

© Н.А. Гавришева, А.В. Федулов, Л.О. Анисимова, Г.В. Кованько, 2002
УДК [616.61-008.64-036.12:616.71-002.27].001.57

Н.А. Гавришева, А.В. Федулов, Л.О. Анисимова, Г.В. Кованько

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕЧЕНИЯ РЕНАЛЬНОЙ ОСТЕОДИСТРОФИИ В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С ОРИГИНАЛЬНОЙ МЕТОДИКОЙ МОДЕЛИРОВАНИЯ

N.A. Gavrishcheva, A.V. Fedulov, L.O. Anisimova, G.V. Kovanko

CHARACTERIZATION OF RENAL OSTEODYSTROPHY IN CHRONIC RENAL FAILURE WITH AN ORIGINAL MODELING TECHNIQUE

Кафедра патофизиологии Санкт-Петербургского Государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, патологоанатомическое отделение Российского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

Изучены морфологические особенности изменения метаболизма костной ткани в ходе развития экспериментальной хронической почечной недостаточности, которые согласованы с нарушениями кальциевого обмена, выявленными биохимическими методами. С помощью морфометрического анализа исследована динамика развития ренальной остеодистрофии при хронической почечной недостаточности аутоиммунного генеза. Показано, что изменения в губчатой и трубчатой кости протекают по типу низкообменной ренальной остеодистрофии.

Ключевые слова: хроническая почечная недостаточность, костные изменения, ренальная остеодистрофия, щелочная фосфатаза

ABSTRACT

Morphometry was used to investigate the development of changes of bone metabolism depending on the stage of experimental chronic renal failure with original modeling technique that allows achievement of autoimmune process in the kidneys. The morphometry findings conform well to the disorders of calcium metabolism detected biochemically. Evidence is found that bone changes are in line with the features of low metabolism renal osteodystrophy.

Key words: chronic renal failure, bone metabolism, renal osteodystrophy, alkaline phosphatase.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что типичными изменениями, развивающимися в организме больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), являются изменения костной ткани, называемые в клинике ренальной остеодистрофией (РОД). Обычно клинически манифестными эти изменения становятся только на конечных стадиях почечной патологии, поэтому до использования почечного диализа ренальная остеодистрофия как клинический синдром возникает редко: пациенты умирают до развития тяжелых костных изменений. Изучение особенностей возникновения и течения РОД в зависимости от характера ХПН, а также от стадии данного заболевания, имеет большое значение для понимания механизмов развития этой патологии, следовательно, его профилактики и лечения.

Одним из наиболее часто используемых методов моделирования хронической почечной недостаточности ХПН является методика уда-

ления 5/6 почечной массы. [4] Различия в способах моделирования обычно заключаются в методе воздействия на остающуюся почку, известен ряд методов для выключения из функционирования 2/3 ткани второй почки [3]. В настоящее время в основном применяют методику 5/6 нефрэктомии по A.Chanutin и E.B. Ferris [2].

Неоднократно было показано, что как гистологические, так и функциональные изменения в организме животных с ХПН зависят от используемой методики моделирования и имеют специфические особенности [3, 4].

Нами была предложена модель индукции ХПН с применением электрокоагуляции 25% коркового вещества почки. За счет модификации антигенов коркового слоя почки в процессе электрокоагуляции данная методика позволяет моделировать ХПН, развивающуюся в результате прогрессирующего аутоиммунного процесса [1].

Задачей данного исследования явилось изучение динамики изменений в костной ткани, а также определение показателей минерального обмена — содержания щелочной фосфатазы и ионов кальция в сыворотке крови крыс при развитии у них экспериментальной почечной недостаточности на сроках развития 2 и 6 месяцев. Особенно важным представлялось изучение наиболее представительного пула костных клеток — остеоцитов и их функции на ранней стадии развития ХПН (2 месяца), т. к. в превентивно-терапевтическом смысле данная стадия представляется наиболее важной для изучения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на беспородных крысах-самцах массой 150-230 г (питомник «Рапполово» РАМН, Санкт-Петербург). Моделирование ХПН осуществлялось путем левосторонней нефрэктомии с одновременной электрокоагуляцией 25% коркового вещества правой почки. В качестве критериев оценки развития ХПН у крыс использовали содержание креатинина в сыворотке крови, а также систолическое артериальное давление, измерение которого проводилось кровавым способом. Животные выводились из эксперимента через 2 месяца ($n=22$) и 6 месяцев ($n=25$) после проведения операции на почках. В качестве контроля использовали интактных животных ($n=20$).

Для гистологического исследования кусочки почечной ткани после фиксации в 10% нейтральном формалине заливались в парафин. Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином-эозином, а также по Ван-Гизон, Джонсу и Массону. Анализ морфофункциональных изменений ткани почек проводили через 2 месяца ($n=8$) и 6 месяцев ($n=11$) после проведения операции на почках.

Для гистологического исследования хряща и костной ткани у животных забирались блоком коленные суставы с костями голени. Препараты фиксировались в формалине, декальцинировались в растворе органической кислоты (трилон-В) и промывались в воде. Приготовление препаратов проводилось по общепринятой методике с заливкой в парафин. При проведении световой микроскопии использовали срезы толщиной 7 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином. Количественный морфометрический

Динамика артериального давления и содержания креатинина в плазме крови животных на различных сроках развития ХПН ($\bar{X} \pm m$)

Параметр	Контроль	ХПН 2 мес.	ХПН 6 мес.	Достоверность, по сравнению с контролем
Креатинин плазмы крови, ммоль/л.	0,046 $\pm$ 0,004	0,075 $\pm$ 0,011	0,08 $\pm$ 0,01	$P < 0.05$
Артериальное давление, мм. рт. ст.	100,1 $\pm$ 0,3	123,9 $\pm$ 11,3	125 $\pm$ 10	$P < 0.05$

анализ костной ткани проводился на основе программно аппаратного комплекса анализа цифрового видеоизображения, полученного с помощью светового микроскопа «Биолам-И» и телекамеры. Морфометрический анализ проводился в полуавтоматическом режиме, для подсчета количества клеток очерчивались не контуры цитоплазмы, которая очень скудна, а контуры ядер, подсчитывали их общую и среднюю площадь, а также общее и среднее количество остеоцитов. Оценивались срезы, полученные из кортикальной пластинки большеберцовой кости на уровне ее верхней и средней трети и из губчатой кости ее проксимального эпифиза.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы MS Excel из пакета MS Office 97, а также программного пакета StatSoft Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты измерения артериального давления и креатинина плазмы крови в ходе развития ХПН приведены в табл. 1.

Морфология почечной ткани. Морфологическое изучение ткани почек на начальных этапах развития ХПН (2 месяца) характеризуется развитием неспецифических изменений изученных компонентов ткани почек. На более поздних сроках эксперимента было выявлено, что прогрессирование ХПН связано со специфическими повреждениями гломерулярного аппарата почек. Патологический процесс приобретает признаки аутоиммунного характера с развитием мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита. На сроке ХПН 6 месяцев структурные изменения ткани почек отражают аутоиммунное повреждение гломерулярного аппарата с развитием лобулярного и диффузного гломерулосклероза.

Морфология костной ткани. Морфологическая картина кости контрольных животных полностью соответствует норме. Остеоциты компактной кости имеют удлиненную форму с вытянутым или овальным ядром, располагаются равномерно между костными пластинками,

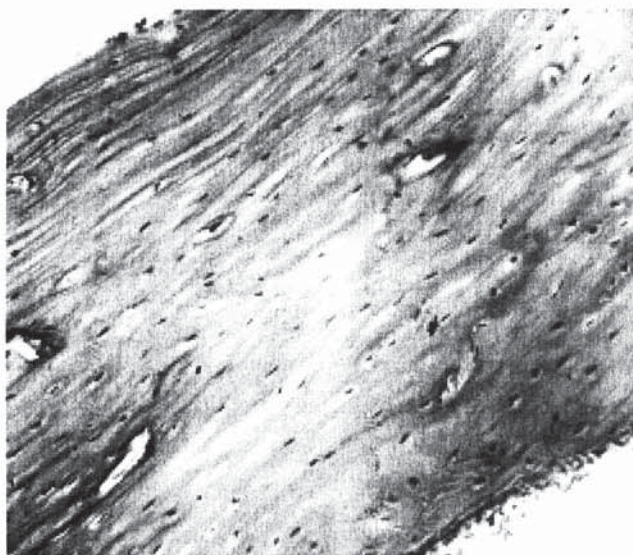


Рис. 1 Кортикальная пластинка – ХПН 2 мес. Заметны очаги просветления матрикса, уменьшение числа клеток. Окраска гематоксилином и эозином, x120.

разделенными базофильными (цементными) линиями. Они лежат в узких лакунах, более отчетливо выявляющихся на большом увеличении микроскопа. Гаверсовы каналы – вдоль, а фолькмановские – поперек оси – прободают их, снабжая костное вещество кровеносными сосудами и волокнами вегетативной нервной системы. Со стороны эндоста отчетливо видны выступающие клетки, местами имеющие цилиндрическую форму, роднящую их с остеобластами.

К концу первых 2 месяцев после операции в кортикальных пластинках развиваются заметные уже при световой микроскопии изменения: остециты располагаются неравномерно из-за появления бесклеточных участков, встречаются клетки с пикнотичными ядрами (рис. 1). Происходит расширение клеточных лакун вокруг некоторых остецитов, т.е. прослеживаются явления остеоцитарной резорбции. Бледнеет и становится неравномерной окраска матрикса, как и базофильных линий, сохраняющих более яркую окраску под надкостницей. Местами в матриксе наблюдается демаскирование и обнажение костных пластин.

Через 6 месяцев после начала эксперимента дистрофические изменения компактных костей нарастают: увеличиваются бесклеточные участки, лакуны расширяются, увеличивается число клеток с пикнотичными ядрами и пустых лакун. Неравномерно окрашенный матрикс в толще кортикальной пластинки местами расщепляется и рассасывается, основное вещество в очагах рассасывания слабобазофильно (рис. 2). Эндостальная и периостальная поверхности становятся волнистыми, и выступающие клетки со стороны эндоста прослеживаются не везде.

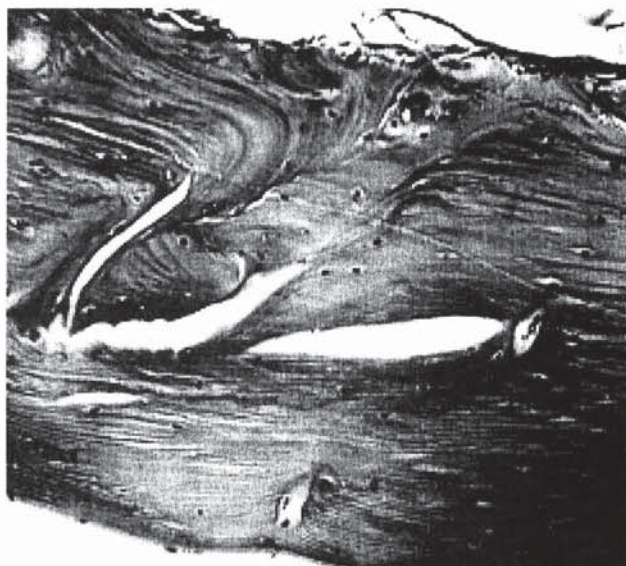


Рис. 2. Кортикальная пластинка – ХПН 6 мес. Резко выражено расщепление матрикса (костных пластинок), уменьшение числа остецитов. Окраска гематоксилином и эозином, x120.

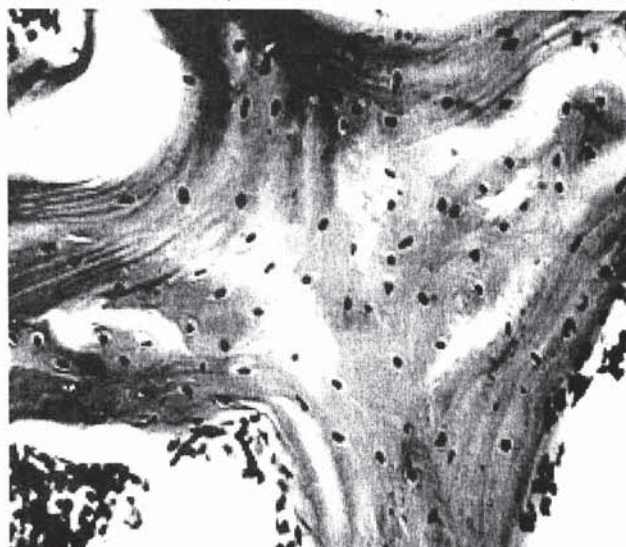


Рис. 3. Губчатая кость – 2 месяца ХПН. Заметны очаги просветленного матрикса, пустые клеточные лакуны. Окраска гематоксилином и эозином, x120.

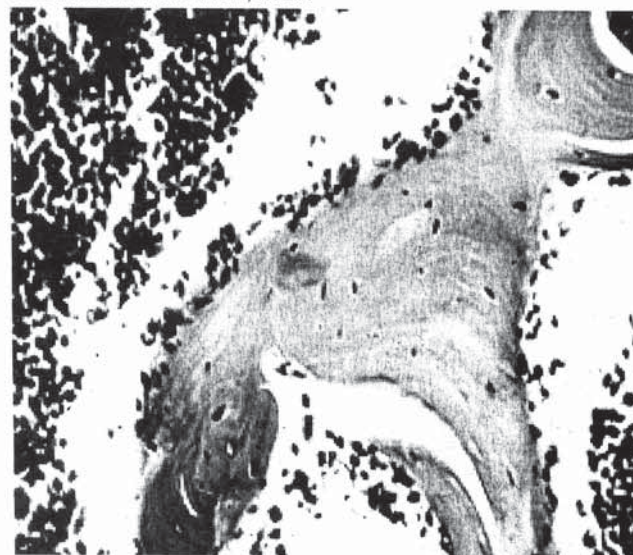


Рис.4. Губчатая кость – 6 мес. ХПН. Заметно редкое расположение остецитов, часть клеток с пикнотичными ядрами, матрикс неравномерно просветлен. Окраска гематоксилином и эозином, x120.

Таблица 2

Результаты морфометрического анализа кортикальной кости и губчатой кости крыс в динамике развития ХПН ($\bar{X} \pm m$)

Параметр	Контроль	ХПН срок 2 м.	ХПН срок 6 м.	Достоверность по сравнению с контролем
Количество ядер остеоцитов кортикальной кости, шт.	4,2±0,3	2,54±0,2	2,13±0,15	P<0.05
Средняя площадь остеоцитов кортикальной кости, мкм ²	14,76±0,44	16,61±0,64	11,72±0,65	P<0.05
Количество ядер остеоцитов губчатой кости, шт.	7,9±0,6	3,9±0,6	3,1±0,3	P<0.05
Средняя площадь остеоцитов губчатой кости, мкм ²	15,55±0,84	15,96±0,97	17,46±1,14	P<0.05

Таблица 3

Динамика содержания ионизированного кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс в ходе развития ХПН ($\bar{X} \pm m$)

Параметр	Контроль	ХПН 2 мес.	ХПН 6 мес.	Достоверность по сравнению с контролем
Щелочная фосфатаза сыворотки крови, мкмоль/л	0,047±0,004	0,04±0,014	0,029±0,003	P<0.05
Кальций ионизированный сыворотки крови, мкмоль/л	1,62±0,36	1,41±0,1	0,57±0,51	P<0.05

В норме остециты губчатой кости также равномерно располагаются в матриксе, но имеют более округлое и крупное ядро и лакуны, чем в компактной кости. Матрикс интенсивно равномерно зоинофилен. Балки ограничены выстилающими клетками, местами имеющими цилиндрическую форму и проявляющими остеобластическую активность.

Через 2 месяца почечной недостаточности в толще балок проявляются очаги пониженной оксифилии, пустые клеточные лакуны, в результате чего клетки – остециты – располагаются неравномерно (рис. 3). По периферии балок снижается количество остеобластов и выстилающих клеток. На значительных участках наблюдается расщепление балок вдоль костных пластинок, возможно, за счет неравномерного рассасывания матрикса.

Через 6 месяцев дегенеративные изменения балок нарастают: трабекулы представляются истонченными, расщепленными на значительном протяжении за счет увеличения щелевидных полостей, число остеоцитов заметно снижается, параллельно увеличивается количество пустых клеточных лакун. Иногда вокруг остеоцитов наблюдается расширение клеточной лакуны (рис 4). По периферии балок встречаются единичные клетки остеобластического типа, но выработки остеоида не отмечается. При этом число остеобластов не увеличивалось, и они не выявлялись на поверхности костных балок, как и остеокласты.

Морфометрический анализ. Морфометрический количественный анализ выявил следующие

и прогрессии дистрофических изменений костной ткани. Это выражается уменьшением числа остеоцитов (ядер) как в кортикальной пластинке, так и в губчатой кости, что сопровождается снижением уровня ионизированного кальция и щелочной фосфатазы сыворотки крови (табл. 3). Следует обратить внимание на резкое падение числа клеток в первые 2 месяца, после чего оно шло медленнее.

Интересная тенденция прослеживается при подсчете площади ядер. Так, в кортикальной пластинке площадь ядер увеличивается ко 2-му мес., и резко падает к 6-му мес. ХПН, в то время как в губчатой кости площадь ядер в первые 2 месяца почти не изменяется, а к 6 месяцам увеличивается.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты по динамике морфологических изменений ткани почек на разных сроках эксперимента позволяют предположить, что инициирование развития ХПН в данном случае, вероятно, связано с неспецифическим повреждением, а прогрессирование – с аутоиммунным механизмом. Аутоагрессия в данной модели, вероятно, обусловлена тем, что коагуляционный некроз паренхимы почек изменяет антигенные свойства структурных компонентов клубочков, что ведет к иммунному повреждению почки, хронизации воспалительного процесса и прогрессированию склеротического процесса.

Существует две основные гистологические формы РОД: высокообменная и низкообменная

изменения со стороны ядер остеоцитов в кортикальной пластинке и в губчатой кости (табл. 2).

Цифровые данные подтверждают и конкретизируют видимую при микрокопии картину, свидетельствующую о наличии

костная болезнь (третья форма является смешанной). Высокообменная РОД характеризуется исключительно высокой клеточной (остеобластической и остеокластической) активностью, что проявляется образованием незрелой костной ткани и фиброзом костного мозга, а также появлением резорбционных полостей. Эта форма РОД связана с развитием у больных вторичного гиперпаратиреоидизма (2 ГПТ), приводящего к повышению уровня паратиреоидного гормона (ПТГ) в крови. Низкообменная РОД, возникающая при низких концентрациях ПТГ в крови, встречается у 5 – 25% больных. Костные нарушения характеризуются отсутствием активности костных клеток – остеобластов и остеокластов и развитием остеопении. Действие паратиреоидного гормона на кость осуществляется через костные клетки – остеобласты и остеокласты, имеющие рецепторы к этому гормону.

В наблюдаемом случае изменения соответствуют низкообменному типу РОД. Ни в одном случае мы не наблюдали ни фиброзирование костного мозга, ни остеокластической резорбции, ни отложения остеоида остеобластами, что характерно для картины высокообменной РОД.

Следует отметить резкое падение числа остеокластов в первые 2 месяца, после чего оно шло медленнее. Это может свидетельствовать, с одной стороны, об истощении остеокластного пролиферативного пула в условиях развившейся ХПН, что подтверждается отсутствием предшественников остеокластов – остеобластов на поверхности костной ткани. С другой стороны, это может говорить о включении компенсаторного механизма, не допускающего дальнейшего уменьшения числа клеток.

В связи с уменьшением минерализации уменьшается прочность кости, убывает число остеокластов. В проведенном исследовании при развитии ХПН стимуляции к пролиферации остеобластов не происходит, поэтому количество остеокластов не восполняется, а запрограммированная смерть их – апоптоз – продолжает вовлекать новые клетки. Учитывая, что главная функция диафиза – механическая, можно предположить, что в условиях обычной физической активности крыс компенсация убыли остеокластов в первые 2 месяца происходит за счет увеличения их размеров, что позволяет сохранить целостность мембрано-остеокластной системы.

В губчатой кости тот же процесс в ней наблюдается к концу 6-го мес., поскольку основная функция губчатой кости, помимо кроветворной, – обменная, а не опорная, то адаптивные процессы в ней разви-

ваются медленнее, что и проявляется увеличением размеров ядер остеокластов к 6-му месяцу.

Как видно из табл. 3, по мере прогрессирования ХПН в сыворотке крови наблюдалось к 6 месяцам снижение уровня кальция и щелочной фосфатазы, что свидетельствовало о значительном уменьшении интенсивности кальциевого обмена, и предположительно об отсутствии признаков вторичного гиперпаратиреоидизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наблюдаемая нами картина дистрофических изменений костной ткани отражает, по-видимому, начальную степень нарушения обмена кальция, не осложненную развитием вторичного ГПТ. Полученные данные согласуются с данными исследований ряда авторов, изучивших показатели костного обмена и характеристики костной ткани при разном уровне ГПТ [5, 9]. Снижение активности щелочной фосфатазы, как продукта деятельности остеобластов и маркера костного метаболизма согласуется с отмеченным нами уменьшением числа остеокластов.

Данное исследование демонстрирует сложность регуляции костного метаболизма и необходимость дальнейшего изучения роли остеокластов, как наиболее представительной группы костных клеток в процессах минерального обмена.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гавришева Н. А., Ягмуров О. Д., Ботина А. В., Эммануэль В. Л.. Экспериментальная модель хронической почечной недостаточности // Нефрология. - 2001. - Т. 5. № 2. - С.
2. Chanutin, A., Ferris, E.B. Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy// Arch. Intern. Med. - 1932. - Vol. 49. - P. 767-787.
3. Gretz N., Meisinger E., Strauch M.. Partial nephrectomy and chronic renal failure: the «mature» rat model // Contr. Nephrol. - 1988. - Vol. 60. - P. 46-55.
4. Gretz N., Meisinger E., Waldherr R., Strauch M.. Acute renal failure after 5/6 nephrectomy: histological and functional changes// Contr. Nephrol. - 1988. - Vol. 60. - P. 56-63.
5. Fletcher S., Jones R. G., Reijnen H. C.. Assessment of renal osteodystrophy in dialysis patients// Nephron. - 1997. - Vol. 75. - P. 412-419.
6. Kraft K., Barsotti G., Giovannetti S. et al. Renal bone disease in chronic uremic rats// Contr. Nephrol. - 1988. - Vol. 60. - P. 214-219.
7. McCarthy E. F., Frassica F. J. Pathology of Bone and Joint Disorders. - Philadelphia, 1998. - P. 29-30, 83-87.
8. Mehls O., Ritz E., Gilli G., Wingen A. M.. Osteodystrophy in experimental uremia// Contr. Nephrol. - 1988. - Vol. 60. - P. 207-213.
9. Miller M. A., Chin J., Miller S. C., Fox J.. Disparate effects of mild, moderate, and severe secondary hyperparathyroidism on cancellous and cortical bone in rats with chronic renal insufficiency// Bone. - 1998. - Vol. 23. - P. 257-266.
10. Moscovici A., Bernheim J., Popovtzer M. M., Rubinger D. Renal osteodystrophy in rats with reduced renal mass// Nephrol. Dial. Transplant. - 1996. - Vol. 11, Suppl. 3. - P. 146-152.

Поступила в редакцию 01.10.2002 г.