состав инфильтрата, его расположение было аналогичным интима коронарных артерий.

Апоптотические тельца в клетках интима коронарных артерий и аорты не выявлялись, поэтому судить о характере апоптоза можно было лишь косвенно по реакции с фактором роста эндотелия сосудов и bcl-2. Особенности реакции с фактором роста эндотелия напоминали таковую в артериолах и крупных сосудах почек – экспрессия маркера была умеренной, в отдельных сосудах слабой, выявлялась в виде нежных гранул, глыбок в клетках эндотелия, фибробластах, макрофагах. Белок антиапоптоза bcl-2 в данных структурах не выявлялся.

Выводы. Проведенные морфологические исследования эндотелия сосудов почек, сердца и аорты у пациентов с ХБП показали, что в большинстве своем интима сосудов претерпевала глубокие патологические изменения, проявляющиеся разной степенью дезорганизации эндотелиальной выстилки сосуда и нарушениями структурно-функциональной организации эндотелиоцитов, субэндотелиального слоя, базальной мембраны. Эти патологические процессы во всех наблюдениях имели сходные черты с развитием иммунного воспаления. В клеточном составе инфильтратов преобладали макрофаги, тучные клетки, плазматические клетки, биологические медиаторы которых, в свою очередь, способны усугублять повреждения эндотелиальных клеток. Косвенным признаком низкой способности к восстановлению структуры стенки сосудов и эндотелиальной выстилки может служить слабая экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF и bcl-2, т. к. в условиях их недостатка создаются предпосылки к активации апоптоза.

Перспективы дальнейших исследований. По современным представлениям в патогенезе сосудистых поражений при ХБП решающую роль играет воспаление, которое является следствием ответной реакции эндотелия на повреждающее действие атерогенных факторов. Атерогенные факторы индуцируют апоптоз эндотелиоцитов, в результате которого увеличивается проницаемость сосудистой стенки, что запускает каскадный механизм с участием вазомоторной, гемостатической, адгезионной, ангиогенной составляющих. Перспективное изучение типовых форм эндотелиальной дисфункции, с определением уровня применяемых нами антител как в тканях, так и в сыворотке крови, позволит более детально выяснить специфику клеточных и гуморальных противовоспалительных и антиапоптотических механизмов, направленных на снижение риска повреждения стенок сосудов сердца, аорты при заболевании почек.

Литература

1. Колесник М. О. Кардіоваскулярні ускладнення у хворих на хронічну хворобу нирок / [М. О. Колесник, І. І. Лапчинська, В. К. Ташук та ін.]. – Київ, 2010. – 224 с.
2. Синяченко О. В. Роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе мезангиальных гломерулонефритов / О. В. Синяченко, С. В. Зяблицев, П. А. Чернобривцев // Укр. журнал нефрології та діалізу. – 2007. – №2 (14). – С. 36-38.
3. Buske-Kirschbaum A. Altered distribution of leukocyte subsets and cytokine production in response to acute psychosocial stress in patients with psoriasis vulgaris / A. Buske-Kirschbaum, S. Kern, M. Ebrecht, D. H. Hellhammer // Brain Behav. Immun. – 2007. – Vol. 21, № 1. – P. 92–99
4. Chung E. Y. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells / E. Y. Chung, S. J. Kim, X. J. Ma // Cell Research. – 2006. – Vol. 16. – P. 154–161.

5. Filchenkov A. A. The caspase: regulators of apoptosis and other cellular functions / A. A. Filchenkov // *Biochemistry*. – 2003. – № 68. – P. 453–466.
6. Manjarrez-Orduco N. CD38 cross-linking enhances TLR-induced B cell proliferation but decreases IgM plasma cell differentiation / N. Manjarrez-Orduco, M. E. Moreno-Garcna, K. Fink, L. Santos-Argumedo // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 37, № 2. – P. 358–567.
7. Matveeva N. U. Role of nitric oxide in the apoptosis of retinal neurons human fetuses / N. U. Matveeva, S. G. Kalinichenko, I. I. Pushin, P. A. Motavkin // *Morphology*. – 2006. – Vol. 123, № 1. – P. 40–49.
8. Menges P. Surgical trauma and postoperative immune dysfunction / P. Menges, W. Kessler, C. Kloecker [et al.] // *Eur. Surg. Res.* – 2012. – Vol. 48, № 4. – P. 180–186.
9. Moreno-Garcna M. E. CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)-gamma 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade / M. E. Moreno-Garcna, L. N. Lyppez-Bojyrques, A. Zentella [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174, № 5. – P. 2687–2695.
10. Palcev M. A. The molecular basis of apoptosis / M. A. Palcev // *Journal of RAMS*. – 2002. – Vol. 72, № 1. – P. 13–21.
11. Sandoval-Montes C. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines / C. Sandoval-Montes, L. Santos-Argumedo // *J. Leukoc. Biol.* – 2005. – Vol. 77, № 4. – P. 513–521.
12. Yamamoto S. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction / S. Yamamoto, Valentina Kon // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2009. – Vol. 18 (3). – P. 181–188.
13. Yarilin A. A. The apoptosis. The nature of the phenomenon and its role in the whole organism / A. A. Yarilin // *Pathological physiology*. – 1998. – № 2. – P. 38–48.

УДК 616. 611-002-091. 8-018. 74

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЕНДОТЕЛІЮ СУДИН НИРОК, СЕРЦЯ І АОРТИ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ХВОРОБІ НИРОК

Данилюк С. В.

