

УДК 616.61-008.64-091-092;651.35:577.112.85

**Заморський І. І., Унгурян Т. М.**

## **МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ НИРОК ЗА УМОВ ЇХ ГОСТРОГО ПОШКОДЖЕННЯ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ**

ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

*Гостре пошкодження нирок є причиною понад 40% випадків смертності внаслідок рабдоміолізу. Церулоплазмін є антиоксидантом плазми крові, запобігає пошкодженню клітинних мембран, зменшує ендогенну інтоксикацію та розвиток поліорганної недостатності при різних патологічних процесах. Метою роботи було вивчення морфологічних змін нирок в умовах експериментального гострого пошкодження нирок на тлі введення церулоплазміну. Дослідження проводили на 40 нелінійних білих щурах. Гостре пошкодження нирок моделювали внутрішньом'язовим введенням 50% гліцерину (8 мл / кг). Церулоплазмін (7 мг / кг, «Біофарма», Україна) застосовували через 40 хв після введення гліцеролу. Забір матеріалу проводили на 24 год. і 72 год. гострого пошкодження нирок. Патологічні процеси були задокументовані за допомогою комп'ютерної морфометрії об'єктів в гістологічних препаратах. Патологічні зміни в тканині нирок в умовах рабдоміолізу є значними, про що свідчить гідропічна дистрофія і коагуляційний некроз нирок, обструкція міоглобіновими циліндрами. Під дією церулоплазміну спостерігалось зменшення некротичних процесів, дистрофії та обструкції просвіту канальців міоглобіном. Церулоплазмін сприяє захисту нефроцитів і зменшує дегенеративні та некротичні процеси в нирках за умов рабдоміолізу.*

Ключові слова: рабдоміоліз, гостре пошкодження нирок, морфологічні зміни, антиоксидант, церулоплазмін.

*Дослідження є фрагментом планової міжкафедральної науково-дослідної роботи ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» «Дизрегуляторні порушення нейроімуноендокринних взаємовідносин та шляхи їх корекції» (№ держреєстрації 0114U002469).*

### **Вступ**

Незважаючи на удосконалення медичних технологій, стадія недостатності при гострому пошкодженні нирок (ГПН) розвивається у 5% госпіталізованих пацієнтів, у відділеннях інтенсивної терапії їх частка складає 10–23%. Розвиток ГПН збільшує летальність в 6–8 разів. Якщо ГПН входить до складу поліорганної недостатності, то летальність сягає 85–95% [1]. Прогноз обумовлений як тяжкістю основного захворювання, так і клінічною ситуацією. За умов гострого канальцевого некрозу, зумовленого хірургічним втручанням або травмою, летальність становить 60%, як ускладнення медикаментозного лікування — 30%, при вагітності — 10–15%. Смерть при ГПН найчастіше настає від уремічної коми, порушень гемодинаміки, сепсису [1].

На долю ГПН внаслідок рабдоміолізу припадає понад 40% смертності від ГПН [2]. Рабдоміоліз є складним патологічним станом, який зумовлений швидким розчавленням ушкоджених м'язів, що призводить до безпосереднього вивільнення внутрішньоклітинних компонентів м'язових клітин, включаючи міоглобін, креатинкіназу, альдолазу, лактатдегідрогеназу, електроліти в кров'яне русло і позаклітинний простір. Найчастіше рабдоміоліз викликаний прямим травматичним пошкодженням, проте також може виникати в результаті дії ліків, алкоголю, наркотиків, токсинів, інфекцій, ішемії м'язів, електролітичних та метаболічних розладів, генетичних порушень, навантаження або тривалого ліжкового режиму, судом та злосудної гіпертермії [3,4].

Одним з провідних механізмів, що лежить в основі патогенезу рабдоміолізу та ГПН, є оксидативний стрес [5,6]. Дисфункція мітохондрій, пригнічення лізосомальної гідролази, фосфолі-

підне пошкодження та підвищена внутрішньоклітинна концентрація кальцію призводять до утворення активних форм кисню, що посилює ушкодження нефроцитів за умов ГПН [5,7]. У зв'язку з цим, нашу увагу привернув антиоксидант плазми крові церулоплазмін (ЦП). Здатність ЦП пригнічувати вільнорадикальні реакції пов'язують із фероксидазною та супероксиддисмутаазною активністю [8]. Знешкоджуючи вільні радикали та інші шкідливі продукти метаболізму, ЦП попереджує пошкодження клітинних мембран, зменшує ендогенну інтоксикацію та запобігає розвитку поліорганної недостатності при різних патологічних процесах в організмі [9]. У літературі описані мембранопротекторні властивості, зокрема ЦП попереджує лізис еритроцитів індукованими іонами перехідних металів [8]. Крім того, цей білок відіграє важливу роль в метаболізмі заліза і транспорті міді, стимулює кровотворення та функціонування імунної системи [9].

