

На правах рукописи

Акименко Марина Анатольевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЯ НЕФРОНА ПРИ
ОДНОСТОРОННЕЙ ОБСТРУКЦИИ ВЕРХНИХ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ
ПУТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону - 2023

Работа выполнена на кафедре медицинской биологии и генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Колмакова Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Морозова Ольга Леонидовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры патофизиологии

Власова Татьяна Ивановна – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета 24.2.318.01 в Институте «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» по адресу: 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» по адресу: 295051, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7 и на сайте: <http://cfuv.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета 24.2.318.01
доктор медицинских наук, доцент

Зяблицкая Евгения Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Согласно данным ВОЗ болезни мочевыводящих органов занимают 7-е место и составляют 2,5–3% всех причин смертности [Piccoli G.V. et al., 2018]. Анализ распространенности мочекаменной болезни в России с 2005 по 2020 гг. показал, что с течением времени наблюдается четкая тенденция к увеличению количества случаев данных заболеваний [Каприн А.Д. и др., 2022]. Острое повреждение почек (ОПП) характеризуется быстро прогрессирующей дисфункцией органа, которая нередко заканчивается развитием хронической болезни почек (ХБП) [Морозова О.Л., 2019]. В России опубликованы единичные работы в области морфологической диагностики заболеваний почек, изучения механизмов и факторов риска возникновения и прогрессирования острого повреждения почек, а также молекулярно-генетических механизмов развития ХБП [Вялкова А.А., 2008, Сигитова О.Н., 2008, Смирнов А.В. с соавт., 2014]. Основная проблема обструктивных уропатий (ОУ) – длительный бессимптомный период и сложности ранней клинико-лабораторной диагностики, что является причиной необратимых повреждений почки [Yang S.W. et al., 2020, Nagalakshmi V.K. et al., 2018]. По современным представлениям, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является одним из факторов ремоделирования почечной ткани и может рассматриваться как один из механизмов повреждения нефрона в патогенезе ОУ [Lee C.H., 2019, Thomson T.M., et al., 2019, Kang H., et al., 2019]. Общепринятая диагностика ОУ ограничена общедоступными клиническими исследованиями структуры почек (УЗИ почек), их функции (концентрация креатинина в сыворотке крови и экскреция альбумина с мочой и др.) [Schmid M., et al., 2015] и направлена на выявление обструкции, однако не отражает структурное состояние обструктивного и функциональный резерв компенсаторного органов. Следовательно, важна ранняя диагностика ХБП для профилактики и лечения данных заболеваний [Luysckx V.A. et al., 2020].

С учетом высокой социальной значимости ОУ, как заболевания приводящего к инвалидизации молодого трудоспособного населения, необходима комплексная оценка общеклинических, биохимических, морфологических, морфометрических и молекулярных маркеров поражения почек. В связи с этим, актуальным является изучение данной патологии в динамике на экспериментальной модели механической обструкции.

Цель исследования – установить адаптационные механизмы и патогенетические изменения нефрона обструктивной и контралатеральной почек в динамике экспериментальной односторонней обструкции мочеточника (ООМ).

Задачи исследования:

1. Изучить клинико-лабораторные показатели, уровень эндогенной интоксикации (ЭИ) и общесоматическое состояние экспериментальных животных в динамике развития односторонней обструкции мочеточника.

2. Провести сравнительное изучение структурных изменений в ткани обструктивной и контралатеральной почек в различные периоды односторонней обструкции мочеточника.

3. Определить наиболее чувствительные маркеры развития необратимых нарушений в обструктивной почке.

4. Изучить взаимосвязь и различия между изменениями в нефроне поврежденной почки и компенсаторными процессами в нефроне контралатеральной почки в динамике односторонней обструкции мочеточника.

5. Выявить взаимосвязь между уровнем ЭИ, клинико-лабораторными показателями и степенью патогенетических изменений в ткани обструктивного органа в динамике односторонней обструкции мочеточника.

Научная новизна исследования. При экспериментальном моделировании односторонней обструкции мочеточника *in vivo* впервые показана динамика изменений фенотипа эпителия канальцевой части нефрона контралатеральной почки и ее значение для установления сроков декомпенсации, как ключевого патогенетического звена при длительной обструкции парного органа.

Выявлена связь соматических проявлений и клинико-лабораторных показателей у экспериментальных животных с динамикой патологических изменений в обструктивной и компенсаторными процессами в контралатеральных почках при односторонней обструкции мочеточника.

Установлено значение компенсаторного почечного роста, проявляющегося увеличением элементов нефрона, в частности, площади сосудистого клубочка нефрона, диаметра проксимального канальца за счет высоты его эпителия, увеличением высоты эпителия дистального канальца, в усилении функций контралатеральной почки в динамике односторонней обструкции мочеточника *in vivo*.

Продемонстрирована динамика трансформации эпителия канальцевой части нефрона обструктивной и контралатеральной почек, которая проявляется изменением формы эпителиоцитов, их апикальным сужением и нарушением плотных контактов между эпителиоцитами.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе показана патогенетическая роль изменений свойств эпителия нефрона и структурные адаптации ткани обструктивной почки в динамике эксперимента. Установлена последовательность структурных изменений в контралатеральной почке, обеспечивающих поддержание гомеостаза в условиях односторонней обструкции мочеточника. Полученные результаты исследования расширили знания о патогенетических механизмах развития ХБП на фоне односторонней обструкции мочеточника.

Практическая значимость работы заключается в установлении начала процесса декомпенсации, поскольку переход гипертрофированных нефронов контралатеральной почки к атрофии и фиброзу является уже неадаптивным. Изучение ранних молекулярно-биологических маркеров ЭМП открывает перспективы для развития таргетной терапии фиброза почки. Полученные данные могут являться основой для проведения дальнейших исследований

направленных на создание новых подходов в лечении хронической почечной дисфункции при ООМ и найдут свое применение в практической работе патологоанатомов, нефрологов, урологов при диагностике, лечении и профилактике ХБП.

Методология и методы исследования. Методологической основой работы является научный эксперимент, системность и междисциплинарность, выраженная в подборе широкого спектра методов исследования, а также классический сравнительный математический подход оценки числовых показателей измерений в контрольной и основных группах. Исследование выполнено на 27 беспородных кроликах-самцах, разделённых на 4 группы: контрольная – ложнооперированные кролики (ЛО) (n=9) и три опытных группы, I группа – полная механическая обструкция левого мочеточника сроком 7 суток (n=6), II группа - 14 суток (n=6), III группа - 21 сутки (n=6). Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей, Федерацией европейских ассоциаций по науке о лабораторных животных и Международным советом по науке о лабораторных животных. Методы, используемые в работе, включали в себя моделирование экспериментального воздействия, клиничко-лабораторные, биохимические, морфологические, морфометрические, иммуногистохимические (ИГХ) и статистические исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Появление соматических и общеклинических признаков нарушения гомеостаза отмечается при патологических явлениях в обструктивной почке и дистрофических изменениях в контралатеральной почке.

2. Повышение нагрузки на контралатеральную почку в острую фазу обструкции до 14 дней не отражается на ее морфофункциональном состоянии, что позволяет поддерживать основные показатели работы мочевыводящей системы и соматическое состояние экспериментальных животных в пределах нормы.