Резюме. Проведено морфологічне дослідження аутопсійного матеріалу пацієнтів з клініко-анамнестичними ознаками судинної патології серця, головного мозку і хронічного гломеруло- і пієлонефриту. В інтимі судин нірок, коронарних артерій і аорти виявлені порушення структурно-функціональної організації ендотеліоцитів, субендотеліального шару, базальної мембрани з розвитком імунного запалення, здатним посилювати пошкодження ендотеліальних клітин. Непрямою ознакою низької здатності до відновлення структури стінки судин і ендотеліальної вистилки може служити слабка експресія фактора росту ендотелію судин VEGF і bcl-2.

Ключові слова: хронічна хвороба нірок, імунні маркери ушкодження ендотелію.

УДК 616. 611-002-091. 8-018. 74

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ПОЧЕК, СЕРДЦА И АОРТЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Данилюк С. В.

Резюме. Проведено морфологическое исследование аутопсийного материала пациентов с клинико-анамнестическими признаками сосудистой патологии сердца, головного мозга и хронического гломеруло- и пиелонефрита. В интимае сосудов почек, коронарных артерий и аорты обнаружены нарушения структурно-функциональной организации эндотелиоцитов, субэндотелиального слоя, базальной мембраны с развитием иммунного воспаления, способным усугублять повреждение эндотелиальных клеток. Косвенным признаком низкой способности к восстановлению структуры стенки сосудов и эндотелиальной выстилки может служить слабая экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF и bcl-2.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, иммунные маркеры повреждения эндотелия.

UDC 616. 611-002-091. 8-018. 74

Morphological Changes in the Vascular Endothelium of the Kidneys, Heart and Aorta in Patients with Chronic Kidney Disease

Danilyuk S.

Abstract. A morphological study of autopsy material of patients with clinical and anamnestic signs of vascular disease of the heart, brain and chronic glomerulonephritis and pyelonephritis. In the intima of renal vessels, coronary arteries and aorta were found violations of the structural and functional organization of endothelial cells, subendothelial layer of the basement membrane to the development of immune inflammation that can exacerbate damage to the endothelial cells. An indirect indication of the low resilience of the wall structure of the endothelial lining of blood vessels and may serve as a weak expression of vascular endothelial growth factor VEGF and bcl-2.

In recent decades, both in Ukraine and worldwide on the rise patients with chronic inflammatory diseases of the kidney develop vascular pathologies. Full activity of endothelium provides a balance between running their multi-directional functions: generation of pro- and anti-inflammatory factors, vasodilating and vasoconstrictive substances pro- and antiplatelet agents, pro- and anticoagulants, pro- and antifibrinolytics, proliferation factors and growth inhibitors. Under physiological conditions prevail vasodilatation, the synthesis of inhibitors of aggregation, coagulation and fibrinolysis activators, anti-adhesion substances. Dysfunction of vascular cells breaks this balance and predisposes the vessels to vasoconstriction, leukocyte adhesion, platelet activation, mitogenesis, inflammation. Features of immune responses in the walls of blood vessels and characterizing their morphological changes, including endothelial function, in the presence of patients with chronic kidney disease (CKD) are not sufficiently explored. Therefore, the aim of the study was to

investigate the morphological characteristics and immune responses in the blood vessels of the kidneys, heart, aorta in patients with CKD. A morphological study of autopsy material of patients aged 45 to 55 years who were observed for 5-7 years in a hospital cardiology and neurological diagnosed with coronary heart disease and had clinicoanamnesic signs of chronic glomerulonephritis and pyelonephritis.

The tissue samples of kidney, heart and aorta were fixed in 10% formalin solution for 24 hours, embedded in paraffin, sections were stained with hematoxylin and eosin.

To identify the features of immune cell responses in the areas of inflammation used primary monoclonal antibody from DAKO (Denmark), Ready-to-Use. Immunohistochemistry revealed expression of T- and B-cell clusters of differentiation (CD3, CD20), a marker of plasma cells (CD38), macrophage marker (CD68). Features endothelialisation vascular intimal studied for expression of endothelial cell markers (CD31 JC 70A), to tendenshion vascularisation was assessed by vascular endothelial growth factor (VEGF (VG1)). As a marker of apoptosis bcl-2 was used (124). Material for the study by immunohistochemistry were fixed with 10% neutral formalin for 24 hours, embedded in paraffin, sectioned, a thickness of 4 mm which was applied to a highly adhesive Super Frost glass and dried at 37 ° C for 18 hours. Unmasks the heat treatment was performed according to the method of slices boiling in citrate buffer (pH 6. 0). To visualize the primary antibody detection system used UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific). As used chromogen DAB (diaminobenzidine).

Morphological study of vascular endothelial kidney, heart and aorta in patients with CKD showed that most of the intima of vessels undergoing profound pathological changes manifested varying degrees of disruption of the endothelial lining of the vessel, and violations of the structural and functional organization of endothelial cells, subendothelial layer of the basement membrane. These pathological processes in all cases had similarities with the development of immune inflammation. In cellular infiltrate predominated composition macrophages, mast cells, plasma cells, biological mediators that, in turn, can exacerbate damage to endothelial cells. An indirect indication of the low resilience of the wall structure of the endothelial lining of blood vessels and may serve as a weak expression of vascular endothelial growth factor VEGF and bcl-2, as in terms of their lack of paved the way for the activation of apoptosis.

Keywords: chronic kidney disease, immune markers of endothelial damage.

*Рецензент – проф. Гасюк А. П.
Стаття надійшла 25. 03. 2015 р.*