

Медицински университет – София
Медицински факултет
Катедра по анатомия, хистология и ембриология

Д-р Станчо Стефанов Станчев

**Постнатални промени в структурата на
бъбрек при нормотензивни и спонтанно
хипертензивни плъхове**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

Област на висше образование:

7. Здравеопазване и спорт, по професионално направление 7.1 Медицина

Научна специалност: **Анатомия, хистология и цитология**

Научни ръководители:
Доц. д-р Лина Малинова, дм
Проф. д-р Бойчо Ланджов, дм

София, 2018 г.

Медицински университет – София
Медицински факултет
Катедра по анатомия, хистология и ембриология

Д-р Станчо Стефанов Станчев

**Постнатални промени в структурата на
бъбрек при нормотензивни и спонтанно
хипертензивни плъхове**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Област на висше образование:

7. Здравеопазване и спорт, по професионално направление 7.1 Медицина

Научна специалност: **Анатомия, хистология и цитология**

Научни ръководители:
Доц. д-р Лина Малинова, дм
Проф. д-р Бойчо Ланджов, дм

София, 2018 г.

Дисертационният труд е написан на 135 стандартни печатни страници и е онагледен с 66 фигури (54 цветни и 12 чернобели), 2 схеми и 8 таблици. Библиографската справка включва 294 заглавия, от които 1 на кирилица и 293 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София, състояло се на 05.07.2018 г.

Дисертантът е зачислен като докторант на самостоятелна подготовка към Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет–София, където са проведени и изследванията по дисертационния труд.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.09.2018 г. от 16.00 ч. в Анатомична аудитория, Медицински университет – София, бул. „Пенчо Славейков” № 34.

Научно жури в състав:

1. Проф. д-р Димка Вълчанова Хинова-Палова, дм, **вътрешен** член, Ръководител на Катедра по анатомия, хистология и ембриология
2. Доц. д-р Лина Гоергиева Малинова, дм - **вътрешен** за МУ-София
3. Проф. д-р Христо Николов Чучков, дмн - **външен** за МУ-София - СУ „Св. Кл. Охридски” – София
4. Проф. д-р Виолета Григорова Бурнева, дмн - **външен** за МУ-София, пенсионер
5. Проф. д-р Елена Борисова Джамбазова, дм - **външен** за МУ-София - СУ „Св. Кл. Охридски” - София

Резервни членове:

1. Проф. д-р Бойчо Василев Ланджов, дм - **вътрешен** за МУ-София
2. Доц. д-р Минко Господинов Минков, дм - **външен** за МУ-София, МУ-Варна

Материалите по защитата са на разположение в секретариата на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София, ул. „Здраве” № 2.

Съдържание:

I. Въведение	5
II. Цел и задачи	7
III. Материал и методи	8
IV. Собствени резултати	16
V. Обсъждане	38
VI. Изводи.....	53
VII. Приноси	54
VIII. Публикации по дисертационния труд.....	55
IX. Цитирания	55
X. Научни съобщения във връзка с дисертационния труд.....	56

Използвани съкращения

АМФ – аденозин монофосфат

АТФ – аденозин трифосфат

НАДФ – никотинамид-динуклеотид-фосфат

НАДФН – никотинамид-динуклеотид фосфат (окислен)

ФАД – флавин-аденин-динуклеотид

ФМН - флавинмононуклеотид

ХЕ - хематоксилин и еозин

цГМФ – цикличен гуанозин монофосфат

ВН4 - тетрахидробиоптерин

NLA- нитро-L-аргинин

L- NAME - N-нитро-L-аргинин метилов естер

рГЦ - разтворима гуанилат циклаза

ЮГА – юктагломеруларен апарат

ТГОВ – тубулогломеруларна обратна връзка

7-NI – 7-нитроиндазол

eNOS – ендотелна азотен оксид синтаза

iNOS – индуцируема азотен оксид синтаза

nNOS – невронална азотен оксид синтаза

NO – азотен оксид

PAS – Перйодна киселина, реактив на Шиф

SHR – спонтанно хипертензивни плъхове

WR – плъхове от порода Wistar (Вистар)

SHR-K – спонтанно хипертензивни плъхове кортикални нефрони

SHR-Ю – спонтанно хипертензивни плъхове юкстамедуларни нефрони

WR-K – Wistar плъхове кортикални нефрони

WR-Ю – Wistar плъхове юкстамедуларни нефрони

I. Въведение

Настъпващите през постнаталното развитие морфологични промени в бъбречната структура могат да бъдат както възрастово обусловени, така и вследствие на подлежащ патологичен процес. Редица изследвания на отделителната система и в частност на бъбреците показват, че макар и със значителен функционален резерв, развиващите се изменения в тези органи в отговор на първични и вторични патогенетични механизми в редица случаи са неспецифични. Тази липса на строга корелация между определена нозологична единица и описвана морфология води до някои затруднения при определяне на тежестта на органните поражения в клиничната практика.

Есенциалната хипертония е социално значимо заболяване, което е един от главните фактори, водещи до хронична бъбречна увреда. Обусловените от високото кръвно налягане морфологични промени засягат едновременно бъбречния паренхим и интерстициум и в развитието им се обсъждат различни влияния като генетична предиспозиция, пол, расова принадлежност (Baylis и Corman 1998; Tracy 1996). Според наличните данни, сред най-използваните експериментални модели на есенциална хипертония у човек е породата спонтанно хипертензивни плъхове (SHR) (Zhang-James и съавт. 2013), която се оказва акуратен модел при изучаване на настъпващите структурни изменения в таргени органи и системи, вследствие на този патологичен процес.

В литературата са налице редица качествени и количествени изследвания, които описват настъпващите изменения в бъбречната структура в условия на повишено кръвно налягане. Основните находки включват нарастваща честота на склерозирани гломерули, вкл. хиалинна гломерулосклероза, тубулна атрофия, промени в различните по калибър интратенални кръвоносни съдове, тубулоинтерстициална фиброза, характерни морфометрични промени в бъбречните телца на нефроните (Komatsu и съавт. 1995; Hughson и съавт. 2002). Макар и да се характеризират с по-ранен и агресивен ход, в голямата си част тези промени са неспецифични, тъй като могат да бъдат наблюдавани и в процеса на стареене. Това понякога води до някои трудности при определянето на етиологията на настъпващите изменения в бъбречната структура.

Налице са противоречиви мнения относно преценката за бъбречния функционален капацитет само въз основа на определени морфологични изменения. Много автори считат, че не оценяването на бъбречните телца, а фиброзните изменения отразяват по-добре настъпващите промени в бъбречната функция (Bohle и съавт. 1990; Eknoyan и съавт. 1990). От друга страна, възможността за цялостно заличаване на гломерули и заместването им от съединителнотъканни елементи (Kriz и Le Hir 2005), би довело до погрешни заключения за по-тежки структурни изменения по хода на тубулоинтерстициума, както и подценяване на степента на

гломерулната увреда. Въпреки наличните модели разграничаващи възрастово обусловената и хипертензивната нефросклероза, практиката показва, че трудно би било да се определи с точност механизма ѝ на развитие – вследствие на стареене, дълготрайна хипертония или друго подлежащо заболяване.

Като паракринен фактор азотният оксид (NO) е включен в регулацията на редица бъбречни функции като поддържане гломерулната и медуларна хемодинамика, повлияване на обусловената от кръвното налягане натриуреза, инхибиране на тубулната Na^+ -ребсорция, модулиране на симпатиковата нервна активност (Ren и съавт. 2000; Ito и Ren 1993). Установена е експресията и на трите изоформи на ензима азотен оксид синтаза (NOS) в бъбречната структура (Fernández и съавт. 2003). От направената литературна справка прави впечатление, че повечето автори се фокусират върху изследване на ендотелната изоформа на ензима (eNOS). През последните години обект на изучаване е невроналната NOS (nNOS), по отношение разпределението ѝ в бъбреците и ролята на продуцирания от нея NO. За сега отчасти е изяснено значението на nNOS в клетките на macula densa, където взема участие в регулацията на тонуса на аферентните артериоли на нефроните (Тојо и съавт. 2006). Във вътрешната медула nNOS е включена в дълготрайната регулация на кръвното налягане (Mattson и Bellehumeur 1996). Данните относно експресията и функцията на nNOS в другите структурни елементи на нефроните са оскъдни и несигурни. Редица автори установяват промени в експресията на NOS в бъбречния кортекс и медула при SHR, но в не малка част от случаите липсва ясното разграничаване между калций-зависимите изоформи на NOS – eNOS и nNOS. Още повече използването на различни техники за изследване на разпределението на nNOS показва противоречиви резултати, което подсказва необходимостта от методичен подход при изучаване на промените в бъбречната структура.

Настоящият труд е опит за комплексно изследване на промените в бъбречната морфология при различни възрастови групи нормотензивни Wistar плъхове и SHR, посредством хистологични, хистохимични, имунохистохимични и електронномикроскопски техники.

II. Цел и задачи

Цел: Да се проследят постнаталните промени в структурата на бъбрек при нормотензивни и спонтанно хипертензивни плъхове чрез хистологично, имунохистохимично и електронномикроскопско изследване.

Задачи:

1. Проследяване на промените в структурата на нефроните и бъбречния интерстициум при нормотензивни плъхове на различни възрасти.
2. Проследяване на промените в структурата на нефроните и бъбречния интерстициум при спонтанно хипертензивни плъхове на различни възрасти.
3. Имунохистохимичен анализ на експресията на невронален азотен оксид-синтаза в бъбречната структура при различни възрасти нормотензивни плъхове.
4. Имунохистохимичен анализ на експресията на невронален азотен оксид-синтаза в бъбречната структура при различни възрасти спонтанно хипертензивни плъхове.
5. Морфометрична характеристика на бъбречните телца и гломерулите на кортикални и юкстамедуларни нефрони при различни възрасти нормотензивни плъхове.
6. Морфометрична характеристика на бъбречните телца и гломерулите на кортикални и юкстамедуларни нефрони при различни възрасти спонтанно хипертензивни плъхове.

III. Материал и методи

1. Експериментални животни

В настоящата работа е използван материал от бъбреци на мъжки нормотензивни лабораторни плъхове от породата Wistar (WR) и мъжки спонтанно хипертензивни плъхове (SHR). Те се отглеждаха при стандартни условия – 12-часов светло-тъмен интервал и осигуряване на оптимална температура, влажност и достатъчни количества вода и стандартни гранули за гризачи. Спазени бяха международните принципи за експериментиране с животни (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC, National Academy Press, 1996), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет – София (КЕНИМУС).

