

and parvalbumin (PAV) in the dorsal horn of the T_{III}-T_V segments of the spinal cord (SC).

Material and methods. Immunoreactive (IR) interneurons in 16-week-old female C57BL/6 mice were studied using immunohistochemical methods.

Results. All subpopulations of IR interneurons were located in all laminae of the dorsal horn of the SC; however, interneurons IR to PAV were not detected in plate I. The relative content of CAB interneurons was greatest in laminae I (27%) and II (29%), CAR interneurons — in lamina II (21.5%), PAV interneurons — in laminae IV (5.7%) and V (6.2%). In addition, a subpopulation of PAV interneurons in plates II, III and in the region of the dorsal horn medial border (MB) was represented by a small group of cells, in contrast with other calcium-binding proteins. The same was true for CAR interneurons in plates III,

IV, V and MB. The quantitative distribution of the subpopulation of calbindin-containing interneurons prevailed in all laminae of the dorsal horn of SC. The differences in cell sizes in the mentioned subpopulations of IR interneurons were statistically significant, with CAB and CAR interneurons being larger and PAV interneurons — smaller.

Conclusions. In the dorsal horn of the SC, various subpopulations of interneurons immunoreactive to calbindin, calretinin, and parvalbumin were identified, and the subpopulations were specific in each lamina.

Key words: *interneuron, dorsal horn, spinal cord, immunohistochemistry*

¹ Department of Pathophysiology, ² Department of Human Anatomy, ³ Department of Normal Physiology, Yaroslavl State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl 150000

*В. В. Елагин*², *Д. А. Костина*³, *О. И. Братчиков*², *Т. Г. Покровская*³,
*С. Л. Кузнецов*⁴, *М. А. Затолокина*¹, *В. В. Гуреев*³, *Е. С. Затолокина*¹

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ БИЛАТЕРАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИШЕМИИ—РЕПЕРФУЗИИ

¹ Кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — д-р мед. наук А. В. Иванов), ² кафедра урологии (зав. — д-р мед. наук О. И. Братчиков), ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; ³ кафедра фармакологии и клинической фармакологии (зав. — д-р мед. наук М. В. Покровский), ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»; ⁴ кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — д-р мед. наук С. Л. Кузнецов), ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский Университет)

Цель — выявить и изучить степень выраженности морфологических изменений структур коркового и мозгового вещества почки на фоне смоделированной билатеральной модели ишемии—реперфузии.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 50 крысах-самцах линии Вистар массой 180–220 г. Моделирование билатеральной модели ишемии—реперфузии проводилось путем наложения атравматичных зажимов на обе почечные ножки на 40 мин. Через 24 или 72 ч реперфузии проводили оценку выраженности структурных изменений в корковом и мозговом веществе почки с использованием гистологических и морфометрических методик. Измеряли высоту эпителиоцитов в проксимальном и дистальном извитых канальцах нефрона, площадь поперечного сечения почечного тельца, клубочка и капсулярного пространства.

Результаты. Полученные морфологические изменения в виде нарушения структурности эпителия как в корковом, так и в мозговом веществе почки на 1-е сутки эксперимента имеют тенденцию к увеличению степени их выраженности. К 3-м суткам эксперимента наиболее выраженные реактивно-деструктивные изменения визуализируются в реабсорбционно-секреторных отделах нефрона, которые проявляются в виде снижения высоты эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев, отслоением их от базальной мембраны и слущиванием. Усугубление схожей морфологической картины происходило в собирательных трубках, в просветах которых определялись конгломераты из отслоившихся от базальной мембраны погибших клеток эпителия. Выявленные реактивно-деструктивные изменения в почках морфологически обосновывают адекватность создания модели ишемии—реперфузии.

Выводы. 40-минутная билатеральная ишемия почек с последующей реперфузией в течение 1–3 сут приводит к выраженным структурным изменениям в почках, что соответствует характеристике острого почечного повреждения.