### **Мета роботи**

Вивчення морфологічних змін у тканині нирок за умов рабдоміолітичної моделі ГПН на тлі введення церулоплазміну.

### **Матеріал та методи дослідження**

Досліди проводили на білих статевозрілих щурах масою 160–240 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Тварин було розподілено на 5 груп (n=8): I група — інтактні тварини, II і IV групи — тварини з гліцероловою моделлю ГПН, забій на 24 і 72 год відповідно; тваринам III групи через 30 хв після моделювання ГПН одноразово вводили церулоплазмін в дозі 7 мг/кг, V група — тваринам після моделювання ГПН протягом трьох днів вводили церулоплазмін у вказаній вище дозі, забій тварин на 72 год ГПН. Для

досліджень використовували рабдоміолітичну модель ГПН, яку моделювали внутрішньом'язовим введенням 50 % розчину гліцеролу в дозі 8 мг/кг [2,10]. Для дослідження використовували препарат церулоплазміну «Біоцерулін» виробництва «Біофарма», Україна. Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) та положень директиви Європейського союзу 2010/63/EU.

Після забору матеріалу для мікроскопічних досліджень тканину нирок фіксували впродовж 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, зневоднювали у спиртах висхідної концентрації та заливали у парафін при температурі 58°C. Для морфологічного оцінювання гістологічні зрізи виготовляли завтовшки 5 мкм, забарвлюючи гематоксиліном і еозином. З метою об'єктивізації та підвищення відтворюваності результатів кількісних досліджень проводили комп'ютерну морфометрію об'єктів у гістологічних препаратах. Цифрові копії оптичного зображення мікропрепаратів отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus (модель C740UZ) та мікроскопа ЛЮМAM-P8 та аналізували у середовищі комп'ютерної програми "ВідеоТест – Розмер 5.0" (ТОВ «Відеотест», РФ).

### Результати дослідження та їх обговорення

Для морфологічної структури нирок інтактних тварин характерно: помірне наповнення кров'ю судин, чіткі контури клубочків та просвіту каналців нирок, відсутність змін каналцевого епітелію, крововиливів та патологічних включень.

Дослідження мікропрепаратів нирок тварин, яким моделювали рабдоміолітичне ГПН, як і очікували, виявило значні зміни в гістоструктурі нирок (рис. 1). Просвіт ниркових каналців заповнений клітинним детритом, базальні мембрани оголені, що свідчить про некроз епітеліоцитів. Обтурація міоглобіновими циліндрами становила  $18 \pm 0,8\%$  каналців. У  $99 \pm 0,3\%$  епітеліоцитів звивистих каналців спостерігались ознаки гідропічної дистрофії,  $2,6 \pm 0,3\%$  епітеліоцитів знаходились у стані коагуляційного некрозу з ущільненням цитоплазми та каріопікнозом. Дистрофія епітеліоцитів вивідних трубочок становила  $97 \pm 0,2\%$ .

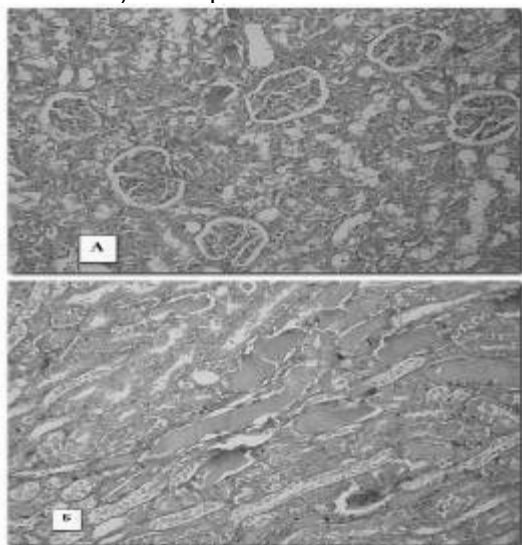


Рис. 1. Препарат нирки щура на 24 год розвитку ГПН: А – кіркова речовина; В – мозкова речовина. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

