© Коллектив авторов, 2000
УДК 616.1.018.74-008.6:616.61-008.64-036.12:599.323.4

В.А.Титова, Н.В.Томилин, Т.Е.Тимошенко, В.В.Барабанова

ОЦЕНКА ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ СОСУДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

V.A.Titova, N.V.Tomilin, T.E.Timoshenko, V.V.Barabanova

EVALUATION OF TRANSENDOTHELIAL PERMEABILITY OF THE VESSELS IN EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL FAILURE

Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

Исследовали функциональное состояние эндотелия гломерулярного фильтра почки, брюшного отдела аорты и капилляров сенсомоторной коры головного мозга при экспериментальной хронической почечной недостаточности с помощью метода внутрисосудистой перфузии хлористым лантаном. Получены данные, что при экспериментальной хронической почечной недостаточности до развития гипертензии имеет место изменение трансэндотелиальной проницаемости, обусловленное снижением отрицательного заряда гликокаликса и усилением везикулярного транспорта.

Ключевые слова: хроническая почечная недостаточность, проницаемость, эндотелий.

ABSTRACT

The functional state of the endothelium of the glomerular filter of the kidney, abdominal part of the aorta and sensory-motor cortex of the brain was studied by the method of intravasal perfusion with lanthanum chloride. It was shown that in experimental chronic failure transendothelial permeability was altered prior to the development of hypertension due to lower negative charge of glycocalyx and to increased vesicular transport.

Key words: chronic renal failure, permeability, endothelium.

ВВЕДЕНИЕ

Прогрессирование протеинурии по мере уменьшения массы действующих нефронов является показателем нарушения барьерной функции эндотелия гломерулярного фильтра для высокомолекулярных белков. Показано, что при развитии хронической почечной недостаточности (ХПН) повышается содержание в крови вазоактивных веществ в связи с усилением синтеза одних (ангиотензин, брадикинин, катехоламины) и подавлением процессов расщепления и выведения других (креатинин, паратиреоидный гормон), что, в свою очередь, оказывает повреждающее влияние на эндотелий и может приводить к изменению его проницаемости для макромолекул [4, 7, 8, 12, 17–19]. Повреждающее действие на эндотелий может оказывать при этом, с одной стороны, совместное раздражение многих видов клеточных рецепторов, приводя к нарушению межклеточных контактов и даже гибели эндотелиоцитов [1]. С другой стороны, сам факт нарушения проницаемости эндотелия для макромолекул и потери белка является причиной дальнейшего нарастания повреждающего действия, так как сывороточный альбумин связывает и инактивирует многие высокоактивные вазомоторные агенты, в частности эндотелин [20]. Кроме того, наблюдаемое при активации эндотелиоцитов фосфорилирование мембрансвязанных ферментов, в частности $NADPH_2$-оксидазы, усиливает синтез супероксидных радикалов и создает условия для оксидантного повреждения цитоскелета [3].

В литературе имеются указания, что диабет и повышенное внутрисосудистое давление создают условия для повышения проницаемости эндотелия аорты и артерий для белковых молекул [9, 10, 15, 16]. В настоящем исследовании мы провели сравнительную оценку функционального состояния эндотелия капилляров гломерулярного фильтра, а также сенсомоторной коры головного мозга и брюшного отдела аорты, используя традиционный метод перфузии хлористым лантаном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар, подвергнутых в возрасте 2 мес операции субтотальной нефрэктомии [13]. Для работы были отобраны две группы крыс по следующим критериям: срок после операции, степень выраженности гипертензии, азотемии и протеинурии. В каждой группе было по 6 животных, из которых три — после операции субтотальной нефрэктомии и три — контрольных соответствующего возраста (интактных). В 1-ю группу [1] были отобраны животные через 1,5 мес после операции с нормальным АД (не более 120 мм рт. ст.), протеинурией не более 2 г/л в сутки. Контрольная группа 1А включала животных того же возраста (3,5 мес) с нормальным АД и протеинурией в пределах возрастной нормы для крыс. Животные 2-й группы [2] были забиты через 6 мес после операции. Они характеризовались развитием гипертензии (АД 160–170 мм рт. ст.), умеренной протеинурией (1 г на 1 л в сутки). Контрольные животные этой группы (2А) имели тот же возраст (8 мес), АД 160 мм рт. ст., протеинурию до 0,4 г/л в сутки. Уровень азотемии по креатинину животных и 1-й, и 2-й подопытных крыс не превышал 0,12 ммоль/л. Для получения материала с целью последующей электронно-микроскопической обработки и исследования применили фиксацию методом внутрисосудистой перфузии альдегидами на 0,1 моль натрий-какодилатном буфере (pH 7,2) с 1 ммоль хлористого лантана [6, 14]. Сначала кровь из сосудистого русла вымывали физиологическим раствором (0,9% NaCl, 0,04% KCl и 0,1% глюкозы) с 1 ммоль хлористого лантана и 10 ЕД на 1 мл гепарина (pH 7,2) в течение 10 мин. Скорость перфузии для всех растворов составляла 6 мл в 1 мин. Вырезанные куски почки, брюшной аорты и сенсомоторной коры головного мозга промывали в 0,1 моль Na-какодилатном буфере с сахарозой 0,03 г на 1 мл при 37 °С, дофиксировали в четырехокиси осмия, дегидратировали и заливали в аралдит.