Ключевые слова: *почки крысы, ишемия—реперфузия, острое почечное повреждение*

Введение. В течение последних 25 лет частота возникновения острого почечного повреждения возросла в 20 раз и составляет в среднем 13–20% от всех госпитализаций [1, 2]. Параллельно росту заболеваемости увеличиваются инвалидизация и смертность от острого почечного повреждения. Ишемическое повреждение, усугубляющееся впоследствии реперфузией органа, является ведущей патогенетической причиной в этиологии острого почечного повреждения [3–5] и остается актуальной мультидисциплинарной проблемой [6]. Высокий уровень финансовых и социальных потерь от острого почечного повреждения, инициированного ишемией—реперфузией, а также сложность прогнозирования эффективности различного рода вмешательств у пациентов с нарушением функции почек, определили целесообразность проведения морфологических исследований при экспериментальной ишемии почек в различные сроки после реперфузии.

Цель работы — выявить и изучить степень выраженности морфологических изменений структур коркового и мозгового вещества почки на фоне смоделированной билатеральной модели ишемии—реперфузии, изучение морфологических изменений в корковом веществе почек у крыс на фоне билатеральной модели ишемии—реперфузии на 1-е и 3-и сутки после оперативного вмешательства.

Материал и методы. Работа проведена на 30 крысах-самцах массой 180–220 г, которые были разделены на 3 группы по 10 особей, включающие интактных крыс, ложнооперированных крыс и экспериментальную группу с моделированием билатеральной ишемии—реперфузии. На проведение исследования получено разрешение регионального этического комитета ФГАОУ ВО БГНИУ от 08.06.2016 г. (протокол 6). Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

Под общей анестезией (хлоралгидрат, 300 мг/кг внутривенно) проводили срединную лапаротомию с последующим выделением почечных ножек и последовательным наложением атравматичных сосудистых зажимов на обе ножки с ишемическим периодом 40 мин под контролем микро-

циркуляции. Далее снимали зажимы, промывали брюшную полость физиологическим раствором и послойно ушивали рану. Через 24 или 72 ч после эксперимента животных подвергали эвтаназии с последующим забором почек для морфологического исследования. Для проведения гистологического исследования полученный материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина, после чего иссекали участок тканей размерами 1×1 см и заливали в парафин по стандартной методике с последующим изготовлением срезов толщиной 5–7 мкм. Полученные гистологические срезы окрашивали гематоксилином — эозином, по методу Ван-Гизона, Маллори. Микроскопирование и фотографирование осуществляли с помощью оптической системы, состоящей из микроскопа Leica CME и окулярной камеры DCM-510 при увеличениях 100, 200 и 400 с документированием снимков в программе FUTURE WINJOE, входящей в комплект поставки окулярной камеры. На микрофотографиях с использованием программы ImagoJ проводили измерение высоты эпителиоцитов в проксимальных и дистальных извитых канальцах нефрона, площади поперечного сечения почечного тельца, площади клубочка и ширины капсулярного пространства. Для всех данных применена описательная статистика, данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро—Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего (m). В случаях ненормального распределения были рассчитаны медиана (Me) и квартильный размах (QR). Межгрупповые различия анализировались с применением параметрического t-критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна—Уитни в зависимости от типа распределения. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0.

Результаты исследования. В группе интактных животных при макроскопическом исследовании почек видимых структурных нарушений не отмечалось: поверхность их была гладкая, фиброзная капсула снималась легко, на разрезе корковое и мозговое вещество имели выраженную границу. В группе ложнооперированных животных также не отмечалось видимых структурных нарушений почек, однако в брюшной полости содержалось небольшое количество выпота серозного характера.

После ишемии—реперфузии на 1-е и 3-и сутки эксперимента в брюшной полости также содержалось небольшое количество серозного выпота,

Сведения об авторах:

Елагин Владислав Викторович (e-mail: vlad.elagin2014@yandex.ru), *Братчиков Олег Иванович* (e-mail: bratov45@mail.ru), кафедра урологии, *Затолокина Мария Алексеевна* (e-mail: marika1212@mail.ru),

Затолокина Евгения Сергеевна (e-mail: jenazatolokina@gmail.com), кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3

Костина Дарья Александровна (e-mail: kostina_da@bsu.edu.ru), *Покровская Татьяна Григорьевна* (e-mail: pokrovskaia-tg@mail.ru),

Гуреев Владимир Владимирович (e-mail: produmen@yandex.ru), кафедра фармакологии и клинической фармакологии, Медицинский институт, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

Кузнецов Сергей Львович (e-mail: vakmedbiol@rambler.ru), кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский Университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

брюшина оставалась неизменной. Почки имели неоднородную окраску с мелко- и крупноочаговыми включениями, на разрезе утрачивалась четкая граница между корковым и мозговым веществом.

При микроскопическом изучении гистологических срезов почки у интактных животных в области коркового вещества хорошо визуализировались почечные тельца, основу которых составлял сосудистый клубочек, окруженный двухлистковой капсулой. Внутренний листок капсулы клубочка очень плотно прилежал к кровеносным капиллярам, а наружный листок, образованный плоскими эпителиоцитами, отделялся от внутреннего листка щелевидной полостью капсулы.

На апикальной поверхности кубических эпителиоцитов, выстилающих проксимальные извитые каналы, хорошо визуализируется щеточная каемка. В дистальных извитых каналах определяется четкий широкий просвет. В собирательных трубках, выстланных кубическими эпителиоцитами со светлой цитоплазмой, просвет еще более широкий. Между каналами визуализируются тонкие прослойки соединительной ткани, образующие строму почки.

В группе наблюдений с ложнопериоперированными животными значимых микроструктурных отличий от группы интактных животных выявлено не было.

В условиях эксперимента через 1 сут после ишемии в корковом веществе почки наблюдались выраженные дистрофические изменения в каналах и интерстиции. В корковом веществе наблюдались интерстициальный отек, увеличение площади клубочка на срезе и, как следствие, уменьшение ширины капсулярного пространства. В строме почки наблюдалась инфильтрация лимфоцитами. Повреждения клеток почечных канальцев проявлялись уплощением или утратой щеточной каймы, набуханием и вакуолизацией цитоплазмы. На единице площади среза число клубочков почки было снижено в сравнении с группами контроля.

На границе между корковым и мозговым веществом в почечных канальцах наблюдались также отрыв клеток от базальной мембраны, слущивание их в просвет канала, склеивание и образование конгломератов, способствующих закупорке просвета канальцев.

В мозговом веществе почки почечные каналы были расширены, в собирательных трубках на поперечных разрезах также обнаруживались конгломераты из отслоившихся от базальной мем-

браны погибших клеток эпителия, способствующих нарушению оттока мочи.

На 3-и сутки после оперативного вмешательства наблюдалось нарастание выявленных ранее повреждений эпителиоцитов канальцев.

Единично визуализируемые в поле зрения сморщенные клубочки ранее имели тенденцию к увеличению их количества, встречались некротизированные почечные тельца, наблюдался застой крови. Кровеносные капилляры, окутывающие каналы, были расширены, кровенаполнены. Интерстициальный отек, часто сопровождающийся лейкоцитарной инфильтрацией стромы и канальцев, продолжал усиливаться. В некоторых участках наблюдался очаговый некроз канальцев. Щеточная кайма на апикальной поверхности эпителиоцитов была разрушена полностью. Наблюдался разрыв межклеточных контактов в эпителии и отслойка эпителиоцитов от базальной мембраны.

Также следует отметить увеличение количества локальных участков с хорошо визуализируемой обструкцией просвета почечных канальцев цилиндрами из слущенных эпителиоцитов. Почечные каналы выглядели расширенными, при этом площадь конгломератов была больше, чем на 1-е сутки эксперимента.

Увеличивался просвет собирательных трубочек, нисходящие и восходящие отделы петель нефронов были расширены. Высота эпителия в проксимальных извитых каналах в почках интактных и ложнопериоперированных крыс составила $10,54 \pm 0,23$ и $11,28 \pm 1,56$ мкм соответственно. Через 1 сут после оперативного вмешательства высота эпителиоцитов в проксимальных каналах уменьшилась в 1,4 раза в сравнении с ложнопериоперированными животными. На 3-и сутки было выявлено значимое уменьшение высоты уже в 1,7 раза ($6,56 \pm 0,74$ мкм). Полученные количественные данные были вполне сопоставимы с выявленными качественными изменениями в проксимальных каналах, а именно, разрушением щеточной каймы на апикальной поверхности эпителиоцитов и отслойкой клеток от базальной мембраны.

В дистальных извитых каналах нефрона высота эпителия имела те же изменения. Максимальное снижение высоты эпителиоцитов в 1,7 раза происходило через 3-и сутки после оперативного вмешательства, высота эпителиоцитов уменьшилась до $4,24 \pm 0,73$ мкм. Было также выявлено, что на фоне незначительного уменьшения размеров почечного тельца показатель площади клубочка был значимо меньше (в 1,7 раза). Все

Таблица 1

Динамика результатов морфометрии высоты эпителия канальцев в экспериментальных группах ($M \pm m$, $n=10$), мкм

Группа	24 ч		72 ч	
	Высота эпителия канальцев			
	проксимальных	дистальных	проксимальных	дистальных
Интактные	10,54±0,23	6,26±0,13	10,54±0,23	6,26±0,13
Ложнооперированные	11,28±1,56	7,08±1,43	11,28±1,56	7,08±1,43
Ишемия—реперфузия	8,21±0,21 *	6,46±0,15 *	6,56±0,74 *	4,24±0,73 *

Здесь и в табл. 2: * $p < 0,05$ в сравнении с группой ложнооперированных животных.

Таблица 2

Динамика результатов морфометрии клубочковых структур в экспериментальных группах ($M \pm m$, $n=10$), мкм²

Группа	1-е сутки		3-и сутки	
	Площадь			
	сосудистого клубочка	почечного тельца	сосудистого клубочка	почечного тельца
Интактные	6267,23±126,78	10280,84±219,68	6267,23±126,78	10280,84±219,68
Ложнооперированные	6449,95±40,42	10318,97±83,74	6449,95±40,42	10318,97±83,74
Ишемия—реперфузия	5799,65±117,89 *	9859,3±244,98	3747,06±135,33 *	9303,6±253,16 *

приведенные данные морфометрии представлены в табл. 1 и 2.

Обсуждение полученных данных. Согласно современным представлениям, в патогенезе острого почечного повреждения ишемически-реперфузионного генеза ведущую роль играет первичное поражение почечных канальцев — острый канальцевый некроз, развивающийся в первые несколько суток после патологического стимула [2, 8]. Результаты данного исследования согласуются с общепризнанной концепцией: после 40-минутного эпизода ишемии на 1-е сутки изменения затрагивают в большей степени почечные канальцы — снижается высота однослойного кубического эпителия, наблюдаются нарушение полярности клеток, целостности их межклеточных контактов, уплощение или утрата щеточной каймы, набухание и вакуолизация цитоплазмы, выраженность которых нарастает к 3-м суткам реперфузии. Изменения структуры клубочков носят вторичный характер, при этом выраженность патологических структурных изменений также нарастает через 72 ч реперфузии.

Заключение. Выявленные нами структурные изменения в почках являются морфологическим обоснованием возможности применения разработанной 40-минутной билатеральной модели ишемии—реперфузии в экспериментальных исследованиях с целью дальнейшей экстрапо-

ляции полученных данных в клиническую практику. Предлагаемая экспериментальная модель острого почечного повреждения позволяет создать комплекс патоморфологических изменений в почках, соответствующих реальной клинической практике и сопутствующих кардиохирургическим, урологическим и трансплантологическим вмешательствам. Типичная гистологическая картина, соответствующая современным представлениям о патогенезе острого почечного повреждения, позволяет использовать 40-минутную билатеральную модель ишемии—реперфузии почек с оценкой патоморфологической картины и морфометрии в качестве экспериментальной модели для оценки характера и выраженности нефропротективных свойств различного рода вмешательств с целью профилактики и лечения острого почечного повреждения. Представленная модель ишемически-реперфузионных повреждений почек является адекватной и может быть использована для оценки нефропротективных свойств новых лекарственных препаратов.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: В. В. Е., Д. А. К., О. И. Б., Т. Г. П.

Сбор и обработка материала: В. В. Е., Д. А. К., М. А. З., В. В. Г.

Статистическая обработка данных: М. А. З., Е. С. З.

Анализ и интерпретация данных: В. В. Е., Д. А. К., М. А. З., С. Л. К.