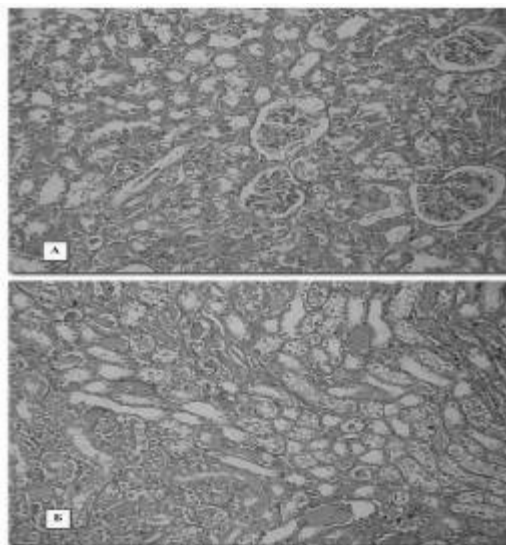


Рис. 2. Препарат нирки щура на 24 год розвитку ГПН на фоні введення церулоплазміну: А – кіркова речовина; В – мозкова речовина.

На 24 год розвитку ГПН гістологічна структура тканини нирок на фоні введення ЦП зазнала менших змін порівняно із тканиною нирок тварин із групи модельної патології. Уведення ЦП сприяло зменшенню дистрофічних процесів та покращенню гістологічної структури нирок, на що вказували відсутність патологічних змін ниркових клубочків, зменшення дистрофії епітеліоцитів звивистих каналців кіркової речовини до  $92 \pm 0,23\%$  та епітеліоцитів вивідних трубочок мозкової речовини до  $91 \pm 0,18\%$ , обтурація міоглобіновими циліндрами спостерігалася у  $11 \pm 0,26\%$

ниркових каналцях (рис. 2).

Дослідження тканини нирок на 72 год розвитку ГПН виявило значні порушення в гістоструктурі нирок піддослідних тварин (рис. 3). Виявлено збільшення клубочків у розмірах, відтиснення судин на периферію клубочка, а інтракапсулярний простір розширений і заповнений прозорою рідиною. Також спостерігається розширення судин та лімфоцитарна вогнищева інфільтрація інтерстиціальної тканини. Базальні мембрани каналців повністю оголені, в просвіті - клітинний детрит, ознака коагуляційного некрозу, а також

значна дилатація каналців та велика кількість циліндрів.

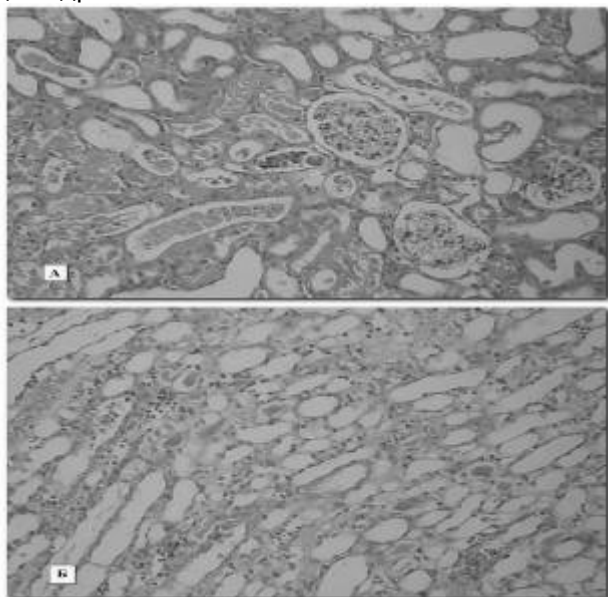


Рис. 3. Препарат нирки щура на 72 год розвитку ГПН: А – кіркова речовина; В – мозкова речовина. Забарвлення гематоксилином і еозином.