3. Появление маркеров ЭМП является предиктором нарушения функций нефрона при односторонней обструкции мочеточника, на что указывает изменение фенотипа клеток нефрона как в обструктивной, так и в контралатеральной почках.

4. В условиях односторонней обструкции мочеточника дополнительная функциональная нагрузка на контралатеральную почку выполняется за счет гипертрофии клеток нефрона (увеличения площади сосудистого клубочка нефрона, увеличения диаметра проксимального канальца и высоты его эпителия, увеличения высоты эпителия дистального канальца).

5. Повышение содержания продуктов ЭИ и свободнорадикального окисления начинает регистрироваться при дистрофических изменениях в контралатеральной почке и на фоне выраженных структурных повреждений в

обструктивной почке, а их определение может служить ранним маркером начала формирования острого повреждения почек.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом проведенных экспериментальных исследований с использованием высокотехнологичного оборудования, современных макроскопических, морфологических, молекулярно-биологических, биохимических и общеклинических методов, соответствующих цели и задачам проведенного исследования.

Материалы и результаты исследований представлены на 10 научных мероприятиях: межрегиональной научно-практической конференции «Медико-биологические проблемы адаптации» (30 марта 2017г., г. Ростов-на-Дону), межрегиональной научно-практической конференции «Экология и здоровье» (25 мая 2017г., г. Ростов-на-Дону), XII межрегиональной научно-практической конференции «Экспериментальные и теоретические исследования в современной науке» (24 февраля 2018г., г. Новосибирск), V межрегиональной научно-практической конференции «Экология и здоровье» (11 мая 2018г., г. Ростов-на-Дону), V межрегиональной научно-практической конференции «Научные основы создания и реализации современных технологий здоровьесбережения» (19 октября 2018г., г. Ростов-на-Дону), региональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики, лечения и профилактики заболеваний органов мочевой и половой систем» (30 марта 2019г., г. Ростов-на-Дону), 91-й Международной научно - практической конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (18 апреля 2019г., г. Симферополь), VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (26-29 сентября 2019г., г. Ростов-на-Дону), XXVII всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2021» (25-26 марта 2021г., г. Санкт-Петербург), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики заболеваний органов мочевой и половой систем» (23 апреля 2021г., г. Ростов-на-Дону).

Личный вклад автора. Все результаты экспериментальных исследований, представленные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах проведенного исследования, включая планирование и проведение экспериментов, аналитическую обработку данных, научное обоснование и обобщение полученных результатов, а также их оформление и публикацию.

Публикации. По теме диссертации опубликовано всего 26 научных работ, из них 10 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, включая 3 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и системы цитирования Scopus, 1 патент на изобретение РФ № 2770551 от 18 апреля 2022 г. (Бюл. № 11).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, изложения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы, содержащего 256 источника, в том числе – 202 зарубежных. Работа изложена на 132 страницах печатного текста, содержит 7 таблиц и 40 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. В работе воспроизводили эксперимент с использованием 27 беспородных кроликов-самцов. Как показали исследования [Lossi L. et al., 2016, Yazici M. et al., 2015] кролики являются подходящим биологическим объектом для изучения поражения почек. Экспериментальная модель ООМ была воспроизведена по методике Giamarellors-Bourbalis E. с соавторами [Giamarellos-Bourboulis E.J. et al., 2004]. По протоколу исследования животных умерщвляли на 7, 14 и 21 сутки. Исследовали кровь, мочу и ткань обструктивной и контралатеральной почек в указанные сроки.

Для гематологических и биохимических исследований у животных брали кровь из краевой ушной вены на 3, 7, 14 и 21 сутки. В сыворотке крови определяли лейкоциты (лимфоциты, моноциты, гранулоциты), эритроциты, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты, мочевины, креатинин, общий белок, альбумин. Уровень ЭИ оценивали по содержанию молекул средней массы (МСМ), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и малонового диальдегида (МДА). Оценку патологических процессов в нефроне и почечном интерстиции осуществляли с применением гистологического, морфометрического и ИГХ исследования.

Результаты исследования и обсуждение. Результаты исследования, выполненного в динамике экспериментальной ООМ, позволили определить ключевые морфофункциональные факторы патогенеза данного заболевания. Так на 3-7 сутки эксперимента значительных изменений общего состояния животных контрольной и опытной групп не наблюдали. Клинико-лабораторное исследование крови и мочи животных показало ожидаемые стандартные изменения, связанные с восстановлением организма кроликов после перенесенной операции. Отмечали умеренное снижение уровня эритроцитов, незначительное увеличение (в пределах физиологической нормы) уровня лейкоцитов, снижение альбумина и общего белка крови (табл. 1). В то же время в крови экспериментальной группы появляются неспецифические маркеры ЭИ – МСМ всех трех фракций и продукты перекисного окисления – МДА, которые свидетельствуют о начале патологического процесса в организме животного (рис. 1).

Таблица 1. Изменение показателей крови у контрольных (ЛО) и экспериментальных животных в динамике ООМ.

Показатель, кровь	3 сутки		7 сутки		14 сутки		21 сутки	
	ЛО	ООМ	ЛО	ООМ	ЛО	ООМ	ЛО	ООМ
Лейкоциты, норма 2,6-9,9 тыс/мкл)	8,38 [8,2;9,1]	8,9 [8,21;9,33]	8,41 [8,36;8,58]	8,77 [8,18;9,12]	8,18 [7,61;8,35]	9,27* [8,69;9,51]	7,96 [7,71;8,22]	10,38* [10,15;11,14]
Лимфоциты, норма 25-85 %	38,0 [36,0;40,0]	38,0 [35,75;38,25]	39,0 [37,0;39,0]	38,0 [37,0;40,0]	39,0 [37,5;40,5]	50,0* [49,0;51,0]	39,0 [38,0;40,0]	57,0* [55,5;58,5]
Тромбоциты, норма 130-900 тыс/мкл	478,0 [455,0;493,0]	487,0 [455,75;512,25]	437,0 [422,0;450,0]	464,0 [434,25;478,25]	417,0 [396,5;426,5]	412,0 [410,0;423,0]	325,0 [313,0;347,0]	362,0* [357,0;370,0]
Моноциты, норма 2-10%	6,0 [5,0;6,0]	5,5 [4,0;6,25]	6,0 [6,0;8,0]	7,5 [5,0;9,0]	8,0 [6,5;8,0]	9,0* [8,0;10,0]	8,0 [7,0;8,0]	9,0* [9,0;9,75]
Эритроциты, норма 5,2-7,8 млн/мкл	4,83 [4,76;5,33]	4,78 [4,53;4,97]	6,33 [6,26;6,75]	4,94* [4,7;5,14]	6,54 [6,38;6,74]	6,01* [5,71;6,13]	6,4 [6,37;6,73]	6,57 [6,38;6,66]
Гемоглобин, норма 105-160 г/л	92,0 [89,0;97,0]	87,0 [78,75;92,5]	94,0 [89,0;105,0]	90,5 [86,0;96,0]	117,0 [112,5;119,5]	112,0 [109,0;116,0]	128,0 [127,0;130,0]	123,5 [121,5;127,75]
Гематокрит, норма 35,0-48,0 %	27,4 [26,73;28,7]	27,09 [26,22;28,02]	37,78 [37,56;38,8]	30,25* [29,22;30,98]	39,25 [38,68;40,06]	34,5* [32,4;35,4]	39,37 [39,21;39,54]	38,1* [38,02;38,25]
СОЭ, норма 1-3 мм/ч	2,0 [2,0;3,0]	3,0 [2,0;3,0]	2,0 [1,0;2,0]	3,0* [2,0;3,0]	1,0 [1,0;2,0]	3,0* [2,0;3,0]	1,0 [1,0;2,0]	3,0* [2,25;3,0]
Общий белок, норма 54-75г/л	52,0 [50,5;54,5]	49,45 [48,88;50,22]	55,0 [53,0;57,0]	52,05* [51,22;52,88]	60,0 [57,5;61,5]	56,0* [54,7;56,0]	64,0 [63,0;65,0]	60,5 [59,25;62,5]
Альбумин, норма 27-46г/л	32,0 [31,0;33,0]	33,0 [29,83;33,65]	34,0 [33,0;35,0]	28,8 * [25,72;30,85]	34,0 [33,5;36,5]	24,0* [22,0;26,0]	35,0 [35,0;36,0]	28,5* [28,0;29,0]
Креатинин, норма 44,2-141,4 ммоль/л	137,0 [134,2;140,0]	143,5* [140,0;146,25]	121,3 [119,2;122,4]	128,3* [126,12;131,1]	106,3 [103,7;112,0]	106,3 [102,2;112,9]	102,2 [101,5;102,8]	126,15* [120,95;131,2]