Данните върху бъбречната морфология при нормотензивни и хипертензивни плъхове, представени в настоящата работа, са получени при анализ на бъбреците на 18 мъжки плъха, разпределени в шест групи по три животни във всяка от тях:

- Първа група: четиримесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;
- Втора група: шестмесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;
- Трета група: дванадесетмесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;
- Четвърта група: четиримесечни спонтанно хипертензивни плъхове – 3 броя животни;
- Пета група: шестмесечни спонтанно хипертензивни плъхове – 3 броя животни.
- Шеста група: дванадесетмесечни спонтанно хипертензивни плъхове – 3 броя животни.

2. Фиксиране на хистологичния материал

Експерименталните животни определени за вземане на хистологичен материал, бяха подложени на интраперитонеална анестезия с Thiopental 40mg/kg телесна маса. След послойно отваряне на гръдната кухина се извърши транскардиална перфузия с 4% разтвор на параформалдехид в 0.1 М фосфатен буфер с pH 7.2 - 7.4. Количеството перфузионен разтвор за всички възрасти – 150-200 мл. Продължителността на всяка перфузия беше от порядъка на 15-20 минути. Веднага след това бъбреците се отпрепарираха и се подлагаха на постфиксация за 1 час в същия фиксатор на стайна температура. След неколkokратно промиване в 0.1 М фосфатен буфер, pH 7.4, материалът се оставяше да пренощува в 0.01 М фосфатен натриево-хлориден буфер (PBS) pH 7.2-7.4 при температура 4 °C.

Всички експериментални процедури, хистологичните и имунохистохимичните изследвания бяха извършени в Катедрата по анатомия, хистология и ембриология към Медицински университет – София.

3. Изготвяне на парафинови тъканни срези

- **Промиване**

Материалът престоя 24 часа във формалин (10%), след което беше промит с вода за отстраняване на формалина.

- **Обезводняване**

Процесът беше извършен, като пробите преминаха през спиртова редица с различна концентрация (70-80-96% + 2 броя абсолютен алкохол) и след това последва 3 броя ксилол и 3 броя парафин.

- **Включване в уплътняваща среда**

Включване на тъканните късчета в разтопен лабораторен парафин, специално приготвен за тази цел и съхраняван в термостат при температура 56-60°C. За включването са използвани специфични форми, поставени върху метална плоча. Оформяне на тъканните късчета в парафинови блокчета.

- **Приготвяне на срези от парафинови блокчета**

1. Подготовката на предметните стъкла, върху които бяха залепени срезите, премина през обработка с глицерин – белтък.
2. Фиксиране на микротомната пластина и подготвяне за рязане (ъгълът на пластината беше стандартизиран за движение в определен период).
3. Поставяне на парафиновото блокче на микротомната глава.
4. Определяне на дебелината на микротомния срез – 7-10 μm .
5. Извършване на среза, пренос върху предметното стъкло и опъване в периферните зони.
6. Подреждане на готовите препарати върху електрически нагревател за отстраняване на парафина от материала.

4. Оцветяване с хематоксилин и еозин

Отстраняване на парафина от предметните стъкла преди стартиране на процедурата. Преминаване на пробите през 3 броя ксилол за 30 минути. Последва премахване на ксилола чрез обработване на пробите с 3 броя етанол с низходяща концентрация. Извършване на промиване с течаща вода и попиване. Последва стартиране на процедурата по оцветяване на готовите препарати.

- **Методика**

1. Оцветяване с хематоксилин в рамките на 5 минути.

2. Вода за диференциране за 5-30 минути.
3. Диференциране в 1% разтвор на солна киселина в 70% спирт с продължителност 5-10 секунди.
4. 1% разтвор на еозин в рамките на 10 минути.
5. Течаща вода за 5 минути.
6. Диференциране в спирт.
7. Просветляване и включване на хистологичните препарати. Просветляването беше извършено чрез накапване на ксилол, а за включването използвахме специфична среда – ентелан.

- **Работни разтвори**

1. За приготвянето на 0,2% разтвор на еозин се разтваря 1 грам еозин в 50 ml 70% разтвор на спирт.
2. За приготвянето на хематоксилин се разтваря 1 грам хематоксилин в 1 литър дестилирана вода на топло. На следващия етап, към разтвора се прибавя 0,2 грама натриев или калиев йодат до пълното му разтваряне, след което се добавя 50 грама калиево-алуминиева стипца и 50 грама хлоралхидрат. След тяхното разтваряне се добавя 0,5 грама лимонена киселина.

5. Оцветяване по метода на Малори

След фиксацията във формалин се проведе допълнителна фиксация в сместа на Ценкер за 15-30 минути, след което препаратите бяха поставени в йодна тинктура за премахване на сублиматните утайки. Последва депарафиниране на срезите и процедурата по оцветяване на готовите препарати.

- **Методика**

1. Поставяне на препаратите в 1% разтвор на кисел фуксин за 1 – 2 минути.
2. Изплакване в дестилирана вода за 1 – 2 минути.
3. Пренасяне в 1% разтвор на фосфомолибденова киселина за 3 – 5 минути.
4. Изплакване в дестилирана вода.
5. Поставяне на срезите в прясно филтрирана смес от анилиново синьо, оранж G и оксалова киселина за 2 минути.
6. Промиване в дестилирана вода.
7. Диференциране в 96% спирт за 3 – 5 минути, докато под микроскоп не се появиха колагенните влакна, оцветени в синьо.
8. Просветляване и включване на хистологичните препарати. Просветляването беше извършено чрез накапване на ксилол, а за включването използвахме специфична среда – ентелан.

- **Работни разтвори**

1. 0,1 % воден разтвор на кисел фуксин.
2. 1% разтвор на фосфомолибденова киселина.

3. Смес от 0,5 грама анилиново синьо, 2 грама оранж G, 2 грама оксалова киселина и 100 ml дестилирана вода. Сместа беше загрята до кипване, след което охладена и филтрирана непосредствено преди провеждане на процедурата по оцветяване на препаратите.

6. PAS (Периодна киселина, реактив на Шиф) – реакция

Приготвяне на работните разтвори

1. Реактив на Шиф – 1грам основен фуксин се разтваря в 200мл кипяща вода, като периодично се разклаща съдът и кипенето продължава в течение на 5 минути. След това се охлажда до 50 °C и се филтрира. Добавят се 20мл 1N разтвор на NaCl и се охлажда до 25 °C , след което се добавя 1г натриев метабисулфит или калиев метабисулфит и се оставя на тъмно и хладно място. На 18-24 час се прибавят 2г активни въглища, силно се разклаща в течение на 1-2 мин., филтрира се и се съхранява на тъмно и хладно място в хладилник при температура 0-4 °C. Готовият реактив на Шиф е безцветен или има светложълт цвят. Почервяването на разтвора в процеса на съхранението говори за неговото разлагане и негодност за употреба.
2. Серниста вода – към 200 мл дестилирана вода се добавят 4мл концентрирана HCl. В 25мл дестилирана вода се разтварят 4г безводен натриев сулфат. Двата разтвора се смесват.
3. Периодатен разтвор – 1г калиев периодат или 2,5г натриев периодат се разтваря в 100мл дестилирана вода.

• Методика

Фиксацията се извършва в спирт, 10% формалин или течностите на Карнуа, Ценкер и други. Тъканните късчета се включват в парафин. Приготвят се парафинови срезове. Подходящи са и замразени срезове. Желателно е срезове да не са по-дебели от 5-7 μm .

1. Срезове се депарафинират и довеждат до вода.
2. Пренасят се в разтвор на йодна киселина за 5-10 мин. или в периодазен разтвор за 20-30 мин. .
3. Щателно се промиват в 2-3 кювети дестилирана вода по 2-3 мин., за да се отдели напълно йодната киселина (остатъкът от нея).
4. Пренасят се в реактива на Шиф за 10-20 мин., като кюветите се поставят на тъмно.
5. Обработват се в 3 кювети със свежо приготвена сериеста вода по 1-2 мин. във всяка кювета.
6. Промиват се на течаща вода в течение на 10 мин. и след това се изплакват в дестилирана вода.
7. Обезводняват се във възходяща спиртна редица, просветляват се в ксилол и се включват в балсам (ако е необходимо, се оцветяват

ядрата с хематоксилин, преди да се обезводнят след т.б; оцветените с хематоксилин срезове са по-контрастни и по-подходящи за документиране на микроскопски находки чрез направата на микроснимки). Веществата с полизахаридна природа са оцветени в пурпурночервен или виолетовочервен цвят. Неутралните полизахариди са обикновено пурпурночервени, а гликогенът – по-тъмно оцветен.

7. Методика на имунохистохимичната процедура

- Фиксиране в неутрален формалин на късчетата тъканен материал и включване в лабораторен парафин.
- Приготвяне срези с дебелина 7 μm от парафиновото блокче и монтирането им върху предметни стъкла, които предварително бяха обработени с адхезив.
- Пригответените слайдове бяха инкубирани за 2 часа на 50°C в термостат и обработени с ксилол за депарафиниране. Беше проведено рехидратиране на срезите с низходяща концентрация на алкохоли до вода, като се премина през следните етапи:
 1. ксилол III – 5 min
 2. ксилол II – 5 min
 3. ксилол I – 5 min
 4. абсолютен 100% етилов алкохол – 2 min
 5. 96% етилов алкохол – 2 min
 6. 80% етилов алкохол – 2 min
 7. 70% етилов алкохол – 2 min
 8. дестилирана вода I – 5 min
 9. дестилирана вода II – 5 min

Следва имунохистохимична процедура:

При имунохистохимичните реакции в настоящето изследване беше прилагана авидин-биотин пероксидаза комплекс (ABC) техниката съгласно Hsu и съавтори (1981). Всички имунохистохимични реакции бяха извършени във влажна камера върху парафинови срези с дебелина на срезите 7 μm .

В тази група експерименти бяха използвани първични антисеруми/антитела, които бяха насочени срещу невроналната азотен-оксид синтаза. Имунореакциите бяха визуализирани с видово-специфичен биотинилиран вторичен антисерум. По-конкретно имунохистохимичните реакции бяха осъществени по следния начин:

- Пермеабелизиране на срезите с 0,01 M PBS (pH 7,36), съдържащ 0,3% Triton X-100 (Merck) трикратно по 5 min с цел подобряване на пенетрацията на антитялото при последваща инкубация.
- Инхибиране на ендогенната пероксидаза с 1,2% водороден пероксид в абсолютен метанол в продължение на 30 min на стайна температура с последващо 15-минутно промиване в 0,01 M PBS / 0,3% Triton X-100.

- Пермеабилзиране на срезите с 0,01 M PBS / 0,3% Triton X-100.
- За редуциране на неспецифичното пероксидазно оцветяване, срезите бяха преинкубирани с 0,01 M PBS, съдържащ 5% нормален кози серум за 1 h на стайна температура. Кратко двукратно промиване по 5 min с 0,01 M PBS / 0,3% Triton X-100.
- Инкубация на срезите с първично моноклонално анти-nNOS антитяло в разреждане 1:500. Общото инкубационно време беше 48 h, от които 24 h на стайна температура и след това още 24 h в хладилник при 4°C.
- Промиване на срезите с 0,01 M PBS (pH 7,36) 3 x 5 min.
- Инкубация с вторично (мостово) антитяло –биотинилиран антимиши IgG в разреждане 1:250 с 0,01 M PBS. Инкубацията с второто антитяло беше в продължение на 2 h на стайна температура.
- Промиване на срезите с 0,01 M PBS (pH 7,36) 3 x 5 min.
- Инкубация на срезите в ABC комплекса. Времето за инкубация беше 1 h във влажна камера на стайна температура.
- Промиване на срезите с 0,01 M PBS 2 x 5 min.
- Промиване на срезите с 0,05 M Tris/HCl буфер с pH 7,54 за 5 min.
- Визуализиране на реакциите от 5 до 15 min на тъмно с помощта на 3,3' диаминобензидин (DAB) като хромоген.
- Кратко промиване с 0,05 M Tris/HCl буфер, изплакване в дестилирана вода.
- Контраоцветяване и включване на тъканните срези - използва се хематоксилин по Майер. Поставяне на слайдовете в кювета със съответния хематоксилин. Времето за оцветяване се определя от силата и качеството на хематоксилина.
- Следва възходяща редица от алкохоли, просветляване в ксилол и включване в ентелан (Merck), а именно:
 1. дестилирана вода – 5 min
 2. 70% етилов алкохол – 2 min
 3. 80% етилов алкохол – 2 min
 4. 96% етилов алкохол – 2 min
 5. абсолютен 100% етилов алкохол – 2 min
 6. ксилол 2x 10 min

• Специфичност на антителата

За тестването на специфичността на антителата в това проучване, бяха използвани позитивни и негативни контроли:

Позитивна контрола – използвани са тъкани от различни области на мозък с известно и постоянно оцветяване, монтирани на същото предметно стъкло.

Негативна контрола – използвана е тъкан, която преминава през всички стъпки на имунооцветяването, като първичното антитяло беше заместено с фосфатен буфер.

8. Методика на електронномикроскопското изследване

1. Префиксация с 3% глутаралдехид за 60 минути;
2. Промиване с 0,1 М фосфатен буфер с рН 7,4-7,6;
3. Фиксация с 1% OsO₄ за 60 минути;
4. Промиване с 0,1 М фосфатен буфер с рН 7,4-7,6;
5. Дехидратация във възходяща редица алкохоли;
6. Пропиване в пропиленоксид за 15 минути;
7. Включване на равни количества пропиленоксид и Durcupan за 30 минути;
8. Включване в чиста смола за 20 минути при 56°C;
9. Включване в Durcupan;
10. Полимеризация за 48 часа при 56°C;
11. Рязане на ултратом – срези с дебелина 70-80 nm с последващо улавяне на медни мрежички;
12. Контрастиране за 20 минути в уранил ацетат;
13. Контрастиране за минути в оловен нитрат.

9. Микроскопиране и анализ на получените резултати

Получените качествени и количествени данни в настоящия труд при светлинно-микроскопското изследване на препарати от бъбреци на плъхове беше проведено с микроскопска система Nikon Elcipse 80i (Japan). За целите на качествения анализ препаратите бяха заснемани на различно увеличение – x40, x100, x200, x400 и x1000. Електронно-микроскопското изследване се извърши с електронен микроскоп Hitachi 500 като използваните увеличения бяха подбрани съобразно изследваните зони на интерес в бъбречната структура.

Количественият анализ е изготвен с компютърна система за анализиране на образи NIS-Elements Advanced Research (Ver. 2.30) като бяха използвани по пет срези от бъбреците на всяко животно. С оглед получаването на достоверни резултати бяха въведени следните критерии:

1. изследване само на нефрони, при които ясно личи съдовия и тубулен полюси на бъбречните телца, с което се стандартизира областта, в която се извършва измерването на морфометричните показатели на бъбречните телца и гломерули;
2. бъбречните телца на избраните кортикални нефрони да се намират строго в периферията на кората;
3. бъбречните телца на изследваните юкстамедуларни нефрони да се намират в непосредствена близост с бъбречната медула.

За изпълнението на критериите се спазва следния алгоритъм на работа:

- На малките увеличения (x100, x200) бяха разграничени бъбречните телца на кортикалните и юкстамедуларни нефрони.
- Областите на интерес бяха изследвани на увеличение x400.
- С подходящ софтуер бяха очертани границите на бъбречните телца и гломерулите на двата изследвани вида нефрони.

- Анализирани морфометрични показатели на кортикални и юкстамедуларни нефрони през различни периоди от постнаталното развитие на нормотензивни плъхове и SHR включват:
 - площ на бъбречните телца на кортикални нефрони (μm^2)
 - площ на гломерулите на кортикални нефрони (μm^2)
 - площ на бъбречните телца на юкстамедуларни нефрони (μm^2)
 - площ на гломерулите на юкстамедуларни нефрони (μm^2)

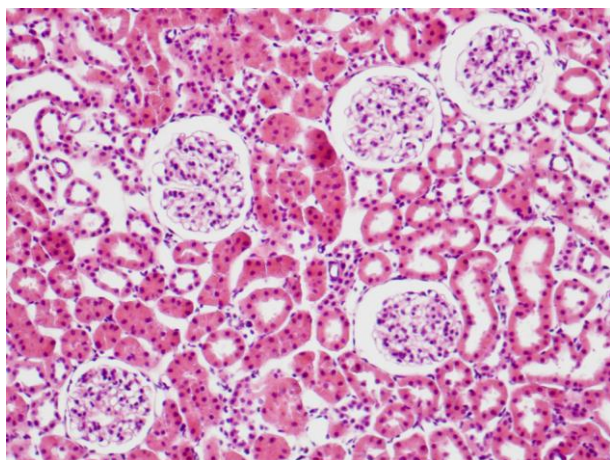
Експерименталните данни бяха подложени на статистическа оценка със Student T test. Статистически значими разлики бяха отчетени при $p < 0,05$. За визуализация на експерименталните данни са използвани колонни диаграми – Bar Chart/Bar Plot с правоъгълници. За обработката на данните беше използвана компютърна програма за статистически анализ.

Диаграмите от типа Box-whisker plot – “кутия с мустачки” изобразяват: точка (тази точка съответства на средно аритметичното), която е заградена от правоъгълник (“кутия”), страната на който е интервалът [средно - стандартна грешка за средното, средно + стандартна грешка за средното] = [Mean-SE, Mean+SE] (SE – standard error /стандартна грешка/). От този правоъгълник излизат мустачки, които са доверителен интервал на средната стойност – намалена или увеличена със стандартна грешка.

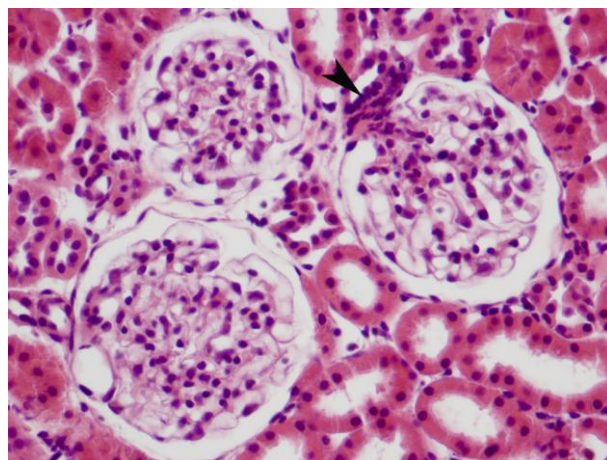
IV. Собствени резултати

1. Качествени характеристики на бъбречната структура през различни етапи от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR

При четиримесечните Wistar плъхове при оцветяването с ХЕ не се установяват отчетливи промени в бъбречния паренхим. Морфологията на бъбречните телца на кортикалните, междинните и юкстамедуларни нефрони не показва съществени различия (фиг. 1). Не се установяват контакти между париеталния и висцерален листове на Баумановата капсула, а в загражданото от тях пространство не се наблюдават патологични отлагания. Гломерулите се характеризират с нормална морфология, ясно личат лумените на капилярните бримки. В зависимост от мястото на преминаване на среза, в някои препарати може да се видят съдовия и тубулен полюси на бъбречните телца, както и ЮГА (фиг. 2). Демонстрира се хетерогенна популация от проксимални, дистални тубулни сегменти и събирателни каналчета. Отчетливо се вижда едноредния кубичен епител, тапициращ проксималните и дисталните тубули като клетките са с централно разположено базофилно ядро.



Фиг. 1. Препарат от бъбрек, WR, възраст – 4 месеца, ХЕ. Увеличение – $\times 200$.



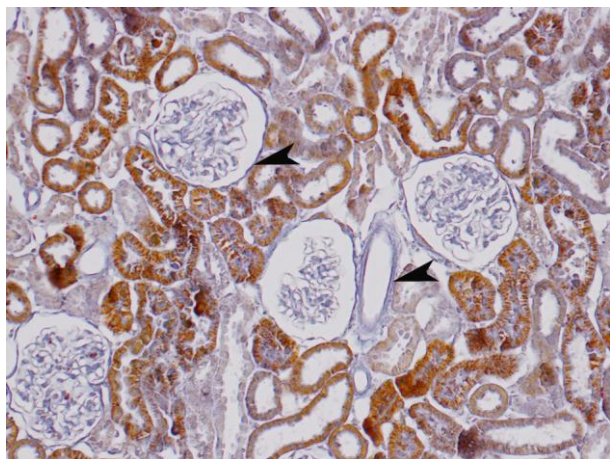
Фиг. 2. ЮГА, macula densa (стрелка), WR, възраст – 4 месеца, ХЕ. Увеличение – $\times 400$.

При трихромното оцветяване по Малори, при четиримесечни Wistar плъхове е налице оскъдно количество фини колагенни влакна разположени в съседство с бъбречните телца, перигломеруларно и перитубуларно, както и около по-големите по калибър кръвоносни съдове (фиг. 3).

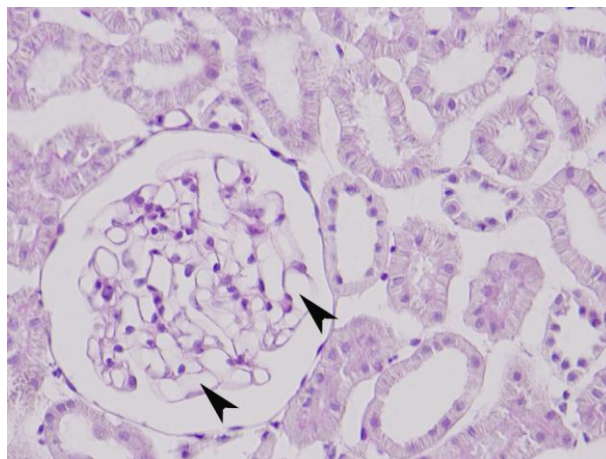
Използването на PAS – реакция при четиримесечни Wistar плъхове способства за по-ясното демонстриране на базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули. Не се установи отлагането на

PAS-позитивен материал в гломерулните клъбца и интрааренални кръвоносни съдове (фиг. 4).

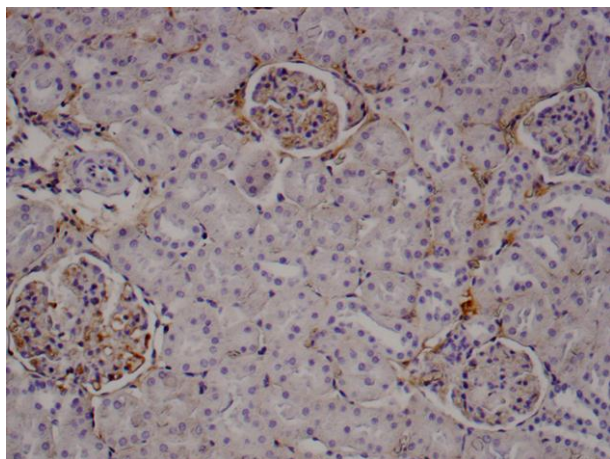
Имунохистохимичното оцветяване за pNOS при четиримесечни Wistar плъхове показва хетерогенно разпределение на ензима. В кортекса се установява положителна активност на ензима в областта на париеталния лист на Баумановата капсула, интрагломеруларно и *macula densa* (фиг. 5). Умерено положителна реакция се наблюдава и в клетките на събирателните каналчета (фиг. 6).



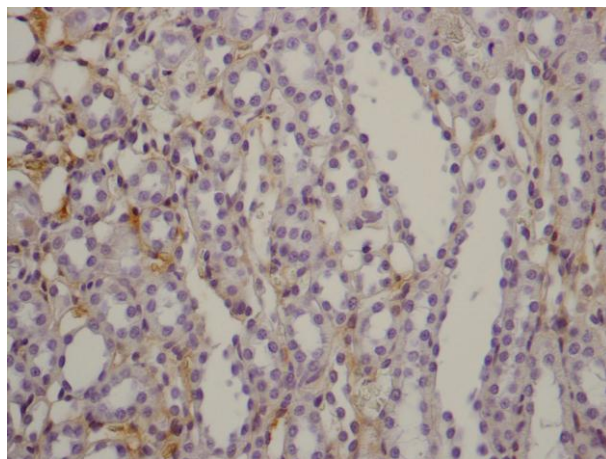
Фиг. 3. Периартериално и перигломеруларно разположени фини колагенни влакна (стрелки), WR, възраст – 4 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x200.



Фиг. 4. Ясно разграничими капиларни лумени (стрелки), WR, възраст – 4 месеца, PAS - реакция. Увеличение – x400.

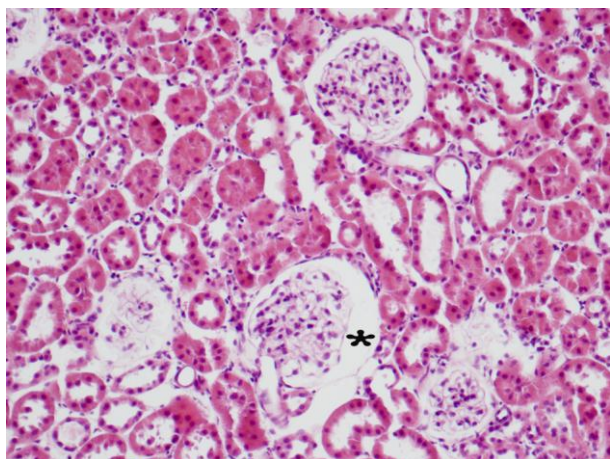


Фиг. 5. Имунохистохимично изследване за pNOS, WR, възраст – 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

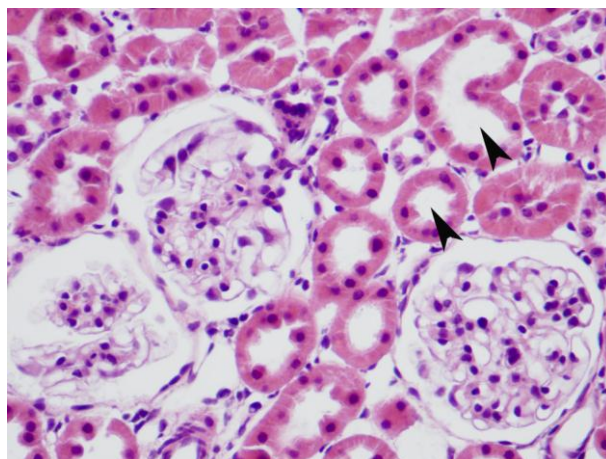


Фиг. 6. Имунохистохимично изследване за pNOS, WR, възраст – 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x400.