Ультратонкие срезы изготавливали из участков препаратов, предварительно отобранных после просмотра под световым микроскопом 1 мкм срезов, окрашенных метиленовым синим. Затем ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Для контроля специфичности выявляемого осадка исследовали неконтрастированные срезы. Ультратонкие срезы изучали с помощью электронного микроскопа HITACHI-300.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование эндотелия аорты контрольных крыс 1-й и 2-й группы. На препаратах контрольных крыс 1-й группы (рис. 1, а) эндотелий представлен слоем уплощенных клеток с гладкой поверхностью и единичными небольшими цитоплазматическими выростами. Ядро эллипсоидное, в цитоплазме обнаруживается большое число отдельных рибосом и митохондрий различной формы, в апикальной части клетки видны отдельные везикулы. Межклеточные щели эндотелия протяженные, извилистые. В апикальной части расположены плотные контакты. В просвете аорты после перфузии обнаруживаются отдельные массивные скопления мелкогранулярного осадка лантана, прилежащие к поверхности эндотелиальных клеток и преимущественно локализующиеся в местах межклеточных контактов; межклеточные щели заполнены осадком до плотного контакта.

У контрольных животных 2-й группы в отличие от животных 1-й группы эндотелий обнаруживал увеличение поверхности за счет выпячивания отдельных клеток (рис. 1, б), в цитоплазме встречались единичные экзоцитозные гранулы, содержащие везикулярный материал. Межклеточные щели были расширены в апикальной части.

Осадок хлористого лантана в субэндотелиальных слоях стенки аорты контрольных животных 1-й и 2-й группы выявлен не был.

Исследование эндотелия аорты подопытных животных. У подопытных животных 1-й группы в отличие от их контроля обнаружено увеличение числа пиноцитозных пузырьков. Обращает на себя внимание расширение межклеточных щелей в их апикальных частях (устьях), вблизи которых обнаруживались скопления гранул осадка лантана. В сопоставлении с контрольными животными скопления гранул лантана были менее массивны. Вдоль заполненных осадком межклеточных щелей часто можно видеть везикулы, заполненные осадком лантана, изредка метка обнаруживалась в апикально расположенных везикулах.

У животных 2-й группы в сравнении с их контролем было резко выражено выбухание большого числа клеток эндотелия с деформацией ядер, а также обилие экзоцитозных гранул и расширение межклеточных щелей. Скоплений осадка лантана на люминальной поверхности эндотелия в отличие от животных 1-й группы не было обнаружено, метка глубоко проникала в щель и была видна в расположенных вдоль щели везикулах.

У животных как в 1-й, так и во 2-й группе метка обнаруживалась в глубоких субэндотелиальных слоях стенки аорты (рис. 1, в).

Исследование эндотелия гломерулярного фильтра контрольных животных. Ультраструктура гломерулярного фильтра у контрольных животных обеих групп не отличалась от неодно-

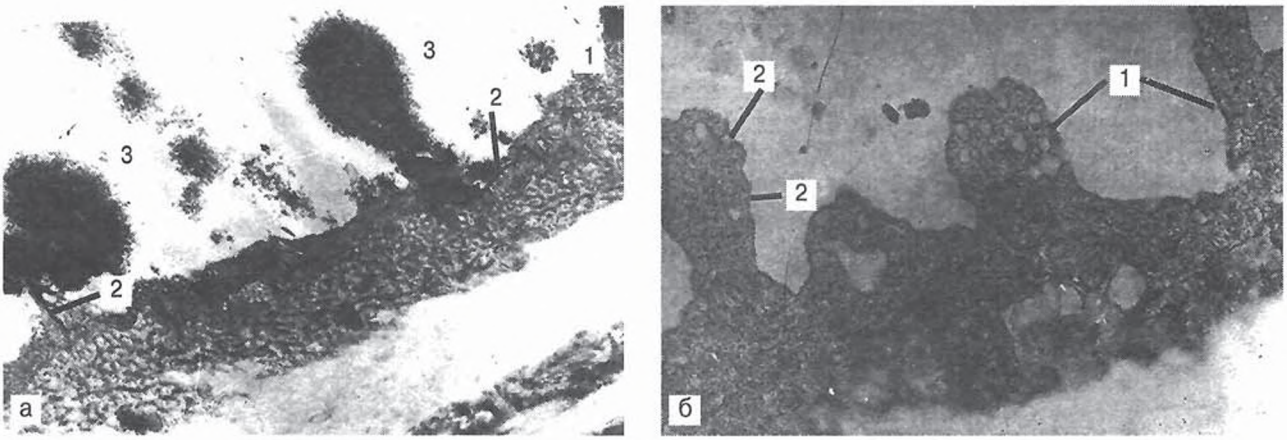

Рис. 1. Электронограммы препаратов аорты.

а — контроль 1-й группы. 1 — эндотелий; 2 — межклеточные щели; 3 — скопления осадка лантана; б — изменение формы клеток эндотелия у контрольных крыс 2-й группы. 1 — эндотелиальные клетки; 2 — экзоцитоз; в — опыт; крысы 1-й группы. Видны скопления осадка хлористого лантана в глубоких слоях стенки аорты (стрелки). 1 — эндотелий. Ув.: а, б — 40, в — 35.

кратно описанной в литературе [11, 13]. Гранулы осадка лантана у животных 1-й группы преимущественно локализовались во внутреннем слое базальной мембраны (рис. 2, а) и лишь единичные гранулы обнаруживались в ее наружном слое, ножковых отростках и поверхности сомы подоцитов.

Исследование эндотелия гломерулярного фильтра подопытных животных. У подопытных животных 1-й группы было выражено набухание эндотелия, образование сращений, появление пиноцитозных везикул, увеличение размера фенестр и очаговое отслоение эндотелия от базальной мембраны. В базальной мембране обнаруживались участки деструкции, ножковые отростки подоцитов были местами слиты. Гранулы осадка в этой группе животных были обильно представлены в наружном слое БМ. На сохранных участках эндотелия в сравнении с нормой увеличилось число гранул на поверхности и отростках подоцитов (рис. 2, б). В зонах повреждения компонентов гломерулярного фильтра в мембране были лишь единичные гранулы осадка и практически полностью отсутствовал осадок на поверхности и отростках подоцитов (рис. 2, в).

В отличие от животных 1-й группы, во 2-й группе все три слоя базальной мембраны были заполнены гранулами осадка, в остальном локализация осадка в обеих группах была идентичной.

Исследование эндотелия капилляров сенсомоторной коры контрольных животных. В коре контрольных животных 1-й и 2-й группы эндотелий капилляров представлен уплощенными клетками приблизительно одинаковой толщины. Цитоплазма содержит редкие пиноцитозные везикулы. Гранулы осадка расположены на поверхности эндотелиальных клеток или в виде тонкого электронно-плотного слоя, или в виде крупных скоплений гранул (рис. 3, а). Межклеточные щели заполнены осадком в верхней части до плотного контакта.

Исследование эндотелия капилляров сенсомоторной коры подопытных животных. В эндотелии капилляров подопытных животных обеих групп крыс увеличилось количество пиноцитозных гранул, в том числе содержащих осадок (маркер). В эндотелиальных клетках капилляров, расположенных среди дегенеративно-изме-

ненных участков коры, гранулы маркера распределялись диффузно по всей цитоплазме, что является показателем повреждения мембран эндотелиальных клеток. Местами маркер находится в области базальной мембраны либо за пределами базальной мембраны среди измененных отростков нервных клеток (рис. 3, б).

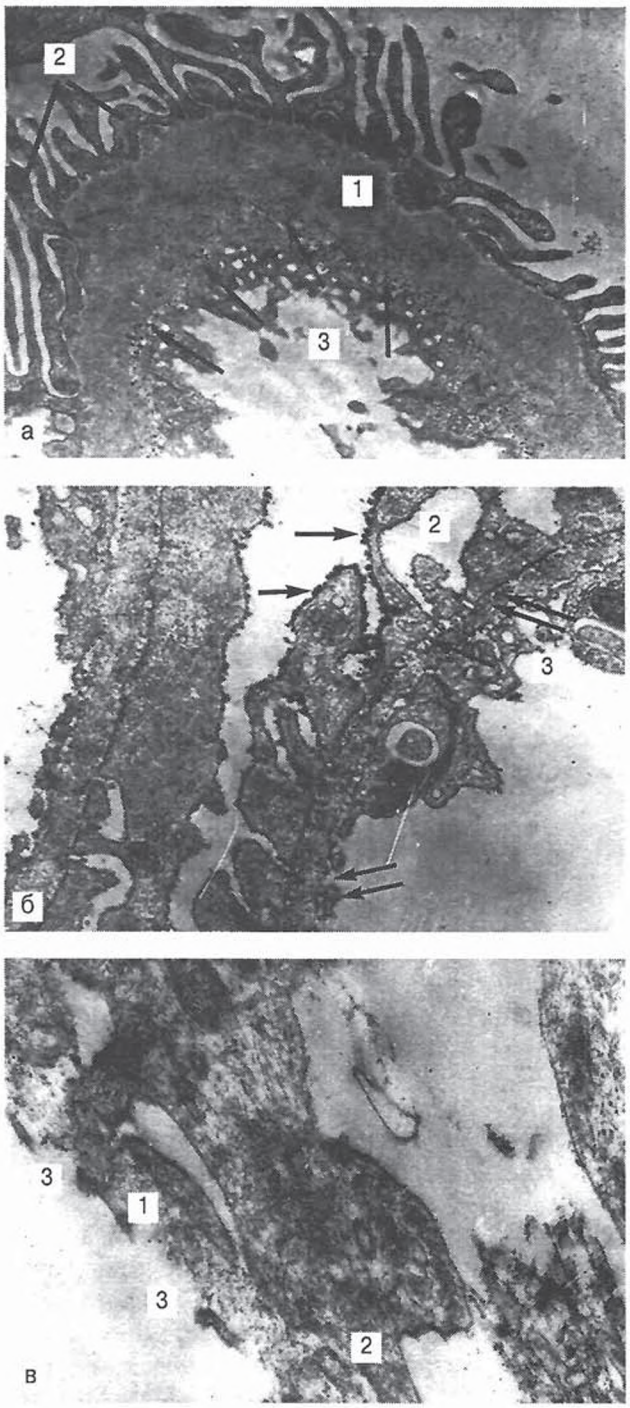

Рис. 2. Электронограммы препаратов гломерулярного фильтра почки.

а — контроль 1-й группы. Гранулы осадка в Lamina rara interna (стрелки). 1 — базальная мембрана; 2 — ножковые отростки подоцитов, 3 — фенестры эндотелия; б — опыт, 1-я группа. Гранулы осадка оседают на гликокаликсе подоцитов и анионных участках базальной мембраны (стрелки), фенестры эндотелия частично деструктурированы (двойные стрелки). 1 — базальная мембрана; 2 — ножковые отростки подоцитов; 3 — эндотелий; в — опыт, 1-я группа. Участок деструкции компонентов гломерулярного фильтра, отсутствие гранул осадка. 1 — базальная мембрана; 2 — ножковые отростки подоцитов; 3 — фенестры эндотелия. Ув. а — 30; б — 35; в — 60.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, оценка трансэндотелиальной проницаемости проводится с использованием меток, каждая из которых имеет ряд ограничений и преимуществ. Используемый нами лантан при pH 7,2–7,6 находится в виде гидроокиси лантана и частично в катионизированной форме. В связи с этим гидроксид лантана используется для оценки проницаемости гистогематических барьеров, а катионизированный ион выявляет места, где высока плотность но-

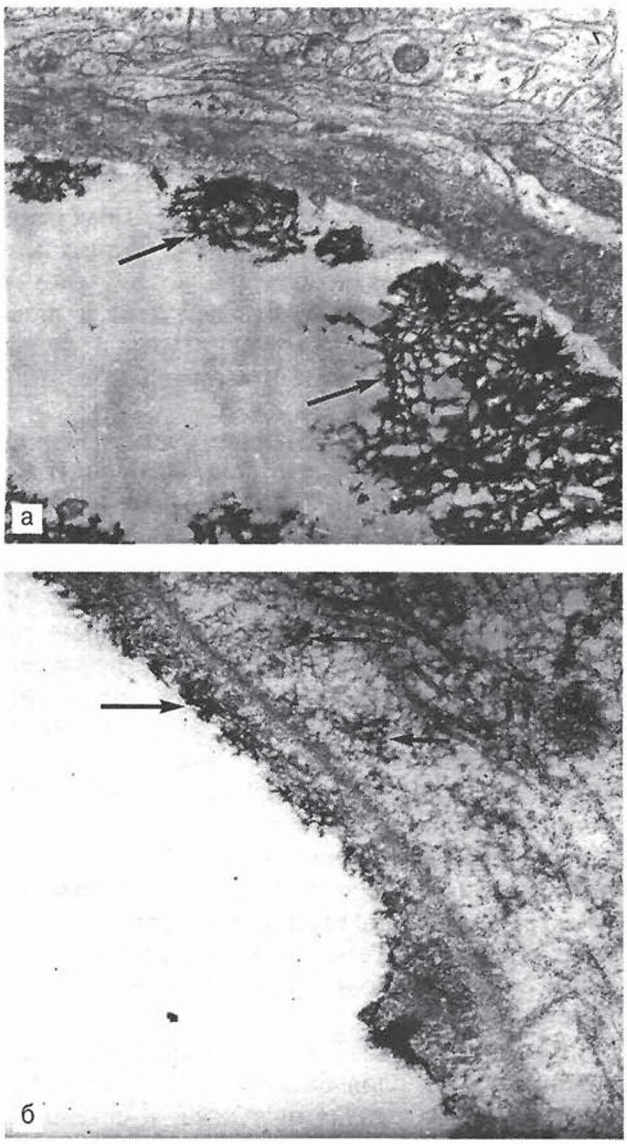

Рис. 3. Электронограммы препаратов сенсомоторной коры головного мозга.

а — контроль 1-й группы. Осадок лантана внутри капилляра (стрелки); б — опыт, 1-я группа. Осадок лантана прилегает к люминальной поверхности эндотелия и частично находится за пределами капилляра среди дегенеративно-измененных отростков нервных клеток (стрелки). Ув.: а — 30; б — 35.

сителей отрицательного заряда [6, 14, 19]. Необходимо заметить, что хлористый лантан имеет размер молекулы 20А и характеризуется их способностью образовывать агрегаты нестабильных размеров. Таким образом, результаты исследования проницаемости с помощью хлористого лантана невозможно экстраполировать непосредственно на проницаемость молекул альбумина или других высоко молекулярных соединений, однако этот метод используется в сравнительных исследованиях состояния проницаемости гистогематических барьеров.

В наших экспериментах мы полагали с помощью этого метода оценить трансэндотелиальную проницаемость и состояние гликокаликса эндотелиальных клеток аорты, гломерулярного фильтра и капилляров сенсомоторной коры. Проведенное нами исследование эндотелия аорты при развитии экспериментальной хронической почечной недостаточности с помощью лантановой метки дало возможность заключить, что уже на ранних этапах развития ХПН, когда у животных еще не регистрируется гипертензия, повышение концентрации вазоактивных веществ в крови уже может явиться причиной повреждения эндотелия. Эти наши наблюдения подтверждаются исследованиями in vitro [2], в которых удалось выявить связь между уровнем паратиреоидного гормона в крови и повышением проницаемости эндотелия брюшной аорты для альбумина.

Исследуя препараты контрольных животных, мы обнаружили массивные скопления осадка лантана на люминальной поверхности эндотелия аорты, который расценили как места скопления носителей отрицательных зарядов. Эти участки локализовались исключительно вблизи межклеточных контактов — наиболее уязвимых местах в отношении нарушения проницаемости для крупных молекул. У подопытных животных той же группы, у которых не было зарегистрировано повышение АД, обнаруживалось уменьшение мест скопления отрицательных зарядов вблизи межклеточных контактов, что свидетельствует об уменьшении отрицательного заряда гликокаликса эндотелия. Устья контактов были расширены и в отличие от контрольных животных можно было наблюдать везикулы, содержащие метку, а также гранулы лантана в субэндотелиальных слоях. У контрольных животных 2-й группы, у которых было зарегистрировано повышение АД и имело место изменение величины и поверхности клеток эндотелия, скопления зарядов вообще выявлены не были, что можно рассматривать как доказательство значительного снижения отрицательного заряда гликокаликса или его утраты при развитии гипертензии. У подопытных животных 2-й группы с тем же уровнем артериального давления изменения эндотелия имели ту же направленность, но степень выраженности изменений была значительно выше, а также выявлялась метка в субэндотелиальном слое. Эти данные позволяют полагать, что при развитии экспериментальной почечной недостаточности в сочетании с гипертензией значительно больше выражены изменения эндотелия как в отношении формы и размера клеток, так и функциональных свойств.

Хотя используемая метка при перфузии лантаном в связи с небольшими и нестабильными размерами агрегатов молекул не позволяет экстраполировать результаты исследования проницаемости лантана непосредственно на проницаемость для белка, тем не менее дает возможность высказаться в пользу механизма нарушения проницаемости — за счет снижения отрицательного заряда гликокаликса, расширения апикальных отделов межклеточных щелей и усиления везикулярного транспорта.

При исследовании проницаемости гематоэнцефалического барьера было показано (Н.В.Томилин, неопубликованные данные), что только фенестрированный эндотелий (area postrema) проходим для лантановой метки в отличие от капилляров других отделов мозга. Поскольку эндотелий капилляров гломерул также фенестрирован, мы полагали, что гломерулярный фильтр почки контрольных животных окажется проходимым для лантана. Однако у контрольных животных только небольшая часть метки обнаруживалась в просвете боуменовой капсулы, возможно, представляя собой катионизированную часть осадка, прохождение которого через барьер облегчено по признаку наличия положительного заряда. Та часть метки, которая выявлялась на подоцитах, видимо также относится к катионизированной части лантана и одновременно позволяет оценить степень сохранности отрицательного заряда на поверхности подоцитов (степень сохранности гликокаликса). Основная часть осадка у контрольных животных не могла преодолеть плотный слой мембраны — основной барьер для проникновения молекул [5] и локализовалась во внутреннем слое базальной мембраны.

У подопытных животных обеих групп большая часть осадка прошла через фильтр и обнаруживалась на сохранных ножковых отростках подоцитов, а также на эндотелии перитубулярных капилляров и цитолеммальных складках канальцев. Участки выраженной деструкции фильтра полностью пропускали лантан. Практически полное отсутствие оседания гранул осадка на деструктурированных подоцитах, мембране и эндотелии свидетельствует о сниже-

нии заряда гликокаликса в этих участках. Такие участки наблюдались у крыс преимущественно в периферических петлях клубочков (ближе к сосудистому полюсу). Этот факт можно объяснить тем обстоятельством, что при развитии внутриклубочковой гипертензии, которая имеет место при субтотальной нефрэктомии, в первую очередь страдают капилляры вблизи сосудистого полюса [11, 13]. В отличие от 1-й группы, у животных 2-й группы все три слоя базальной мембраны были заполнены осадком. Механизм этого явления не ясен. В целом характер распределения осадка у животных 2-й группы имел значительное сходство с 1-й группой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные сопоставления проницаемости эндотелия гломерулярного фильтра, эндотелия аорты и сенсомоторной коры при экспериментальной ХПН, проведенные с помощью метки хлористым лантаном, показали, что нарушения барьерной функции эндотелия носят системный характер и усугубляются развитием гипертензии.

Результаты исследования эндотелия капилляров коры головного мозга могут быть истолкованы как свидетельствующие об увеличении проницаемости гематоэнцефалического барьера.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Войно-Ясенецкая Т.А., Стенина О.И., Репин В.С. и др. Рецепторопосредованные повреждения эндотелия перфузируемой аорты кролика и человека // Вестн. АМН СССР.—1988.—Т. 2.—С. 89–93.

2. Тимошенко Т.Е., Пархоменко Т.В., Мягкова Л.М. Действие эритропоэтина на проницаемость стенки брюшной аорты для белка // Журн. экспер. биол. и мед.—1997.—№ 6.—С. 614–616.

3. Babior B.M. NADPH oxidase. An Update (review) // Blood.—1999.—Vol. 93, № 5.—P. 1464–1476.

4. Batten J.R., Neuman D.L. Influence of state and oscillatory pressure / strain on ^{131}I albumin by the wall of the isolated pig thoracic aorta // Cardio-Vasc. Res.—1980.—Vol. 14, № 10.—P. 590–600.

5. Batsford S.R., Rohbach R., Vogt A. Size restriction in the glomerular capillary wall: importance of lamina densa // Kidney Int.—1987.—Vol. 31, № 3.—P. 710–717.

6. Behnke O. Electron microscopical observation on the surface coating of human blood platelets // J. Ultrastruct. Res.—1968.—Vol. 24.—P. 51–69.

7. Boyd M., Mazkle R., Welford I. Substance P (SP) prompts increases of rat aortic permeability to albumin // FASEB J.—1989.—Vol. 3, № 3.—P. A306.

8. Connoly D.T. Regulation of vascular function by vascular permeability factor // In: Vascular endothelium.—1991.—Vol. 208.—P. 69–76.

9. Deckert T., Feldt-Rasmussen B., Borch-Johnsen K. et. al. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis // Diabetologia.—1989.—Vol. 32, № 4.—P. 219–226.

10. Jones S.L., Viberti G.C. Hypertension and microalbuminuria as predictors of diabetic nephropathy // Diabete et metabol.—1989.—Vol. 15, № 5.—P. 327–332.

11. Kriz W., Kretzler M., Nagata V. et al. A frequent pathway to glomerulosclerosis: deterioration of tuft architecture-podocyte damage — segmental sclerosis // Kidney Blood Press Res.—1996.—Vol. 19.—P. 245–253.

12. Kubes P.G., Grange D.N. Nitric oxide modulates microvascular permeability // Amer. J. Physiol.—1992.—Vol. 262.—P. H. 611–615.

13. Olson T.L., Hosteller T.U., Rennke M.C., et al. Altered glomerular permeselectively and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass // Kidney Int.—1982.—Vol. 22.—P. 112–117.

14. Overston J. Localized lanthanum staining of the intestinal brush border // J. Cell Biol.—Vol. 38.—P. 447–452.

15. Peach M.J., Loeb A.L. Changes in vascular endothelium and its function in systemic arterial hypertension // Amer. J. Cardiol.—1987.—Vol. 60, № 17.—P. 110–115.

16. Raz I., Havivi J., Yarom R. Reduced negative surface charge on arterial endothelium of diabetic rats // Diabetologia.—1988.—Vol. 31.—P. 618–620.

17. Reddy H.K., Sigush H., Lhow G. et. al. Coronary vascular hyperpermeability and angiotensin II // Lab. Clin. and Med.—1995.—Vol. 126.—P. 307–315.

18. Schaeffer R.C., Fangehens G., Michgel S.B. et al. Thrombin and bradykinin initiate discrete endothelial solute permeability mechanismss // Amer. J. Physiol.—1993.—Vol. 264, № 6.—P. 12 H. 1798–1809.

19. Tischer C.C., Yarger W.E. Lanthanum permeability of tight junction along the collecting duct of the rat // Kidney Int.—1975.—Vol. 7.—P. 35.

20. Wu-Wong J.R., Chiou D.J., Heffman D.J. et al. Endothelins and endothelin receptor antagonists: binding to plasma proteins // Life Sci.—1996.—Vol. 58, № 21.—P. 1839–1847.

Поступила в редакцию 17.02.2000 г.