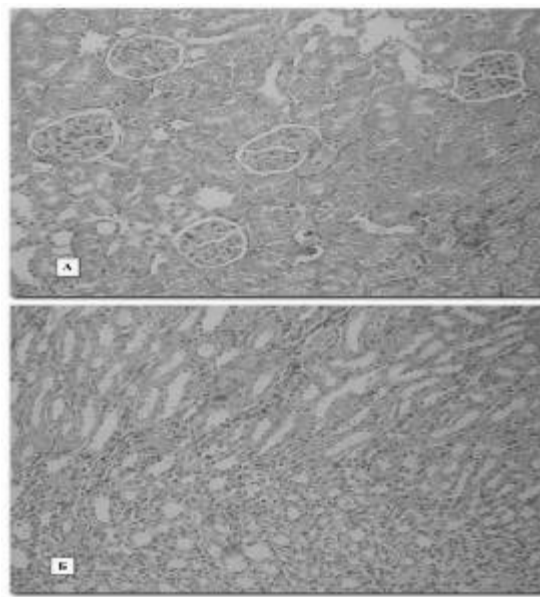


Рис. 4. Препарат нирки щура на 72 год розвитку ГПН на фоні введення церулоплазміну: А – кіркова речовина; В – мозкова речовина.

На 72 год розвитку ГПН виявлені морфологічні зміни в тканині нирок на тлі церулоплазміну були незначними (рис. 4).

Клубочки нефронів нормального розміру та структури, відсутнє розширення інтракапсулярного простору. Канальці нирок мають чіткі контури та їх просвіт звичайного діаметру. Відсутній клітинний детрит та дилатація, які характерні для гістологічної структури нирок тварин з ГПН [2,11,12]. Спостерігається незначна кількість циліндрів  $0,5 \pm 0,2\%$  та дистрофія близько  $5 \pm 0,3\%$  епітеліоцитів каналців.

### Висновки

1. Морфологічне дослідження нирок щурів вказує на глибокі пошкодження кіркової та мозкової тканин при рабдоміолітичній моделі гострого пошкодження нирок, яке проявляється дистрофічними та некротичними змінами.

2. За даними мікроскопічного аналізу гістологічної структури тканин нирок, церулоплазмін сприяє захисту нефроцитів і зменшує дистрофічні та некротичні процеси у тканині нирок за умов рабдоміолізу.

### Перспективи подальших досліджень

Виявлені зміни гістологічної структури нирок за умов рабдоміолізу на тлі церулоплазміну вказують на доцільність подальшого клінічного дослідження ефективності застосування препаратів церулоплазміну при лікуванні гострого пошкодження нирок.

### Література

1. Думанский Ю.В. Острая почечная недостаточность / Ю.В. Думанский, Н.В. Кабанова, И.Е. Верхулецкий [и др.] // Медицина неотложных состояний. – 2012. – Т. 46–47, № 7–8. – С. 174–183.
2. Мазуркевич А.И. Морфофункциональные изменения тканин нирок лабораторных животных при экспериментальной глицероловой модели острой почечной недостаточности / А. И. Мазуркевич, О. Л. Бобось, Я. К. Сердюков, М. О. Малюк // Научный вестник Национального университета биоресурсов и природокористування України. – 2012. – Т. 172, № 4. – С. 117–122.
3. Torres P.A. Rhabdomyolysis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment / P.A. Torres, J.A. Helmstetter, A.M. Kaye, A. David // The Ochsner Journal. – 2015. – No. 15. – С. 58–69.
4. Khan F.Y. Rhabdomyolysis: a review of the literature / F.Y. Khan // The Netherlands journal of medicine. – 2009. – V. 67, N 9. – P. 272–283.
5. Honore P.M. Oxidative stress markers and septic acute kidney injury: Novel research avenue or road to nowhere? / P.M. Honore, H.D. Spapen // Annals of Intensive Care. – 2016. – V. 6, N 100. – P. 1–2.
6. Wangko S. Rabdomiolisis / S. Wangko // Jurnal Biomedik (JBM). – 2013. – V. 5, No. 3. – P. 157–164.
7. Hosohata K. Role of oxidative stress in drug-induced kidney injury / K. Hosohata // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – No. 17. – P. 1–10.
8. Kotrikadze N. Protective function of ceruloplasmin and its action on erythrocytes in men with prostate tumors / N. Kotrikadze, M. Zibzibadze, L. Ramishvili [et al.] // European Medical, Health and Pharmaceutical Journal. – 2011. – No. 2. – P. 1–3.
9. Домбровский Я.А. Коррекция анемии и интоксикации препаратами церулоплазмينا у пациентов с хронической болезнью почек / Я.А. Домбровский, М.Д. Иванова // Почка. – 2014. – Т. 1, № 7. С. 71–73.
10. Drachuk V.M. Morphological changes of kidney tissue when using glutathione at rhabdomyolytic acute kidney injury / V.M. Drachuk, I.I. Zamorskiy, O.M. Horoshko // German science herald. – 2016. – N 4. – P. 34–37.
11. Goroshko O.M. Influence of antioxidants on the morphological changes in kidneys at experimental acute injury / O.M. Goroshko, I.I. Zamorskiy, V.M. Drachuk // German Science Herald. – 2016. – No. 3. – С. 20–23.
12. Zamorskiy I.I. Renoprotective Effects of Statins under the Conditions / I.I. Zamorskiy, V.G. Zeleniuk // Biophysics. – 2014. – V. 59, No. 5. – P. 837–840.

