

Роль микроциркуляторных нарушений в уремическом поражении легких у крыс с экспериментальной моделью хронической почечной недостаточности

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.

И. П. Павлова;

² Амурская государственная медицинская академия, Благовещенск.

e-mail: scherbann@mail.ru

Реферат

Представлены результаты морфологического исследования бронхолегочной системы крыс с экспериментальной моделью хронической почечной недостаточности. Выявлено негативное воздействие микрогемоциркуляторного дисбаланса на состояние респираторной системы при уремии. Изучены некоторые аспекты патологического влияния нарушенной легочной микроциркуляции на формирование фибротических процессов в интерстициальной ткани легких при ХПН.

Ключевые слова: респираторная система, микрогемоциркуляция, хроническая почечная недостаточность, пневмофиброз.

Shcherban N. A.¹, Landyshev Y. S.², Tseluyko S. S.²

The role of microcirculatory disturbances in a uremic lesion of lungs at rats with experimental model of chronic renal insufficiency

¹ Saint-Petersburg State Pavlov Medical University;

² The Amur state medical academy, Blagoveschensk.

e-mail: scherbann@mail.ru

Abstract

The results of morphological research of bronchial tubes and lungs of rats with experimental model of chronic renal insufficiency are presented. Negative influence of microcirculation disbalance on a condition of respiratory system at uremia is taped. Some aspects of pathological influence of broken pulmonary microcirculation in formation of fibrosis processes at an interstitial tissue of lungs at chronic renal insufficiency are studied.

Keywords: respiratory system, chronic renal insufficiency, fibrosis of lung, pulmonary microcirculation.

Введение

Патология легких при хронической почечной недостаточности (ХПН) представлена тремя основными типами: 1) отеком легких 2) инфекционными осложнениями 3) специфическим поражением легочной ткани [5].

Основными причинами отека легких при ХПН являются гиперволемия, в результате перегрузки правого и левого предсердия объемом крови; гипопроteinемия, в связи со снижением онкотического давления плазмы; сердечная недостаточность, вследствие повреждающего действия уремических токсинов на миокард [2]. Инфекционная патология чаще всего встречается у больных с тяжелыми проявлениями нефротического синдрома, которая представлена преимущественно пневмониями и является исходом отека легких [4].

Однако по результатам патологоанатомических исследований, у 60–100% больных ХПН встречалось поражение легких той или иной степени выражен-

ности при отсутствии клинических проявлений легочной патологии до наступления летального исхода [1, 9].

Механизм формирования фиброзных изменений в легких при ХПН остается недостаточно изученным. Рядом авторов высказывалось предположение об иницирующей роли метастатического кальциноза, развивающегося вследствие метаболических нарушений и встречающегося приблизительно у 80% больных на программном гемодиализе в развитии фибротических процессов в легких [8]. Однако было выявлено, что пневмофиброз встречается у пациентов, не имеющих кальцинатов в легочной ткани, а также у больных в додиализном периоде заболевания [14].

В качестве другой причины, способной привести к развитию фиброзных изменений в интерстициальной ткани легких у больных ХПН рассматривался персистирующий альвеолярный выпот, обогащенный

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

белком, способный при неполной его абсорбции организовываться в соединительную ткань [6]. В настоящее время доказано, что фиброзные процессы в легких обнаруживаются у пациентов с ХПН, имевших латентное течение почечной патологии, не сопровождавшейся гипопроотеинемическим состоянием [13].

В последнее десятилетие активно обсуждается вопрос о роли эндотелиальной дисфункции и микрогемодициркуляторных нарушений в прогрессировании почечной недостаточности. Одним из инициаторов этих процессов является ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС), профибротическое действие которой рассматривают с двусторонних позиций: во-первых, благодаря способности ангиотензина II (АТ II) стимулировать синтез моноцитарного хемоаттрактивного протеина-1, во-вторых, его возможности увеличивать выработку таких биологически активных веществ, как трансформирующего фактора роста- β (TGF- β 1) и ингибитора активации плазминогена-1 [10, 12]. В ряде экспериментальных исследований было показано, что АТ II за счет этих механизмов может активно участвовать в воспалительных реакциях, способствуя миграции мононуклеаров в интерстициальную ткань с последующей их трансформацией в макрофаги, которые имеют приоритетное значение в фиброгенезе. Профибротическое действие макрофагов связано с продукцией разнообразных цитокинов, наиболее значимым из которых является TGF- β [11].

TGF- β способствует синтезу компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген, фибронектин, протеогликаны и одновременно тормозит образование протеаз и стимулирует синтез антипротеаз, участвующих в деградации матрикса [7].

Однако большинство работ посвящено описанию механизмов фиброобразования в почечной ткани при ХПН, в то время как процесс развития легочного фиброза освещен недостаточно.

Цель исследования

Изучение роли микрогемодициркуляторных нарушений в развитии структурных изменений легочной ткани у крыс с экспериментальной моделью ХПН.

Материал и методы исследования

Экспериментальная модель ХПН создана на 24 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–220 г методом субтотальной нефрэктомии.

Протокол экспериментальной части исследования на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта соответствовал принципам биологической этики, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986г.), приказе Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы

с использованием экспериментальных животных», приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях при естественном световом режиме без ограничения доступа к воде и пище.

При завершении научных исследований выведение животных из опыта проводили с соблюдением требований гуманности согласно приложению № 4 к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977) о «Порядке проведения эвтаназии (умерщвления животного)» путем декапитации.

Операция субтотальной нефрэктомии выполнена 19 животным и производилась в два этапа. На первом этапе под общей анестезией выполнялась типичная нефрэктомия справа. Второй этап проводился через 2 недели, при этом под общей анестезией выполнялась резекция верхнего и нижнего полюсов левой почки.

Вторую группу составили 5 ложно оперированных крыс, которым под общим обезболиванием производилось оперативное пособие в виде рассечения кожи, подкожно-жировой клетчатки и мышц в проекции почек с последующим послойным ушиванием операционной раны наглухо для оценки влияния анестезиологического пособия и травматического повреждения на показатели гомеостаза организма.

Контрольную группу составили 5 здоровых крыс.

На 7-е сутки после операции производилось удаление швов. Раны заживали первичным натяжением. Гистоморфологическое исследование легких и бронхов у крыс проводилось через 8 и 12 недель после второго этапа оперативного вмешательства. Для микроскопического исследования забор материала проводился иссечением ткани легких через всю их толщину, объемом 0,5 см³. Кусочки иссекались из краевой области и помещались в отдельный флакон, заполненный на 2/3 раствором фиксатора (10 % раствор нейтрального формалина), не позднее 30 минут после декапитации.

Изготовление блоков проводилось по общепринятой методике заливки материала в парафин. Из полученных блоков на микротоме изготавливались продольные срезы 5–6 мкм, которые после депарафинизации окрашивались гематоксилином Бемера - эозином.

Микроскопирование и фотографирование осуществлялось на фотомикроскопе Microphot-FXA (фирма NIKON- Япония) при увеличениях X 25, 50, 150, 250 (иммерсия).

Для изготовления полутонких и ультратонких срезов полученный материал фиксировался в 2 % глютаральдегиде на фосфатном буфере при pH 7,4. Обезвоживали в ацетоне, заливали в смесь эпон-аралдит. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-NOWA.

Для светооптического исследования применялись полутонкие срезы, которые окрашивались метиленовым синим. Исследование полутонких срезов при-

менялось как самостоятельный морфологический метод. Для электронно-микроскопического исследования применялись ультратонкие срезы, контрастированные уранил-ацетатом и цитратом свинца.

Ультратонкие срезы исследовались на трансмиссионном электронном микроскопе Technai G2 Spirit TWIN при увеличениях 20 000–85 000 раз.

Результаты исследования и обсуждение

Формирование ХПН у крыс было подтверждено исследованием уровня мочевины и креатинина крови, полученной из шейных вен животных после выведения из эксперимента.

Морфологическое строение внутридолевых бронхов и паренхимы легкого крыс практически не отличается от плана организации этих отделов характерных для человека и многих млекопитающих. Исходя из цели нашего исследования, были изучены особенности строения субсегментарных и внутридолевых бронхов, а также стенки альвеол. Особое внимание было обращено на структурные изменения крупных сосудов и сосудов микроциркуляторного русла. Описана рыхлая соединительная ткань бронхов, септальных перегородок и альвеол, проведена оценка интенсивности реакции на ШИК-положительные вещества и гликозаминогликаны.

Различные экспериментальные воздействия не вели к изменению общего плана строения ряда структур бронхиального дерева и респираторного отдела легкого крыс второй группы, у которых сохранялся типичный план строения внутридолевых бронхов и межалвеолярных перегородок. Содержание гликозаминогликанов и интенсивность реакции на ШИК-положительные вещества была выражена умеренно в кровеносных сосудах и сосудах микроциркуляторного русла.

1. Через 8 недель после резекции левой почки и правосторонней нефрэктомии.

Общий план строения стенки бронхов сохраняется, но наблюдается увеличение складчатости слизистой оболочки. Выявляется очаговая гипертрофия миоцитов и увеличение расстояния между клетками. Перибронхиальная соединительная ткань инфильтрирована многочисленными лимфоцитами и макрофагами, также содержит крупные липидные капли. Эластические волокна в стенке бронхов фрагментированы, утолщены, собраны в группы. Аналогичная тенденция отмечается в межалвеолярных перегородках и только в некоторых альвеолах сохраняется обычная их структура (рис. 1).

Достаточно часто выявляется различной степени выраженности периваскулярный отек, особенно вокруг венозных сосудов, в которых отмечается застой форменных элементов крови. Изменения в респираторном отделе характеризуются появлением зон ателектаза и участков эмфиземы, обширной инфильтрации и кровенаполнением капилляров. В септальных перегородках появляются многочисленные скопления волокон (коллагеновых и эластических), зоны мукоидного набухания (рис. 2).

В просвете альвеол присутствуют крупные макрофаги с большим числом вакуолей.



Рис. 1. Респираторный отдел легкого крысы через 8 недель после резекции левой почки и правосторонней нефрэктомии. В межалвеолярной перегородке эластические волокна (↑) утолщены, располагаются группами. Выражен периваскулярный отек (ПО). Окраска: резорцин-фуксином по Вейгерту. Увеличение: 260.

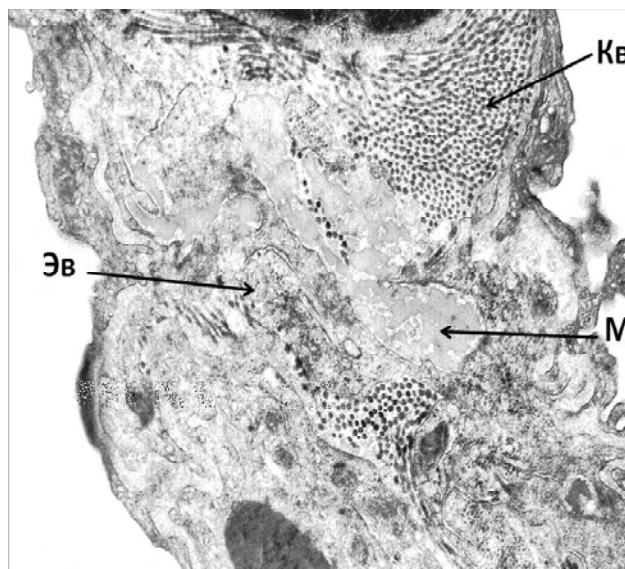


Рис. 2. Септальная перегородка легкого крысы через 8 недель после резекции левой почки и правосторонней нефрэктомии. Утолщение стенки альвеолы. Между пучками коллагеновых волокон (Кв) выявляются зоны мукоидного набухания (Мн), очаговое увеличение эластических волокон (Эв). Заливка: аралдит-эпон. Окраска: уранилацетат, цитрат свинца. Увеличение: 15000.

В альвеолоцитах 2 типа каналцы эндоплазматической сети расширены, митохондрии набухшие, количество осmioфильных телец незначительно. В структуре альвеолы базальная мембрана в некоторых участках утолщается, наблюдается ее разрыхление, в альвеолоцитах 1 типа и эндотелиоцитах появляются многочисленные мелкие вакуоли. Наблюдается очаговое увеличение реакции на гликозаминогликаны в перибронхиальной соединительной ткани, в стенке крупных сосудов и в межалвеолярных перегородках.

Увеличивается реакция на ШИК-позитивные вещества, которые имеют диффузную либо очаговую локализацию в кровеносных сосудах. Достоверно возрастает ее интенсивность в базальных мембранах капилляров альвеол, а также во внутренней и средней

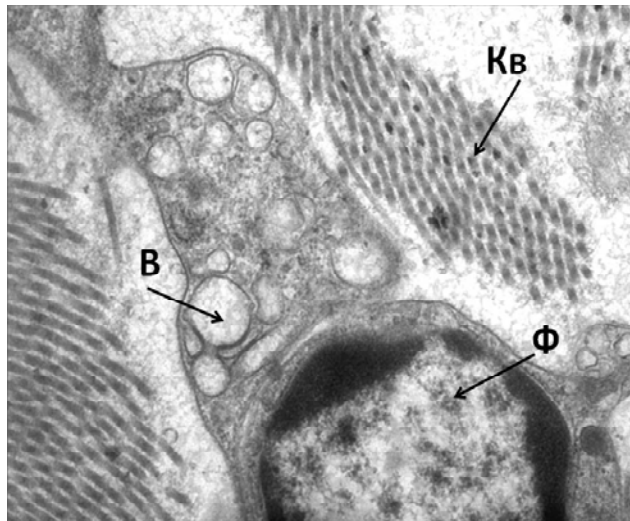


Рис. 3. Перибронхиальная соединительная ткань крысы через 12 недель после резекции левой почки и правосторонней нефрэктомии. Зрелый фибробласт (Ф) располагается между пучками сформированных коллагеновых волокон. В его цитоплазме много крупных вакуолей (В), под кариолеммой находится слой компактного хроматина. Заливка: аралдит-эпон. Окраска: уранилацетат, цитрат свинца. Увеличение: 15000

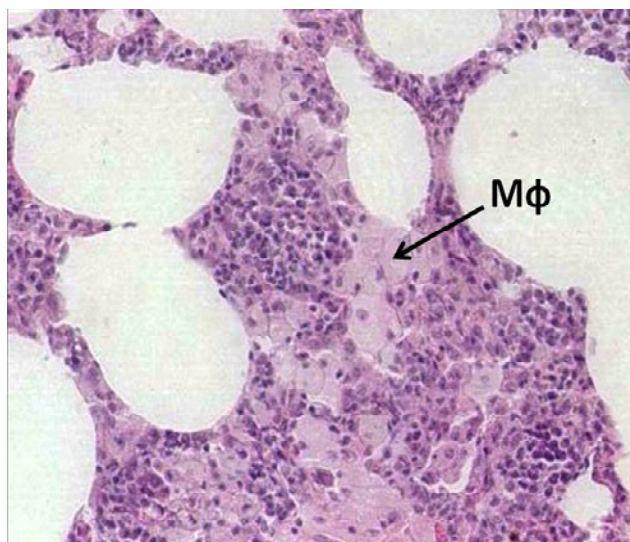


Рис. 4. Респираторный отдел легкого крысы через 12 недель после резекции левой почки и правосторонней нефрэктомии. Межальвеолярные перегородки утолщены, инфильтрированы многочисленными лимфоцитами и макрофагами (↑), которые преимущественно имеют очаговую локализацию. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: 680

оболочках бронхиальных сосудов, вокруг последних выявляется периваскулярный отек.

2. Через 12 недель после резекции левой почки и правосторонней нефрэктомии

Резекция левой почки и частичная правосторонняя нефрэктомия приводит к значительным изменениям, как в бронхиальном дереве, так и в респираторном отделе. В субсегментарных и внутридольковых бронхах выявляется значительная гипертрофия гладкомышечных клеток, между которыми увеличивается межклеточное пространство, вероятно, в результате отека.

В перибронхиальной ткани появляются крупные липидные капли. Часть кровеносных сосудов расширены, другие находятся в спавшемся состоянии, отмечается периваскулярный отек. В некоторых участках отмечено уплотнение соединительной ткани, особенно около спавшихся кровеносных сосудов. В перибронхиальной соединительной ткани зрелые фибробласты обычно располагаются между пучками коллагеновых волокон, в их цитоплазме выявляются многочисленные вакуоли (рис. 3).

Часть бронхов находится в спавшемся состоянии, у других просвет резко расширен. Зоны инфильтрации в бронхах имеют в основном очаговую локализацию. Часть альвеол находится в спавшемся состоянии и заполнены жидкостью. Стенки альвеол утолщены за счет значительного числа коллагеновых волокон, имеющих различное направление, расположенных обычно вокруг кровеносных капилляров. Иногда наблюдается значительное набухание эндотелиоцитов, и тогда их ядродержащая часть практически закрывает просвет капилляров.

Выявляются многочисленные форменные элементы крови в просвете капилляров альвеол, а вокруг них зоны инфильтрации из лимфоцитов и макрофагов. Макрофаги чаще крупного размера, располагаются группами, имеют светлую вакуолизированную цитоплазму (рис. 4).

Вокруг кровеносных сосудов выявляется периваскулярный отек, а в ряде случаев выраженная диффузная либо очаговая инфильтрация лимфоцитами и макрофагами.

Реакция на гликозаминогликаны повышается в перибронхиальной соединительной ткани и в кровеносных сосудах, вокруг которых выявляется периваскулярный отек. Резко положительная реакция на ШИК-положительные вещества выявляется в стенке бронхиальных сосудов и в межальвеолярных перегородках. Особенно большое число ШИК-положительных гранул отмечается в гипертрофированных гладкомышечных клетках средней оболочки артерий. В зоне периваскулярного отека ШИК-положительные вещества имеют очаговую локализацию.

В основе создания экспериментальной модели ХПН у крыс находится способность редуцированной почки обеспечивать определенное время поддержание кислотно-щелочного и водно-электролитного гомеостаза за счет компенсаторной гиперфункции сохранившихся клубочков. Это позволяет животным адаптироваться к измененным условиям существования и сохранить жизнеспособность. Однако длительная гиперперфузия действующих нефронов сопровождается нарушением ауторегуляции внутрипочечного кровотока за счет развития ангиотензин II-индуцированной вазодилатации афферентной артериолы и повышения тонуса эфферентной артериолы. Это приводит к развитию внутриклубочковой гипертензии, еще в большей мере усугубляющей гиперфильтрацию с последующим развитием гипертрофии сохранившихся клубочков, их повреждением и склерозированием [3].

Создание экспериментальной модели ХПН у крыс дает возможность изучить воздействие длительной

уремии на состояние бронхолегочной системы на различных этапах ХПН. При сроке 8 недель после второго этапа операции в почечной паренхиме выявляются признаки повреждения гломерулярной мембраны и начальные склеротические изменения, что соответствует ранним проявлениям почечной недостаточности. В этот период признаки уремии отсутствуют, а системное воздействие на организм определяется гиперактивацией РААС, метаболическими и начинающимися электролитными нарушениями. Исследование бронхолегочной системы на сроке 8 недель после проведения субтотальной нефрэктомии позволило выявить изменения, обусловленные влиянием этой группы факторов. К ним, прежде всего, относились изменения в сосудах микроциркуляторного русла, которые характеризовались развитием перикапиллярного и периваскулярного отека, их полнокровием.

Отмечались начальные изменения в базальной мембране капилляров, выражавшиеся в накоплении ШИК-положительных веществ, являющихся предшественниками образования соединительной ткани. Вовлечение в патологический процесс базальной мембраны капилляров является проявлением «универсальной капилляропатии», приводящей к нарушению трофических процессов в тканях. Следствием этого является изменение структуры легочной ткани, возрастание количества эластических и коллагеновых волокон.

Через 12 недель после выполнения субтотальной нефрэктомии в 70–80% клубочков обнаруживался

сегментарный склероз, что соответствовало тяжелой уремией. При этом выраженность изменений в легочной ткани значительно возрастала, наблюдалось частичное запустевание сосудов микроциркуляторного русла, более выраженное поражение эндотелиальной выстилки сосудов и базальной мембраны, массивное разрастание соединительной ткани.

Локализация коллагеновых и эластических волокон непосредственно в периваскулярной области указывала на ведущую роль сосудистых нарушений в ремоделировании легочной ткани. Обнаруженные изменения в эндотелиоцитах косвенно свидетельствовали о развитии эндотелиальной дисфункции, приводящей к нарушению сосудистой регуляции и еще больше усугубляющей тканевую гипоксию. В межальвеолярных перегородках происходила структурная перестройка, проявлявшаяся их значительным утолщением, что позволяло сделать предположение о снижении эластических свойств и диффузионной способности легких.

Выводы

1. При ХПН одним из пусковых факторов развития патологических процессов в респираторной системе являются микрогемоциркуляторные нарушения.
2. Формирование нарушений в микрогемоциркуляторном звене легочного кровообращения начинается на ранних стадиях ХПН до развития уремии.
3. Исходом ремоделирования микрососудистого русла является ухудшение трофических процессов в тканях и развитие пневмофиброза.

Литература

1. Бикбов, Б. Т. Предикторы летального исхода у больных на гемодиализе / Б. Т. Бикбов [и др.] // *Нефрология и диализ*. — 2004. — № 2. — С. 154–163.
2. Сторожаков, Г. Л. Сердечная недостаточность у больных с хронической почечной недостаточностью / Г. Л. Сторожаков [и др.] // *Сердечная недостаточность*. — 2005. — № 6 (3). — С. 100–105.
3. Титова, В. А. Исследование структурных изменений оставшихся нефронов крыс при субтотальной нефрэктомии / В. А. Титова [и др.] // *Нефрология*. — 2001. — № 5 (7). — С. 86–95.
4. Chen, C. H. Different bacteriology and prognosis of thoracic empyemas between patients with chronic and end-stage renal disease / C. H. Chen [et al] // *Chest*. — 2007. — № 132 (2). — P. 532–539.
5. De Backer, W. Renal failure and the lung / W. De Backer // *Eur. Respir. J.* — 2006. — № 34. — P. 102–111.
6. Horita, Y. Prognosis of patients with rounded atelectasis undergoing long-term hemodialysis / Y. Horita [et al] // *Nephron*. — 2001. — № 88 (1). — P. 87–92.
7. Li, X. C. Nuclear factor-kappaB as a hormonal intracellular signaling molecule: focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury / X. C. Li, J. L. Zhuo // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* — 2008. — № 7 (1). — P. 37–43.
8. Li, Y. J. Fulminant pulmonary calciphylaxis and metastatic calcification causing acute respiratory failure in a uremic patient / Y. J. Li [et al] // *Am. J. Kidney Dis.* — 2006. — № 47 (4). — P. 47–53.
9. Pierson, D. J. Respiratory considerations in the patient with renal failure / D. J. Pierson // *Respir. Care*. — 2006. — № 51 (4). — P. 413–422.
10. Ruiz-Ortega, M. Proinflammatory actions of angiotensin II / M. Ruiz-Ortega [et al] // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* — 2000. — № 10. — P. 321–329.
11. Schlondorff, D. The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease / D. Schlondorff // *Kidney Int.* — 1995. — № 47. — P. 44–47.
12. Schneider, A. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor- β / A. Schneider [et al] // *Kidney Int.* — 1999. — № 56. — P. 135–144.
13. Senatore, M. Respiratory function abnormalities in uremic patients / M. Senatore [et al] // *G. Ital. Nefrol.* — 2004. — № 21 (1). — P. 29–33.
14. Słomian, M. Lung function in chronic uremia / M. Słomian, J. Mosiewicz, W. Mysliński // *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Med.* — 2000. — № 55. — P. 147–153.