Мочевина, норма 4,6-10,4 ммоль/л	8,3 [8,05;8,7]	8,8 [8,17;9,15]	7,6 [7,38;8,3]	8,75* [7,82;9,25]	7,38 [7,36;7,56]	5,9* [5,7;6,2]	7,67 [6,61;7,75]	5,95* [5,75;6,07]
БИК	8,0 [8,0;9,0]	6,5* [6,0;7,0]	16,0 [15,0;17,0]	11,0* [10,0;12,0]	20,0 [19,0;20,0]	12,0* [12,0;13,0]	20,0 [19,0;20,0]	26,5* [26,0;27,75]
МИК	33,0 [32,0;33,0]	38,0* [36,75;39,0]	32,0 [32,0;33,0]	43,5* [41,5;44,5]	32,0 [32,0;33,0]	73,0* [71,0;76,0]	32,0 [32,0;33,0]	87,0* [84,0;87,0]
МДА, нмоль/мл	5,86 [5,7;6,16]	15,36* [14,93;15,96]	2,36 [2,28;2,46]	17,9* [17,1;18,78]	2,28 [2,26;2,39]	12,88* [12,26;13,03]	2,28 [2,26;2,31]	14,44* [14,04;14,71]
МСМ, усл.ед. 254 нм	16,7 [16,4;17,0]	30,7* [29,05;31,02]	16,1 [15,9;16,3]	26,55* [25,92;27,52]	16,1 [15,9;16,15]	25,3* [24,5;26,4]	16,2 [15,9;16,2]	36,0* [35,0;36,25]
МСМ, усл.ед. 260 нм	19,0 [18,8;19,1]	33,75* [32,6;34,82]	16,7 [16,4;16,9]	28,65* [27,55;29,6]	16,9 [16,85;17,05]	27,6* [26,4;28,3]	16,6 [16,5;16,7]	36,1* [35,82;36,45]
МСМ, усл.ед. 280 нм	15,7 [14,0;16,0]	34,75* [34,28;35,25]	14,0 [13,8;15,5]	26,1* [25,25;27,05]	14,3 [13,8;14,5]	31,6* [30,1;32,1]	14,2 [13,9;14,3]	33,7* [33,02;34,15]

Примечание: в таблице средние значения представлены в виде медианы [нижний квартиль; верхний квартиль]; сравнение медиан осуществлялось с помощью теста Манна-Уитни; * – обозначены статистически значимые изменения в сравнении с контрольной группой (ЛО)

Общий анализ мочи (ОАМ) на 3 и 7 сутки соответствовал видовой норме, как у ЛО кроликов, так и после ООМ. В данной экспериментальной модели имеют место три компонента патогенеза накопления токсических продуктов: операционная травма; обструктивная почка, как источник ЭИ; нарушение оттока мочи, несмотря на наличие неповрежденной контралатеральной почки. В связи с этим сравнение полученных данных проводили не только с цифрами физиологической нормы, но и с динамическими данными контрольной группы ЛО животных.

На 7 сутки после операции у кроликов контрольной группы все морфологические показатели почек соответствовали норме. У кроликов с ООМ размер обструктивной почки оставался в пределах физиологической нормы, однако имелись отдельные очаги межуточного фиброза в мозговом слое и умеренная эктазия дистальных канальцев (рис. 2). Иммунофенотипирование обструктивной почки, в сравнении с контролем, выявило снижение визуализации эпителиальных маркеров, появление мезенхимальных маркеров не зафиксировано. Следовательно, в обструктивной почке формируются адаптационные процессы, вызванные возросшим давлением мочи в чашечно-лоханочной системе (ЧЛС) по причине затруднения ее оттока. На 7 сутки ООМ морфологические и ИГХ характеристики контралатеральной почки не изменились.

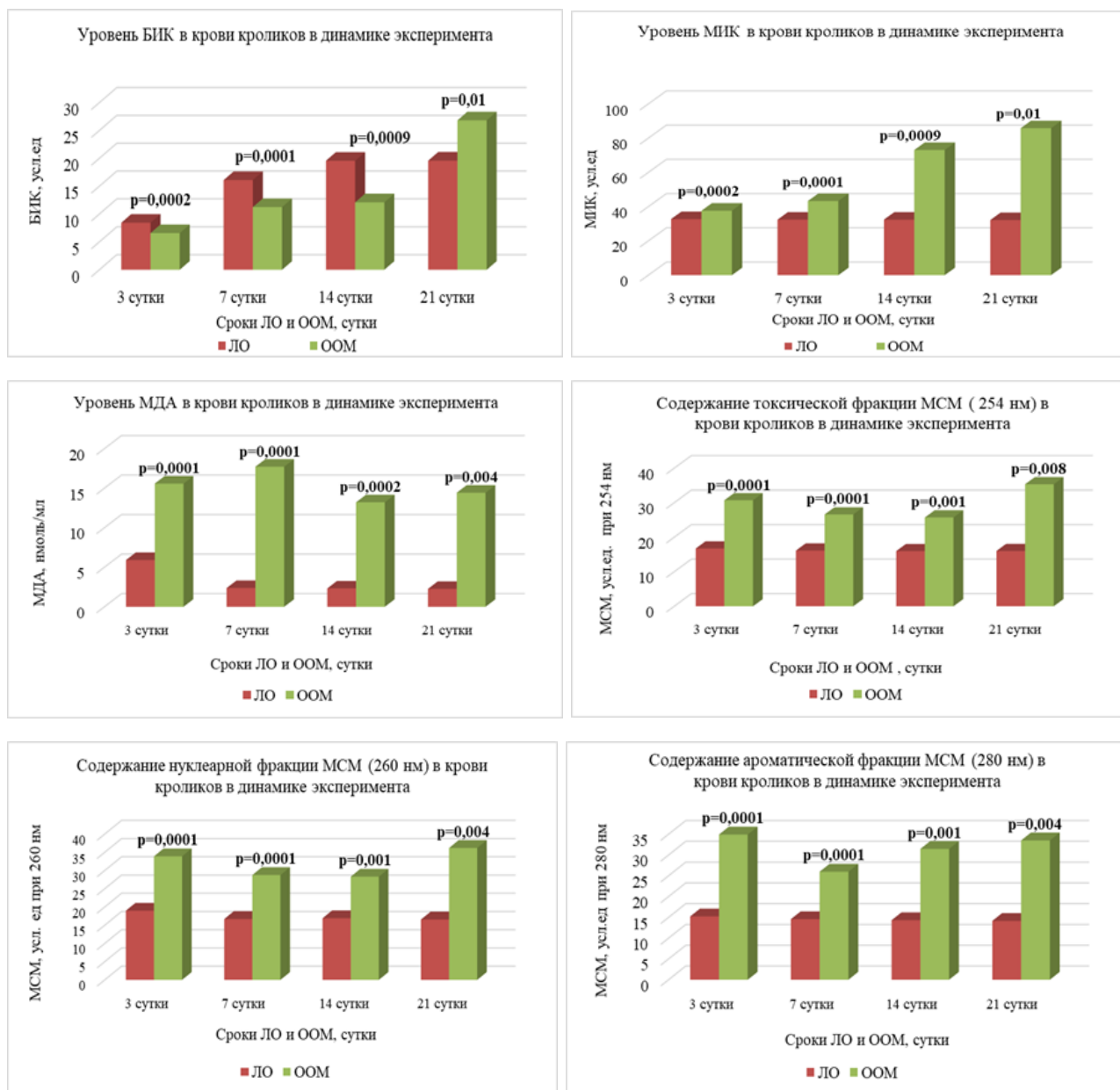


Рисунок 1. Содержание ЦИК (БИК и МИК) МДА, и МСМ в крови кроликов в динамике ООМ.

Примечание: p^* – обозначены статистически значимые изменения в сравнении с контрольной группой (ЛО).

На 14 сутки у животных контрольной группы восстановились общесоматические данные, показатели анализа крови (ОАК), мочи и неспецифические маркеры воспаления до значений видовой нормы. У кроликов экспериментальной группы на фоне относительного общесоматического благополучия в ОАК регистрировали повышение содержания лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов, рост СОЭ (табл. 1), что указывает на наличие воспалительного процесса. Подтверждением служит увеличение продуктов ЭИ в крови животных. Накопление продуктов свободнорадикального окисления является универсальным показателем развития окислительного стресса,

обладающего мощным цитотоксическим эффектом. Повышение содержания малых иммунных комплексов (МИК) (рис. 1), которые в норме выводятся через почки, свидетельствует о накоплении их в почечных клубочках, что в свою очередь приводит к развитию воспаления. Однако в этот период эксперимента изменений в ОАМ у животных также как и на 7 сутки обнаружено не было.

На 14 сутки эксперимента отмечено увеличение размера обструктивного органа в длину; ширину и толщину, наблюдали увеличение периметра ЧЛС. В этот период нарастали дистрофические, некробиотические изменения эпителия дистальных канальцев почки с развитием межуточного сетчатого фиброза стромы вокруг них (рис. 3). Проксимальные, извитые канальцы находились в состоянии белковой, гидропической дистрофии. Регистрировались признаки трансформации эпителия канальцев.

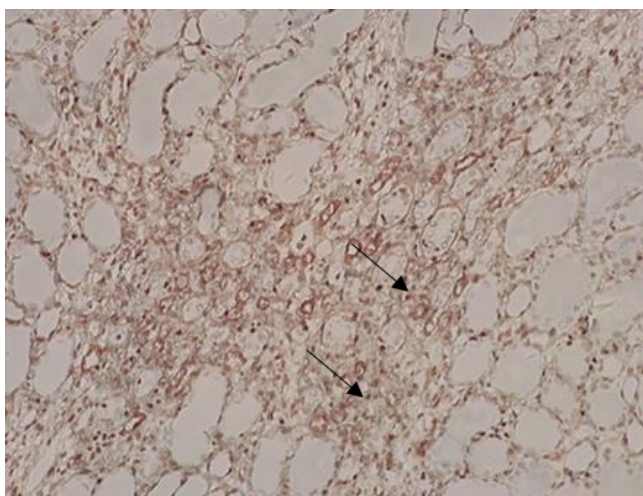


Рисунок 2. Очаги межуточного фиброза в мозговом слое (→), умеренная эктазия дистальных канальцев обструктивной почки на 7 сутки ООМ. Окраска Метенамин-серебро, Ув. х 200.

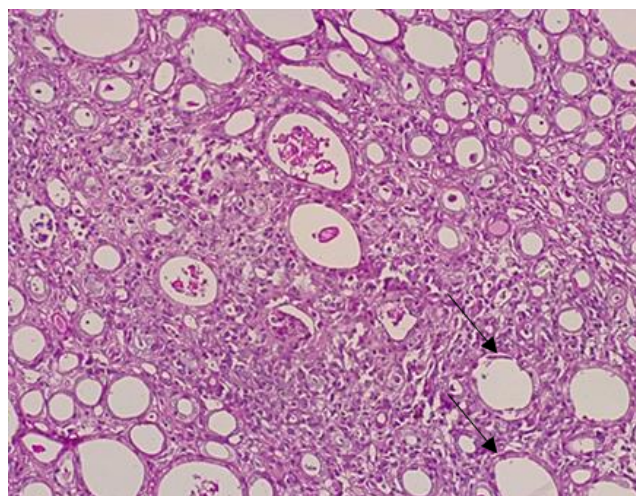


Рисунок 3. Кистозная трансформация с атрофией эпителиоцитов дистальных канальцев обструктивной почки (→) на 14 сутки ООМ. PAS-реакция по Хочкису, Ув. х 200.

Доказательством активного процесса ЭМП явилось появление маркеров мезенхимального фенотипа – Vimentin (Vim) и α -гладкомышечный актин (α -SMA), наряду с визуализацией маркеров эпителиального фенотипа – E-кадгерин и Cytokeratin 7 (СК7). Следовательно, в этот срок эксперимента уже видны ключевые патогенетические звенья обструктивного поражения почки.

На 14 сутки ООМ в контралатеральной почке макроскопические изменения не выявлены. Морфологическое исследование показало изменения в строме почечной ткани в форме единичных очагов сетчатого фиброза, локализующегося между отдельными канальцевыми структурами мозгового вещества почки, иммунофенотипические характеристики не изменялись. Поскольку изменений в показателях ОАМ по сравнению с контролем у кроликов в этот срок не выявлено, то можно говорить о формировании компенсаторных механизмов в контралатеральной почке. Следовательно, основным клиническим свидетельством развивающегося патологического

процесса в обструктивной почке является прогрессивное увеличение продуктов эндотоксемии: МДА, МСМ, ЦИК.

К 21 суткам ООМ общее состояние кроликов ухудшалось, нарастала анорексия и диарея. В ОАК отмечали увеличение фракции лейкоцитов за счет популяции лимфоцитов, повышение количества эритроцитов, снижение количества тромбоцитов (табл. 1), накопление продуктов ЭИ (МСМ, МИК, БИК). На 21 сутки появляются выраженные отклонения от нормы в ОАМ по качественным показателям: установлено наличие белка и кетоновых тел (табл. 2), а также при микроскопическом исследовании обнаружены лейкоциты.

Таблица 2. Изменение качественных показателей ОАМ у кроликов в динамике ООМ.

Показатель		Группы сравнения					
		7 сутки		14 сутки		21 сутки	
		ЛО	ООМ	ЛО	ООМ	ЛО	ООМ
Белок	neg	100%	100%	100%	100%	100%	33%
	pos	-	-	-	-	-	67%
Билирубин	neg	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	pos	-	-	-	-		-
Кетоновые тела	neg	100%	100%	100%	100%	100%	67%
	pos	-	-	-			33%
Глюкоза	neg	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	pos	-	-	-	-	-	-

На 21 сутки ООМ наблюдали дальнейшее увеличение размеров обструктивного органа, периметр лоханки увеличился в 2,6 раза в сравнении с контролем. В обструктивной почке отмечали выраженные дистрофические, атрофические, склеротические изменения (рис. 4). В мозговом слое наблюдали кистозную трансформацию дистальных канальцев с резкой атрофией, фиксировали развитие крупных участков межзубчатого фиброза. Канальцевый аппарат коркового слоя претерпевал существенные некробиотические, дистрофические изменения. Выявлены признаки активного процесса ЭМП на 21 сутки: точечная визуализация эпителиальных маркеров и усиление визуализации мезенхимальных маркеров не только в эпителиоцитах структурных элементов нефрона, но и интерстиция, что в итоге приводит к дисфункции почечной ткани.

На 21 сутки ООМ зарегистрировано увеличение размера контралатеральной почки, а именно ширины и толщины на 12% и 29% соответственно в сравнении с контролем. При морфологическом исследовании - в мозговом веществе между собирательными канальцами наблюдали развитие рыхлой соединительной ткани, в проксимальных канальцах – признаки гидропической дистрофии, хорошо визуализировалась щеточная каемка в эпителиоцитах (рис. 5).

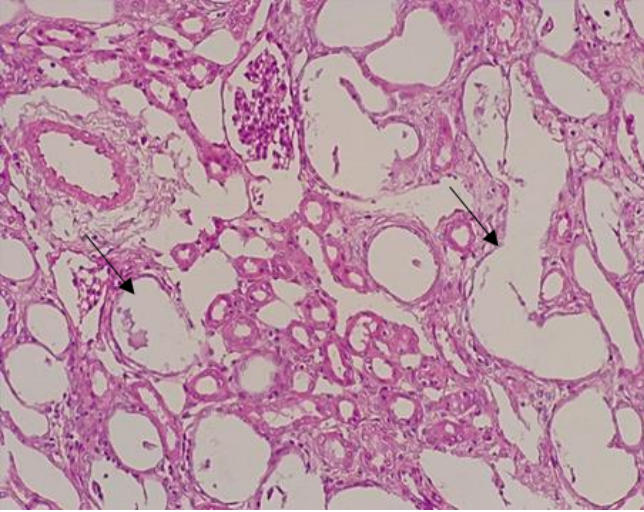


Рисунок 4. Кистозная трансформация извитых дистальных канальцев с атрофией эпителиоцитов обструктивной почки (→) на 21 сутки ООМ. Окраска гематоксилином-эозином, Ув. x 200.

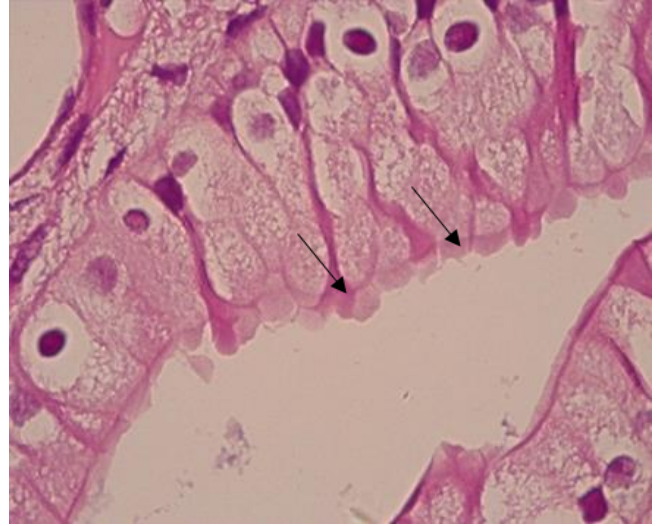


Рисунок 5. Щеточная каемка в эпителиоцитах проксимальных канальцев контралатеральной почки (→) на 21 сутки ООМ. Окраска гематоксилином-эозином, Ув. x 1000.

Иммунофенотипирование контралатеральной почки показало, что экспрессия эпителиальных маркеров (E-Cadherin, CK7) на протяжении 7-14 суток поддерживалась на уровне, сопоставимом со здоровой почкой (рис. 6). Однако, к 21 суткам эксперимента зафиксирована визуализация Vim не только в почечном тельце, что является нормой, но и диффузно в проксимальных канальцах нефрона контралатеральной почки (рис. 6 Б). Появление маркера мезенхимального фенотипа – виментина к 21 суткам ООМ можно расценивать как начальный этап процесса перестройки в эпителиальных клетках канальцев нефрона в ответ на увеличение нагрузки. Даже незначительные изменения фенотипа эпителиальных клеток указывают на формирование процессов адаптации нефрона к дополнительной нагрузке, в том числе и через ЭМП. Результаты ИГХ позволяют полагать, что при увеличении срока обструкции адаптационный резерв контралатеральной почки постепенно снижается и на фоне нарастания необратимых поражений обструктивной почки может значительно повыситься риск развития событий по негативному сценарию в компенсаторном органе.

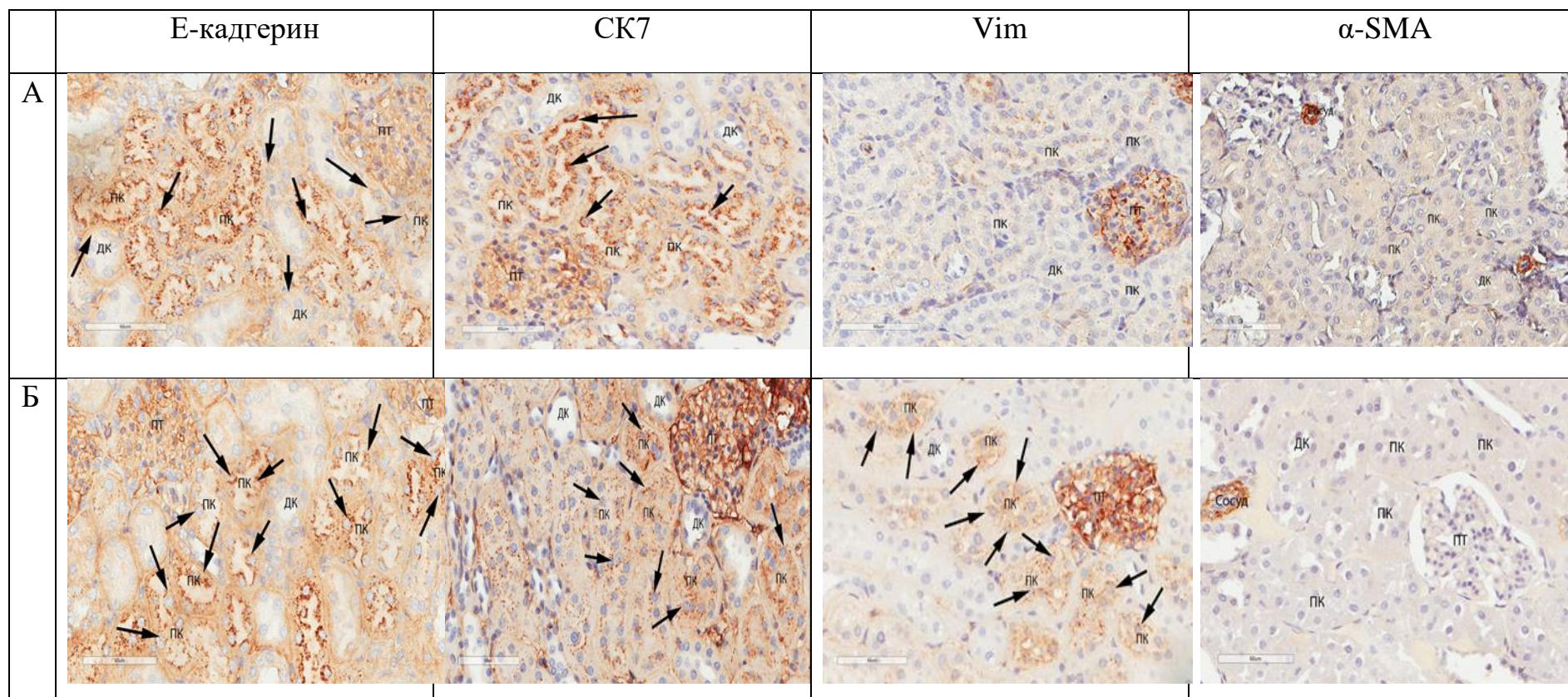


Рисунок 6. Световое микроскопическое ИГХ исследование изменения фенотипа эпителиальных клеток канальцев нефрона контралатеральной почки на 21 сут ООМ: А – контроль, Б – визуализация маркеров эпителиального (Е-кадгерин (мембранная реакция); СК7 (цитоплазматическая реакция)) и мезенхимального маркеров (Vim (цитоплазматическая реакция) и α -SMA (цитоплазматическая реакция)) в эпителии нефрона; ПТ-почечное тельце, ДК – дистальный каналец, ПК – проксимальный каналец, (→) ИГХ реакция в эпителиальных клетках ДК и ПК. (Ув. x 400).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненной работы позволили установить основные структурные, патогенетически значимые морфофункциональные изменения в обструктивной и контралатеральной почках при длительной односторонней обструкции мочеточника. Повреждение одной почки приводит к активации адаптационных, компенсаторных механизмов в контралатеральной почке.

В ранние сроки (3-7 сутки) обструкции общесоматические и клинко-лабораторные признаки патологического процесса отсутствуют. Однако в крови появляются неспецифические маркеры ЭИ – МСМ и продукты перекисного окисления – МДА. Данные показатели увеличиваются соответственно в 2,2 и 2,6 раз уже на 3 сутки ООМ по сравнению с контролем. В этот период идет адаптация органа к повышению давления на клетки канальцевой системы нефрона, изменения носят обратимый характер. Таким образом, острое течение заболевания ассоциировано с нарушением работы гомеостатических систем, поддерживающих окислительный баланс, как первого звена патогенеза в динамике ООМ.

На 14 сутки изменения нарастают и выявляются процессы воспаления, ишемии и гипоксии. В эти сроки помимо фильтрации частично затрагивается и процесс реабсорбции в обструктивной почке, что подтверждают результаты морфологического исследования (сужение просвета проксимальных канальцев и дистрофические изменения эпителиоцитов). В динамике развития ООМ ишемия почки спровоцирована сдавлением сосудов, в результате повышения внутрипочечного давления из-за нарушения оттока мочи, что приводит к гипоксии ткани почки – еще один патогенетический фактор развития функциональных и структурных нарушений в обструктивной почке. Через две недели обструкции в крови животных в 2 раза увеличивается содержание МИК. Именно фракция МИК выводится через почки и прогрессивное нарастание показателя в динамике ООМ свидетельствует о накоплении их в почечных клубочках, что инициирует воспаление на фоне ишемии и гипоксии. Клинико-лабораторным подтверждением воспалительного процесса служит лейкоцитоз в ОАК на 14 сутки ООМ за счет увеличения популяций моноцитов и лимфоцитов. Прогрессивный рост содержания в крови кроликов показателей МДА, МСМ и МИК свидетельствует об активной эндотоксемии и нарушении в системе гомеостаза. Отсутствие изменений показателей ОАМ в течение первых двух недель эксперимента подтверждает успешную компенсацию выделительной функции контралатеральной почкой.

На 21 сутки ООМ воспаление, ишемия, гипоксия, дистрофические изменения прогрессируют. В эти сроки помимо фильтрации и реабсорбции частично затрагивается и процесс секреции вследствие повреждения как проксимального, так и дистального канальцев обструктивной почки, что подтвердили результаты морфологического исследования. Однако в этот срок регистрируются уже необратимые некротические изменения. Длительная ишемия приводит к атрофии паренхимы и фиброзу в результате повышения коллагенсинтезирующей активности фибробластов, поскольку клетки мезенхимального происхождения менее чувствительны к гипоксии. Через три недели обструкции в крови животных почти в 3 раза увеличивается содержание МИК, в сравнении с контролем.

Прогрессивное нарастание показателя в динамике ООМ свидетельствует об усилении воспаления, что подтверждается лейкоцитозом в ОАК. Повышение количества маркеров ЭИ подтверждают усугубление эндотоксемии, а показатели ОАМ (наличие кетоновых тел, лейкоцитов, белка) свидетельствуют о нарушении гомеостаза. Эти данные указывают на дисбаланс системы гомеостаза и перенапряжение компенсаторных реакций в контралатеральной почке.

Таким образом, комплексное исследование динамики односторонней обструкции мочеточника позволило определить структурные и молекулярно-биологические механизмы адаптации нефрона обструктивной и контралатеральной почек, ключевые звенья патогенеза данного заболевания, а также выявить ранние клинико-лабораторных маркеры, указывающие на начало патофизиологического процесса (рис. 7).

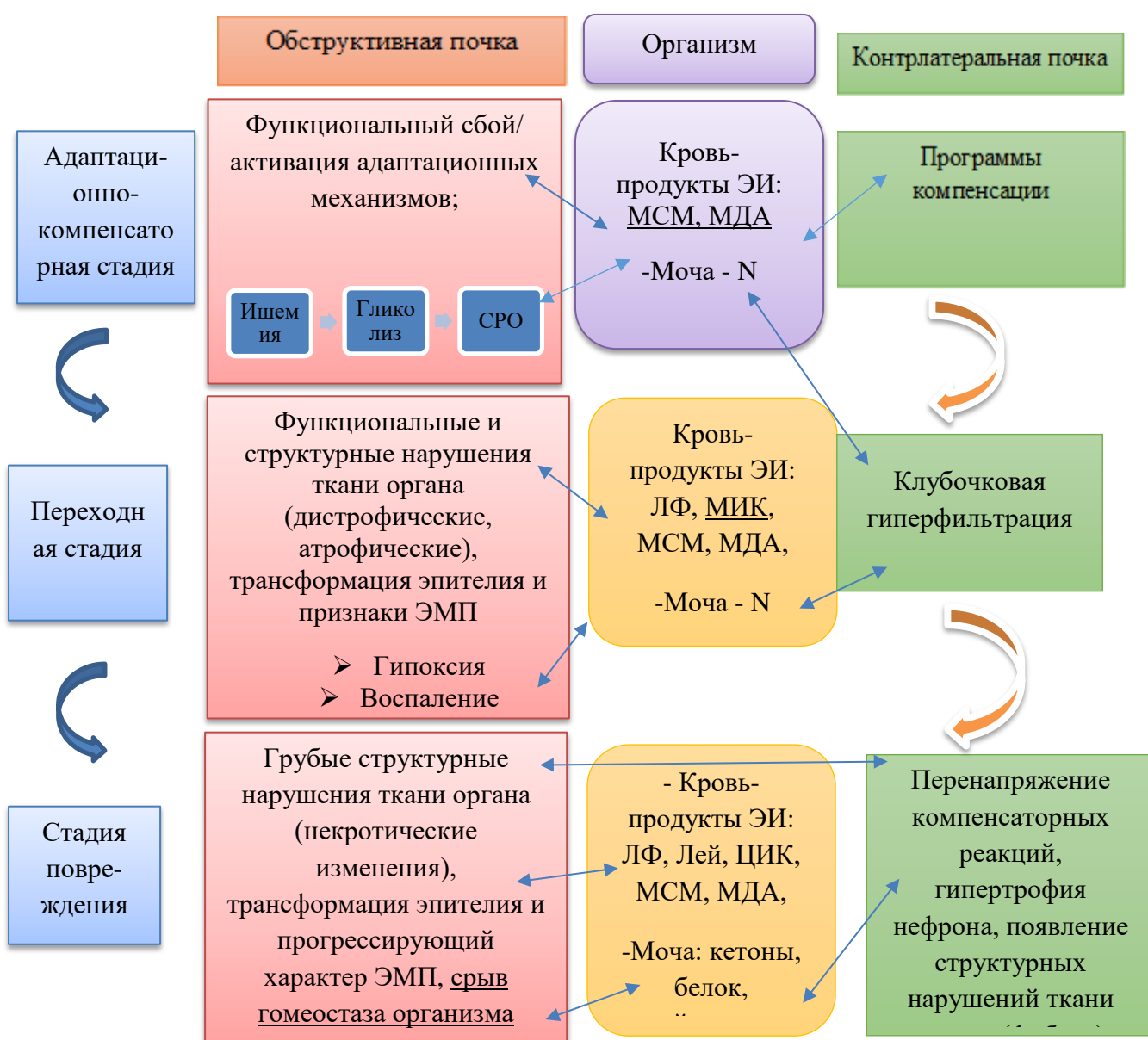


Рисунок 7. Схема патогенетических механизмов адаптации и повреждения обструктивной и контралатеральной почек при односторонней обструкции мочеточника.

ВЫВОДЫ

1. На ранних этапах (3-7 сутки) односторонней обструкции мочеточника общесоматические, морфологические и клинико-лабораторные (ОАМ и ОАК) признаки повреждения обструктивной почки отсутствуют.

2. К 14 суткам эксперимента регистрируются структурные изменения обструктивной почки. Первые признаки ЭМП клеток нефрона сопровождаются дистрофическими изменениями паренхимы и фиброзом в обструктивной почке.

3. Утрата маркеров эпителиального фенотипа, прогрессирующий характер ЭМП в структурных элементах нефрона и в интерстиции обструктивной почки на более поздних сроках эксперимента указывают на выраженные морфологические повреждения в пораженном органе.

4. Поддержание гомеостаза обеспечивает контралатеральная почка за счет компенсаторного почечного роста, который реализуется вследствие гипертрофии отделов нефрона, в частности, увеличения площади сосудистых клубочков на 16% в сравнении с контролем (с 3777,25 до 4370,48 мкм²), увеличения диаметра проксимальных канальцев и высоты их эпителия на 10% и 26 % (с 37,59 до 41,46 мкм, с 12,09 до 15,29 мкм) соответственно в сравнении с контролем, увеличения высоты эпителия дистальных канальцев на 26% в сравнении с контролем (с 8,29 до 10,43 мкм) к 21 суткам эксперимента.

5. Появление патологических изменений на 21 сутки эксперимента в контралатеральной почке в виде сетчатого фиброза свидетельствует о перенапряжении компенсаторных реакций и становится основной причиной нарушения гомеостаза, что подтверждается появлением в ОАМ у 67% животных белка, лейкоцитов и у 33% кетоновых тел, а в крови лимфо- и лейкоцитоза, а также высоких цифр ЦИК, МСМ и МДА.

6. Показатели МДА и МСМ в крови экспериментальных животных являются ранними маркерами поражения почки. Данные параметры достоверно увеличились в 2,6 (с 5,85 до 15,36 нмоль/мл) и в 2,2 (с 15,7 до 34,75 усл.ед) раза соответственно уже на 3 сутки эксперимента у кроликов с обструкцией мочеточника по сравнению с контрольной группой, таким образом их уровень в крови отражает динамику патологического процесса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

По результатам комплексного динамического исследования для ранней диагностики обструктивного процесса целесообразно использовать неспецифические маркеры ЭИ (МСМ, ЦИК) и продукты перекисного окисления (МДА), поскольку в этот период (7-14 сутки ООМ) общесоматические и классические клиничко-лабораторные свидетельства развития патологического процесса отсутствуют.

Результаты данной работы могут быть использованы для улучшения качества дифференциальной диагностики ООМ при проведении исследования состояния почек в уронефрологической практике.

Полученные данные о структурных и иммуноморфологических изменениях нефронов в обструктивной и контралатеральной почках, возможно использовать в учебном процессе в медицинских высших учебных заведениях. Экспериментальную модель и особенности методологии – в научно-исследовательской работе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Современные представления о роли эпителиально-мезенхимального перехода в прогрессии хронической болезни почек / В.Е. Потапов, Е.А. Синельник, **М.А. Акименко**, Д.Г. Пасечник // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – №6. – С. 104-109.

2. Морфологические особенности экспериментальной обструктивной уropатии / **М.А. Акименко**, Е.А. Синельник, В.Е. Потапов, Д.Г. Пасечник // 3-я итоговая научная сессия молодых ученых РостГМУ. Сборник материалов. – Ростов-на-Дону. – 2016. – С. 77-79.

3. Рак почки и беременность (клиничко-морфологический анализ случаев) / Е.А. Синельник, В.Е. Потапов, **М.А. Акименко**, И.В. Одушкина, Д.Г. Пасечник // Молодой ученый. – 2016. – №13-4(117). – С. 24-27.

4. Современные представления о роли эпителиально-мезенхимального перехода в развитии почечного фиброза / В.Е. Потапов, Е.А. Синельник, **М.А. Акименко**, М.Г. Оганесян, Д.Г. Пасечник // Молодой ученый. – 2016. – №15-2(119). – С. 28-33.

5. Динамика морфологических адаптационно-компенсаторных изменений в ткани почки при обструкции мочеточников в эксперименте / **М.А. Акименко**, С.С. Тодоров, Т.С. Колмакова // Нефрология. – 2017. – № 5. – С. 71-75.

6. Резистентность уропатогенов к антибактериальным препаратам у пациентов с острым обструктивным пиелонефритом / Ю.Л. Набока, И.А. Гудима, Е.В. Митусова, С.К. Беджанян, П.П. Моргун, М.И. Коган, К.Т. Джалагония, **М.А. Акименко** // Урология. – 2017. – №4. – С. 27-31.

7. Физиологическая адаптация экспериментальных животных в модели гидронефроза / **М.А. Акименко**, Е.А. Синельник, С.К. Беджанян // 4-я итоговая научная сессия молодых ученых РостГМУ. Сборник материалов. – Ростов-на-Дону. – 2017. – С. 124-126.

8. Экологические факторы, влияющие на заболевание почек и мочевыводящих путей / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова // Вестник дагестанского государственного педагогического университета. – 2017. – №4. – С. 27-29.

9. Динамика морфологических адаптационно-компенсаторных изменений в ткани контралатеральной почки при обструкции мочеточников в эксперименте / **М.А. Акименко**, С.С. Тодоров, Т.С. Колмакова // Нефрология. – 2017. – № 5. – С. 80-84.

10. Сравнительный анализ ранних биохимических изменений показателей крови у кроликов при обструкции мочевыводящих путей / **М.А. Акименко**, О.С. Оксенюк, С.А. Заруцкий // 5-я итоговая научная сессия молодых ученых РостГМУ. Сборник материалов. – Ростов-на-Дону. – 2018. – С. 111-112.

11. Морфологическая адаптация почек к длительной обструкции / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова // Материалы V межрегиональной научно-практической конференции. Научные основы создания и реализации современных технологий здоровьесбережения. – Ростов-на-Дону. – 2018. – С. 84-89.

12. Морфологическая характеристика контралатеральной почки в динамике развития обструктивной уropатии (экспериментальное исследование) / **М.А. Акименко**, С.С. Тодоров, Т.С. Колмакова, В.Е. Потапов // Сборник статей по материалам XII международной научно-практической конференции. Экспериментальные и теоретические исследования в современной науке. – Новосибирск. – 2018. С. 37-44.

13. Динамика показателей эндогенной интоксикации при экспериментальной обструкции мочевыводящих / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова, О.С. Оксенюк, Ю.А. Калмыкова, О.Б. Смирнова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2019. – №12. – С. 74-85.

14. Динамика гематологических показателей крови кроликов при обструкции мочевыводящих путей / **М.А. Акименко**, О.С. Оксенюк, С.А. Заруцкий // 6-я итоговая научная сессия молодых ученых РостГМУ. Сборник материалов. – Ростов-на-Дону. – 2019. – С. 76-78.

15. Биохимические показатели крови и морфологические изменения ткани обструктивной и компенсаторной почек в динамике развития обструктивной уropатии (экспериментальное исследование) / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова // Научная конференция с международным участием, посвященная 170-летию кафедры патологической анатомии им. академика А.И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Сборник тезисов. – Москва. – 2019. – С. 12-13.

16. Особенности поражения почек при обструктивной уropатии в эксперименте / С.С. Тодоров, **М.А. Акименко** // Научная конференция с международным участием, посвященная 170-летию кафедры патологической анатомии им. академика А.И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Сборник тезисов. – Москва. – 2019. – С. 74.

17. Адаптационные изменения в структуре нефрона при длительной обструкции мочеточника (экспериментальное исследование) / **М.А. Акименко**, Т.П. Макалиш // Материалы 91-й Международной научно - практической

конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины». Сборник материалов. – Симферополь. – 2019. – С. 422.

18. Молекулярные маркеры эпителиально-мезенхимального перехода при адаптации нефрона к длительной обструкции мочеточника / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова, О.В. Воронова // Материалы VIII Научно-практической конференции с международным участием «Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». Сборник материалов. – Ростов-на-Дону. – 2019. – С. 149-150.

19. Особенности развития эндогенной интоксикации при экспериментальной обструкции мочевыводящих путей / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова, О.С. Оксенюк, Ю.А. Калмыкова, О.Б. Смирнова // Вестник РУДН. Серия Медицина. – 2019. – №3. – С. 297-307.

20. Прогнозирование ремоделирования артерий почек малого диаметра в модели экспериментального гломерулонефрита / Е.С. Левицкая, М.М. Батюшин, И.Н. Касич, **М.А. Акименко**, О.В. Воронова, А.А. Мокрушин, М.Д. Черкашина, И.Е. Чумакова // Нефрология. – 2020. – № 5. – С. 64-71.

21. Изменения фенотипа канальцевого эпителия нефрона контрлатеральной почки при односторонней непроходимости мочеточника (экспериментальное исследование) / **М.А. Акименко**, О.В. Воронова, Т.С. Колмакова // Вестник Урологии. – 2021. – № 9 (3). – С. 5-11.

22. Изменения фенотипа эпителия нефрона обструктивной почки при односторонней непроходимости мочеточника (экспериментальное исследование) / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова, О.В. Воронова, М.И. Коган // Урология. – 2021. – № 6. – С. 48-52.

23. Патологические особенности односторонней непроходимости мочеточника в эксперименте / Л.К. Галустян, **М.А. Акименко** // материалы XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины». Сборник материалов. – Санкт-Петербург. – 2021. – С. 37-38.

24. Роль компенсаторных изменений в контрлатеральной почке в поддержании гомеостаза при односторонней обструкции мочеточника / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова, О.В. Воронова // Естественные науки. – 2022. – № 2 (7). – С. 7-17.

25. Патогенетические механизмы адаптации и повреждения нефрона обструктивной и контрлатеральной почек при односторонней обструкции мочеточника / **М.А. Акименко**, Т.С. Колмакова, О.В. Воронова, Т.П. Макалиш // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. – № 3 – С. 6-13.

26. Патент на изобретение РФ № 2770551, от 18.04.2022. Способ диагностики белково-энергетической недостаточности у взрослых пациентов с хронической болезнью почек 3а-5д стадии / Гасанов М.З., Левицкая Е.С., Батюшин М.М., Бадьян А.С., **Акименко М.А.**, Воронова О.В. - Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава РФ. - Бюл. № 11. – 1 с.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

E-cadherin	Е-кадгерин
Vimentin/ Vim	виментин
α -SMA	α -гладкомышечный актин
БИК	циркулирующие иммунные комплексы (большие)
ИГХ	иммуногистохимический метод
ЛО	ложнооперированные
МДА	малоновый диальдегид
МИК	циркулирующие иммунные комплексы (малые)
МСК	мультицитокератин АЕ1/АЕ3
МСМ	молекулы средней массы
ОАК	общий анализ крови
ОАМ	общий анализ мочи
ООМ	односторонняя непроходимость мочеточника
ОПП	острое повреждение почек
ОУ	обструктивные уropатии
СК7	цитокератин 7
ХБП	хронические болезни почек
ЦИК	циркулирующие иммунные комплексы
ЧЛС	чашечно-лоханочная система
ЭИ	эндогенная интоксикация
ЭМП	эпителиально-мезенхимальный переход