**Реферат**

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ ИХ ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА  
Заморский И. И., Унгурян Т. М.

Ключевые слова: рабдомиолиз, острое повреждение почек, морфологические изменения, антиоксидант, церулоплазмин.

Острое повреждение почек является причиной более 40% случаев летальности вследствие рабдомиолиза. Церулоплазмин является антиоксидантом плазмы крови, предотвращает повреждение клеточных мембран, уменьшает эндогенную интоксикацию и развитие полиорганной недостаточности при различных патологических процессах. Цель работы - изучить морфологические изменения почек в условиях экспериментального острого повреждения почек на фоне введения церулоплазмина. Исследование проводилось на 40 нелинейных белых крысах. Острое повреждение почек индуцировали внутримышечной инъекцией 50% глицерина (8 мл/кг). Церулоплазмин (7 мг/кг, «Биофарма», Украина) применяли через 40 мин после введения глицерина. Забор материала проводили на 24 ч и 72 ч моделирования острого повреждения почек. Патологические процессы были задокументированы компьютерной морфометрией объектов в гистологических препаратах. Патологические изменения в ткани почек в условиях рабдомиолиза проявляются гидропической дистрофией и коагуляционным некрозом почек, обструкцией миоглобиновыми цилиндрами. Церулоплазмин способствовал уменьшению обструкции канальцев почек миоглобином, ограничивал некротические и дистрофические процессы. Церулоплазмин способствует защите нефроцитов и уменьшает дегенеративные и некротические процессы в почечной ткани в условиях рабдомиолиза.

**Summary**

MORPHOLOGICAL CHANGES IN KIDNEYS UNDER ACUTE RENAL INJURY AGAINST CERULOPLASMIN ADMINISTRATION

Zamorskii I. I., Ungurian T. M.

Key words: rhabdomyolysis, acute renal injury, morphological changes, antioxidant, ceruloplasmin.

The acute renal injury is the cause of more than 40% cases of mortality due to rhabdomyolysis. Ceruloplasmin is an antioxidant of blood plasma, which prevents the damage of cell membranes, reduces endogenous intoxication and prevents the development of multiple organ failure in various pathological processes. This enables us to hypothesize the renoprotective potential of ceruloplasmin under the conditions of acute renal injury. This work aims at studying morphological changes in the renal tissue under the conditions of the model of acute kidney injury due to rhabdomyolysis against ceruloplasmin introduction. The study was conducted on 40 non-linear male rats. Acute kidney injury was induced by intramuscular injection of 50% glycerol (8 ml/kg). Ceruloplasmin (7 mg/kg, "Biopharma", Ukraine) was injected 40 min following the glycerol administration. In 24 h and 72 h after the modelling of acute renal damage, kidney samples were taken. The pathological processes were documented by the computer morphometry of objects in histological specimens. The pathological changes in kidney tissue due to rhabdomyolysis were significant. They are manifested by hydropic dystrophy ( $99\pm 0.3\%$ ) and coagulative necrosis of the renal cells, tubular obstruction with myoglobin casts ( $18\pm 0.8\%$  of the tubules). Ceruloplasmin contributed to the significant decrease in histopathological changes in kidney tissue under rhabdomyolytic kidney injury. There was a significant reduction in the luminal obstruction by myoglobin casts ( $0.5\pm 0.2\%$  of tubules), as well as restriction in the necrotic processes and dystrophy ( $5\pm 0.3\%$  of tubular cells). Ceruloplasmin promotes the protection of nephrocytes and reduces the degenerative and necrotic processes in the renal tissue under the conditions of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury.