

© А.В.Смирнов, Г.Т.Иванова, О.Н.Береснева, М.М.Парастаева, В.Г.Сиповский, М.И.Зарайский, И.Ю.Сабурова, Е.Б.Сиповская, И.Г. Каюков, 2009
УДК 616.61-002.17]-092.4

*А.В. Смирнов^{1,2}, Г.Т. Иванова³, О.Н. Береснева¹, М.М. Парастаева¹,
В.Г. Сиповский¹, М.И. Зарайский⁴, И.Ю. Сабурова⁴, Е.Б. Сиповская¹,
И.Г. Каюков^{1,5}*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ПОЧЕЧНОГО ФИБРОЗА

*A.V. Smirnov, G.T. Ivanova, O.N. Beresneva, M.M. Parastaeva, V.G. Sipovskiy,
M.I. Zarayskiy, I.J. Saburova, E.B. Sipovskaya, I.G. Kayukov*

EXPERIMENTAL MODEL OF INTERSTITIAL RENAL FIBROSIS

¹ Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, ²кафедра пропедевтики внутренних болезней Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, ³лаборатория экспериментальной и клинической кардиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, ⁴лаборатория молекулярной диагностики научно-методического центра Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, ⁵кафедра нефрологии и диализа Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Оценить последствия односторонней обструкции мочеточника (ООМ) у крыс линии Wistar. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Односторонняя перевязка мочеточника левой почки выполнена у 6 крыс линии Wistar. Срок наблюдения после ООМ составил 14 сут. У экспериментальных животных измерены масса почек и уровень среднего артериального давления (АД), проведено светооптическое морфологическое исследование и определен уровень экспрессии нуклеарного фактора транскрипции (NFκB) в почечной ткани. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Не выявлено существенного изменения величины среднего АД у крыс через 2 нед после операции по сравнению с дооперационным уровнем. Масса левой почки возросла после операции почти в 4,5 раза относительно контрольной правой почки. Относительный уровень экспрессии нуклеарного фактора транскрипции NFκB в опытных левых почках в 1,5 раза превышал таковой в контралатеральных органах. Отмечено истончение коркового и медуллярного слоев, дилатация просвета проксимальных канальцев с уплощением и слущиванием эпителия, дистрофия эпителия проксимальных канальцев, накопление клеток лимфоцитарно-макрофагального ряда с разрастанием нежно-волокнистой соединительной ткани в экстрацеллюлярном матриксе, отек междубулярной стромы. В клубочках, вовлеченных зонально, определяется расширение мочевого пространства капсулы Боумена, сдавление и частично спадение капиллярных петель. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные данные свидетельствуют о том, что односторонняя перевязка мочеточника у крыс через 14 сут приводит к отчетливым повреждениям почечной ткани, которые в основном локализованы в тубулоинтерстициальном компартменте.

Ключевые слова: почки, односторонняя обструкция мочеточника, тубулоинтерстициальный фиброз.

ABSTRACT

THE AIM. Assess the impact of unilateral ureteral obstruction (UUO) in Wistar rats. **MATERIAL AND METHODS.** Unilateral ureteral ligation left kidney performed in 6 Wistar rats. Time of observation after the UUO was 14 days. Experimental animals to measure the mass of the kidneys and the level of mean arterial pressure (BP), held light microscopic morphological study and determined the level of expression of the nuclear transcription factor (NFκB) in renal tissue. **RESULTS.** No significant change in the mean arterial pressure in rats 2 weeks after surgery compared with preoperative levels. Mass left kidney increased after the operation almost 4.5 times for the control right kidney. The relative level of expression of the nuclear transcription factor NFκB in experimental left kidney in 1.5 times higher than in the contralateral organs. It is noted thinning of the cortical and medullary layers, dilatation of the lumen of proximal tubules with flattening and desquamation of the epithelium, degeneration of the epithelium of proximal tubules, the accumulation of lymphocytes-macrophages with the growth of connective tissue in extracellular matrix and stromal edema. In glomeruli involved, area-defined expansion of the urinary space of Bowman capsule, compression and partial collapse of the capillary loops. **CONCLUSION.** These data suggest that the unilateral ureteral ligation in rats after 14 days leads to a distinct damage of kidney tissue, which are mainly localized in the tubulointerstitial compartment.

Key words: kidney, unilateral ureteral obstruction, tubulointerstitial fibrosis.

ВВЕДЕНИЕ

Прогрессирование хронической болезни почек до стадии V (терминальная почечная недостаточ-

ность – ТПН) тесно ассоциировано с развитием тубулоинтерстициальных повреждений. Воспалительные изменения в тубулоинтерстициальном компартменте, ведущие к формированию фиброза, являются важным фактором неизбежной утраты функции почек у пациентов с самыми разными

Каюков И.Г. 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д.17, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Нефрокорпус. Тел.: (812)-3463926; факс: (812)-2349191; E-mail: kaukov@nephrolog.ru

заболеваниями этого органа. Поэтому изучение механизмов развития тубулоинтерстициального почечного фиброза и поиск путей замедления его формирования остается весьма актуальной задачей [1, 2]. Многие стороны данной проблемы могут быть изучены только в эксперименте с использованием соответствующих моделей. Для решения данных задач одним из наиболее адекватных подходов считается односторонняя обструкция мочеточника (ОМ) у экспериментальных животных. Данная модель характеризуется тем, что в ней на формирование интерстициального почечного фиброза не оказывают влияние такие провоцирующие факторы, как уремия или артериальная гипертензия. Кроме того, она может служить удобным средством для изучения эффективности различных противотуберозических воздействий [1–6]. В данной связи мы предприняли попытку оценить последствия односторонней перевязки мочеточника у крыс линии Wistar.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методика выполнения оперативного вмешательства. Для создания модели были использованы самцы крыс Wistar массой тела 230–250 г (питомник «Колтуши» РАН). Под общей анестезией («Рометар», (0,05 мл) в сочетании с «Золетил» (0,3 мл), внутривенно) выполняли перевязку левого мочеточника. На мочеточник накладывали 2 лигатуры (использовали нерассасывающийся шелк 2/0 «Silkam»). Участок мочеточника между лигатурами перерезали. Во избежание побочного эффекта на развитие фиброза антибиотик в послеоперационный период не применяли. Правую почку (с неповрежденным мочеточником) использовали в качестве контроля.

В ходе эксперимента животных содержали на стандартном лабораторном пищевом рационе и свободном доступе к воде. Срок после ОМ составлял 14 сут.

За 1 сут до проведения операции, а также накануне забоя у ненаркотизированных крыс измеряли среднее системное артериальное давление (АД) манжеточным методом. Во время забоя у крыс регистрировали массу левой и правой почки, производили забор почечной ткани для последующих молекулярно-диагностических и гистологических исследований.

Эксперименты проводили в соответствии с международными стандартами по работе с лабораторными животными.

Гистологические исследования. Для световой микроскопии кусочки почечной паренхимы из срединной части фиксировали в формали-

не (10%, pH 7,4) в течение 1 сут. Парафиновые срезы 3–5 мкм были депарафинизированы по стандартной методике, окрашены гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа (ШИК-реакция), трихромальной окраской и исследованы в светооптическом микроскопе «MICROS 200A» (Австрия).

Исследование экспрессии NF- κ B. Получение материала и его характеристика. В качестве основного материала для исследования использовали участок почечной ткани крысы. Забор материала производили в стерильных условиях в пластиковые автоклавированные микропробирки «Эппендорф», емкостью 1,5 мл с добавлением 0,2 мл 0,1 М раствора EDTA. Далее материал гомогенизировался с помощью одноразовых лезвий до кашицеобразного состояния. Полученный материал

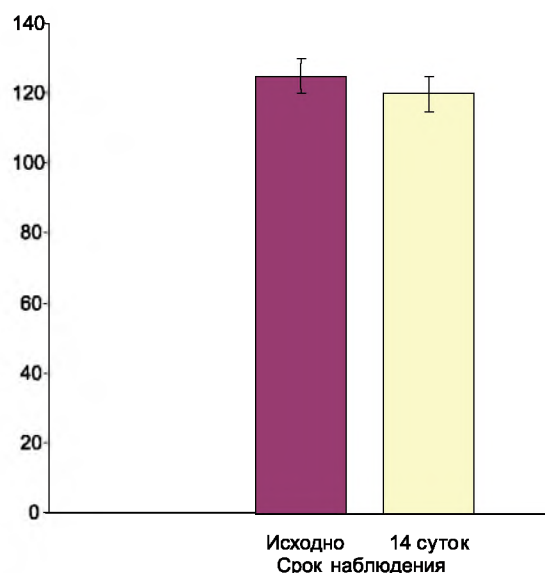


Рис. 1. Среднее артериальное давление (ось ординат – мм рт. ст.) у крыс Wistar (14 сут после ОМ).

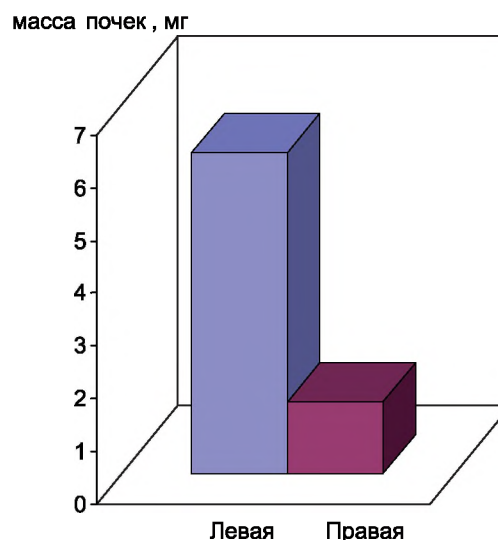


Рис. 2. Изменение массы левой почки крыс через 2 нед после перевязки мочеточника.

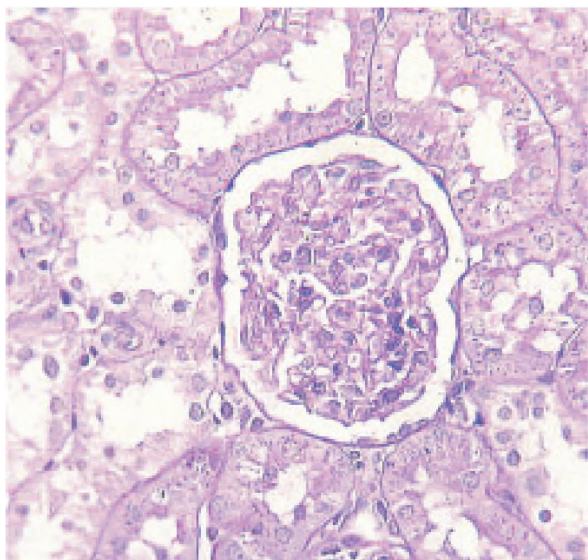


Рис. 3. Нормальная гистеоархитектоника с четким делением на корковое, мозговое вещество и чашечно-лоханочную систему. Окраска ПАС-реакция. Ув. $\times 500$.

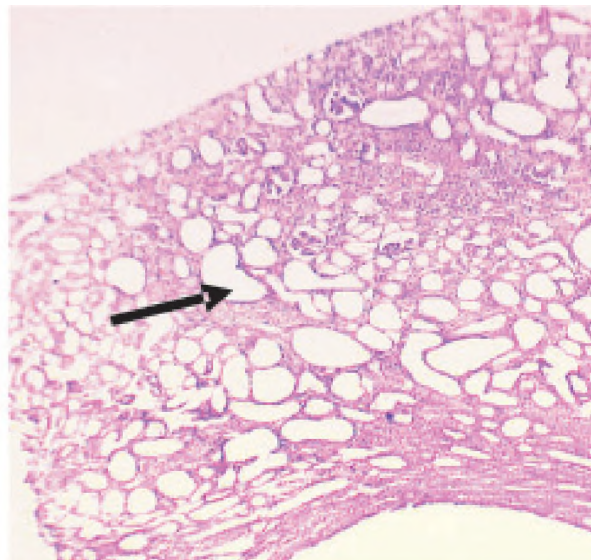


Рис. 4. Дилатация просвета проксимальных канальцев с уплощением эпителия канальцев (стрелка). Окраска ПАС-реакция. Ув. $\times 30$.

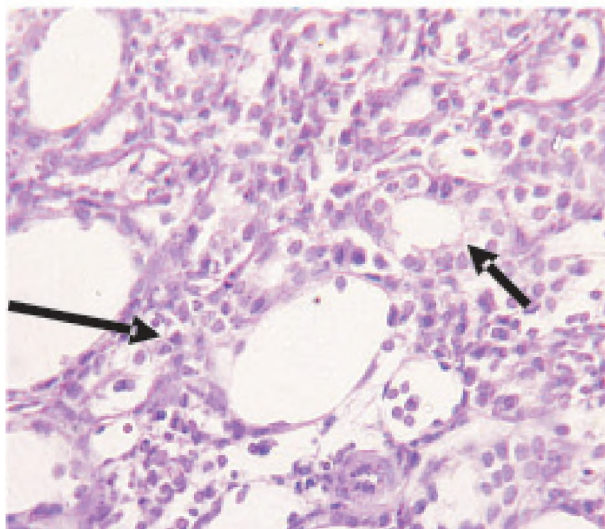


Рис. 5. В экстрацеллюлярном матриксе наблюдается инфильтрация лейкоцитами (лимфоциты и макрофаги) с разрастанием нежнзловолнистой соединительной ткани и отеком междубуллярной стромы (стрелки). Окраска ПАС-реакция. Ув. $\times 450$.

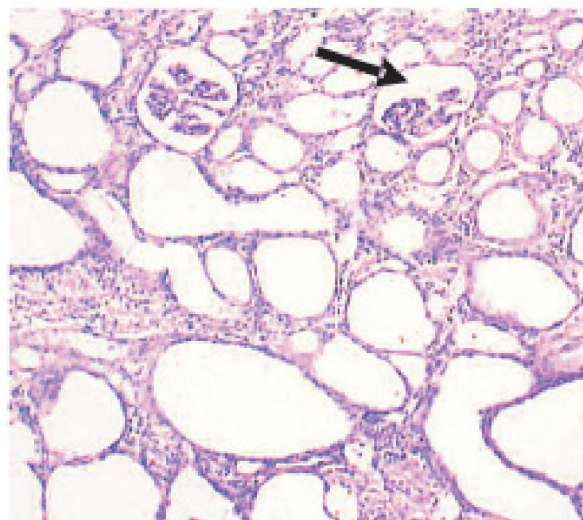


Рис. 6. Расширение мочевого пространства капсулы Боумена, сдавление и частичное спадение капиллярных петель клубочков (стрелка). Окраска ПАС-реакция. Ув. $\times 150$.

отмывали в ТЕ и PBS буферах и использовали для выделения тотальной РНК.

Выделение тотальной РНК. Тотальная РНК выделялась фенол-хлороформным методом, с помощью набора «Рибо-золь-А» (Амплисенс, Москва), согласно прилагаемой инструкции.

Приготовление кДНК. Приготовление кДНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции (набор «Реверта-Л-100», «Амплисенс», Россия) в модификации для рандомизированных олигопраймеров, с использованием обратной транскриптазы М-МЛV. Применение данного протокола позволило использовать полученную кДНК как единую мишень для последующих амплификаций.

Проведение реакции амплификации (RealTimePCR-протокол). Реакция амплификации и детекция результатов проводились с использованием прибора ДТ-96 (ДНК-Технология, Москва). Для каждой пробы ставили по две отдельные реакции для гена NFkBp65 и гена GAPDH соответственно. Для проведения ПЦР-анализа использовалась реакционная смесь фирмы «Синтол» (Москва) с интеркалирующим красителем SYBRGREEN. Состав реакционной смеси в конечном объеме 25 мкл был следующий: 2,5 мкл 10х реакционного буфера, 2,5 мкл $MgCl_2$ (25 мМ), 2,5 мкл смеси нуклеотидов трифосфатов (2,5 мМ), пара праймеров по 10 пмоль/мкл каждого, 0,2 мкл раствора Taq-полимеразы 5 Ед/мкл и 4 мкл кДНК. Праймеры были

Зависимость флюоресценции канала FAM от номера цикла

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, FAM	Ct, Hex	Результат
H6	WAT_NKFB	29,9	—	+
H7	WAT_GAPDH	28,0	—	+

* Ручной (пороговый) метод анализа (B,F) Threshold_FAM = 42,2 Threshold_HEX = 0,0

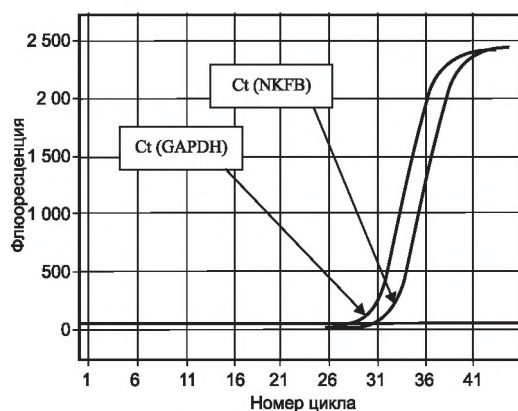


Рис. 7. Протокол автоматического определения Ct на приборе ДТ-96.

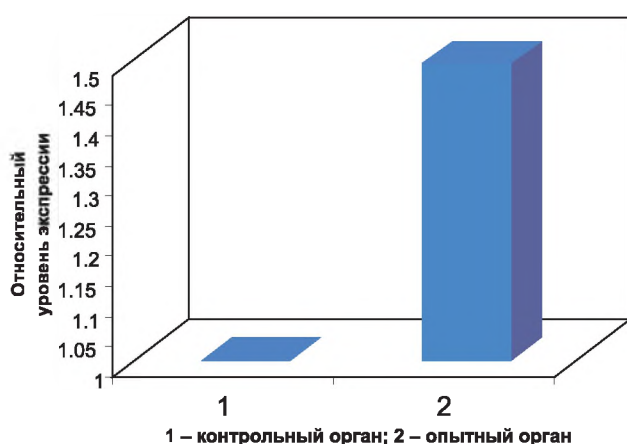


Рис.8. Относительный уровень экспрессии гена NFkB в почках крыс через 14 дней после OOM.