Написание и редактирование текста: В. В. Е., Д. А. К.,
О. И. Б., Т. Г. П., М. А. З., С. Л. К., В. В. Г.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заморский И.И., Щудрова Т.С., Линькова Н.С. и др. Нефропротективное действие пептида EDL при остром повреждении почек различного генеза // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2017. № 3. С. 376–381 [Zamorskiy I.I., Shchudrova T.S., Linkova N.S. et al. Renoprotective effect of EDL peptide in acute injury of kidneys of different genesis // Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2017. № 3. P. 376–381. In Russ.].
2. Костина Д.А., Покровская Т.Г., Олефир Ю.В., Яворский А.Н., Елагин В.В. Роль фармакологического preconditionирования при ишемических и реперфузионных повреждениях почек // Урология. 2017. № 5. С. 139–144 [Kostina D.A., Pokrovskaya T.G., Olefir Yu.V., Yavorsky A.N., Elagin V.V. The role of pharmacological preconditioning in renal ischemia-reperfusion injury // Urologiya. 2017. № 5. P. 139–144. In Russ.].
3. Case J., Khan S., Khalid R., Khan A. Epidemiology of acute kidney injury in the intensive care unit // Crit. Care Res. Pract. 2013. Vol. 2013, № 479730. doi: 10.1155/2013/479730
4. Chatauret N., Badet L., Barrou B., Hauet T. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury // Prog. Urol. 2014. Vol. 24, Suppl. 1. P. S4–S12.
5. Hsu R.K., McCulloch C.E., Dudley R.A., Lo L.J., Hsu C.Y. Temporal Changes in Incidence of Dialysis- Requiring AKI // J. Am. Soc. Nephrol. 2013. Vol. 24, № 1. P. 37–42. doi: 10.1681/ASN.2012080800
6. Kes P., Jikic N. Acute kidney injury in the intensive care unit // Bosn. J. Basic. Med. Sci. 2010. № 10 (Suppl. 1). P. 8–12.
7. Shramenko K.K., Gorodnik G.A., Shano V.P. et al. Pharmacological correction of intercept hemodynamics in acute kidney damage (part 1) // Research results in pharmacology. 2017. Vol. 3, № 3. P. 110–120. doi: 10.18413/2313-8971-2017-3-3-110-120
8. Singbartl K., Kellum J.A. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes // Kidney Int. 2012. Vol. 81, № 9. P. 819–825. doi: 10.1038/ki.2011.339

Поступила в редакцию 24.09.2018
Получена после доработки 31.10.2018

MORPHOLOGICAL SUBSTANTIATION OF THE POSSIBILITY OF CREATING A BILATERAL MODEL OF ISCHEMIA—REPERFUSION

V. V. Elagin², D. A. Kostina³, O. I. Bratchikov²,
T. G. Pokrovskaya³, C. L. Kuznetsov⁴,
M. A. Zatulokina¹, V. V. Gureev³, Ye. S. Zatulokina¹

Objective — to identify and study the severity of morphological changes in the structures of the renal cortex and medulla in the bilateral model of ischemia—reperfusion.

Material and methods. The experiments were performed on 50 male Wistar rats weighing 180–220 grams. A bilateral ischemia—reperfusion was modelled by applying atraumatic clamps to both kidney pedicles for 40 minutes. After 24 or 72 hours of reperfusion, the severity of structural changes in the renal cortex and medulla was assessed using histological and morphometric techniques. The height of epithelial cells in the proximal and distal convoluted tubules of the nephron, the cross-sectional area of the renal corpuscle, glomerulus and capsular space were measured.

Results. Severe structural changes in the renal tissue affecting both the tubular and glomerular apparatus of the kidneys were found, with the increase in pathological changes from the first to the third days of the experiment in the form of a decrease in the epithelial height of the distal and proximal tubules, as well as a decrease in the area of the renal corpuscle and vascular glomerulus. The morphological changes in the form of a structural damage of the epithelium of both renal cortex and medulla were detected on the 1st day of the experiment, and they tend to increase their severity. By the 3rd day of the experiment, the most pronounced reactive-destructive changes were visualized in the reabsorption-secretory sections of the nephron. They were manifested as a decrease in the height of the proximal and distal tubule epithelial cells, their exfoliation from the basement membrane and desquamation. The similar but more aggravated morphological picture was seen in collecting tubes, where conglomerates of dead epithelial cells exfoliated from the basement membrane were found in the gaps. The revealed reactive-destructive changes in the kidneys morphologically substantiate the adequacy of creating a model of ischemia—reperfusion.

Conclusions. A 40-minute bilateral renal ischemia followed by reperfusion leads to severe structural changes in the kidneys in 1–3 days, which corresponds to a characteristic of acute renal damage.

Key words: rat kidney, ischemia—reperfusion, acute kidney injury

¹ Department of Histology, Embryology, Cytology,
² Department of Urology, Kursk State Medical University,
³ Karl Marx St., Kursk 305041; ³ Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, 85 Victory St., Belgorod 308015; ⁴ Department of Histology, Embryology, Cytology, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991