синтезированы в НПФ «ЛИТЕХ» (Москва). Последовательности используемых праймеров были следующие:

NFkBp65F: 5-GTTCACAGACCTGGCATCC-3;
 NFkBp65R: 5-TGTCACCTAGGCGAGTTATAGC-3;
 GAPDH-F: 5-TGGAAATCCCATCACCATCT-3;
 GAPDH-R: 5-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3.

Контроль контаминации реактивов проводился при помощи обязательной постановки отрицательного контроля (H_2O вместо кДНК). Типовая программа амплификации состояла из начальной денатурации – $95^{\circ}C$ – 300 с и 35 циклов ($95^{\circ}C$ – 15 с, $61^{\circ}C$ – 40 с). Учет результатов проводился прибором автоматически в режиме «качественный логарифмический обсчет». Вычисление относительного уровня экспрессии гена NFkB проводилось по полуколичественному протоколу методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное исследование не выявило существенного изменения величины среднего АД у крыс через 2 нед после операции по сравнению с исходным дооперационным уровнем (рис.1).

Масса левой почки возросла после операции почти в 4,5 раза относительно контрольной правой почки (рис.2).

Контралатеральные почки без обструкции мочеточника имели нормальную гистеоархитектонику с четким делением на корковое, мозговое вещество и чашечно-лоханочную систему (рис. 3).

После 2 нед унилатеральной обструкции отмечается истончение коркового слоя и значительное истончение медулярного слоя. Микроскопически выявляется дилатация просвета проксимальных канальцев с уплощением, а местами и слущиванием эпителия в просвет канальцев (рис. 4). В клетках эпителия проксимальных канальцев выявляются признаки дистрофии, очагово, вплоть до некробиотических изменений. В экстрацеллюлярном матриксе кортикального и медулярного слоев наблюдается накопление клеток лимфоцитарно-макрофагального ряда с разрастанием нежно-волокнистой соединительной ткани, расширением капиллярной сети, отеком межтубулярной стромы (рис. 5) и замещением канальцевых структур. В клубочках, вовлеченных зонально в вышеизложенные изменения, определяется расширение мочевого пространства капсулы Боумена, сдавление и частичное спадение капиллярных петель (рис. 6).

Исходными данными для вычисления уровня относительной экспрессии гена NFkBp65 служили расчетные номера циклов амплификации, соответствующие логарифмической фазе накопления ПЦР-продукта в пробах – Ct (threshold cycle – рис. 7).

Далее полученные результаты нормализовались по уровню экспрессии референц-гена GAPDH, а затем подвергались сравнению между опытной и контрольной группами с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты сравнения представлены на рис.8. Относительный уровень экспрессии нуклеарного фактора транскрипции NFkB в опытных левых почках в 1,5 раза превышал таковой в контралатеральном органе (см. рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования, в принципе, согласуются с данными тех авторов, которые занимаются проблемой изучения путей развития тубулоинтерстициального почечного фиброза на фоне OOM [1–6]. Существенно, что мы смогли подтвердить нарастание в ткани почки, подвергнутой односторонней перевязке мочеточника, нарастание

активности NFκB – важнейшего модулятора деятельности многих генов, контролирующих экспрессию соответствующих цитокинов, многие из которых обладают профибротическим и провоспалительным действием. Изменения, выявленные при патоморфологическом, светооптическом анализе экспериментального материала также в основном соответствуют ранее описанным [4, 8]. Однако в известных работах изменения клубочков либо не описываются, либо указывается отсутствие их повреждений. Наш эксперимент приводил к появлению в гломерулах хотя и умеренных, но довольно заметных патоморфологических изменений. Они могут быть связаны с нарушениями пассажа мочи по канальцам нефрона при обструкции мочеточника и сопровождаются нарушением процесса клубочковой ультрафильтрации. В любом случае экспериментальные исследования по проблеме развития повреждений почечной ткани после ООМ должны быть продолжены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что односторонняя перевязка мочеточника у крыс через 14 сут приводит к отчетливым повреждени-

ям почечной ткани, которые в основном локализируются в тубулоинтерстициальном компартменте.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis: The role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor. *Kidney Int Suppl*

Am J Physiol Renal Physiol

J Pharmacol Sci

Nephrol Dial Transplant

Kidney Int

Kidney Int

Diagn Mol Pathol

J Am Soc Nephrol

Поступила в редакцию 10.11.2009 г.
Принята в печать 23.11.2009 г.