При шестмесечни Wistar плъхове при използването на ХЕ се демонстрират развиващите се възрастово обусловени морфологични промени в структурата на бъбрека, които включват сбръчкване на гломерулни клъбца, увеличаване на пространството между двата листа на Баумановата капсула и нарастващ брой дилатирани тубулни сегменти, израз на развиваща се атрофия (фиг. 7; фиг. 8).

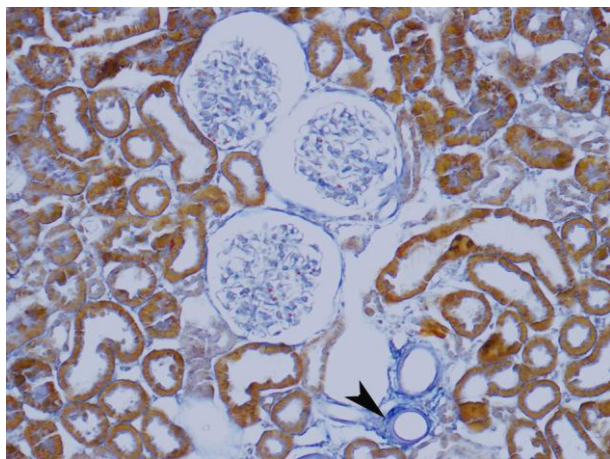


Фиг. 7. Увеличено пространство на Баумановата капсула (звезда), WR, възраст – 6 месеца, ХЕ. Увеличение – х200.

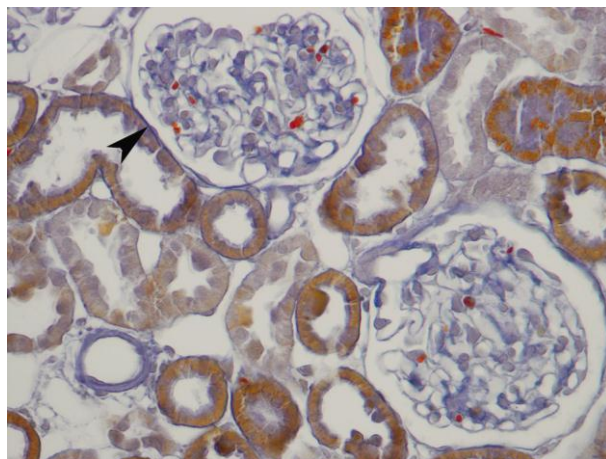


Фиг. 8. Дилатирани тубулни лумени (стрелки), WR, възраст – 6 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.

При шестмесечните Wistar плъхове при оцветяването по Малори отчетливо се забелязват фиброзни изменения в бъбречната структура. Интензивно оцветени в синьо снопчета колагенни влакна се разполагат около по-големите по калибър интратренални кръвоносни съдове, в съседство с париеталния лист на Баумановата капсула, перигломеруларно, както и между бъбречните тубули. Изследването не установи предилекционно засягане на определен вид нефрони. Увеличение на количеството съединителна тъкан се описва и по хода на по-големите по калибър интратренални кръвоносни съдове (фиг. 9; 10; 11).

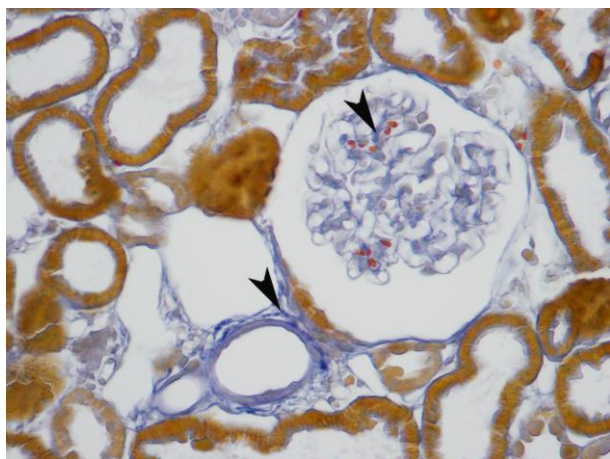


Фиг. 9. Периваскуларна фиброза (стрелка), WR, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х200.

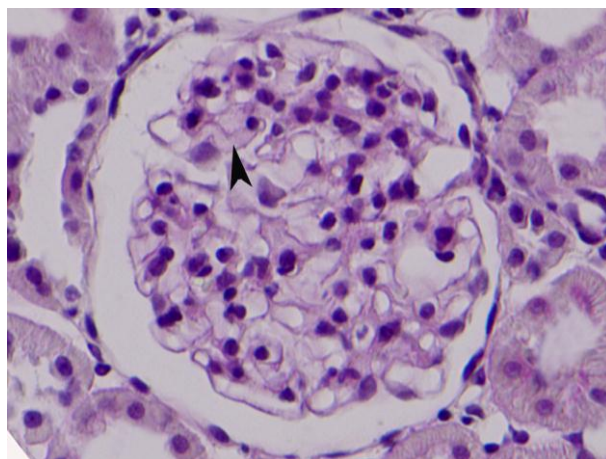


Фиг. 10. Перигломеруларна фиброза (стрелка), WR, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х400.

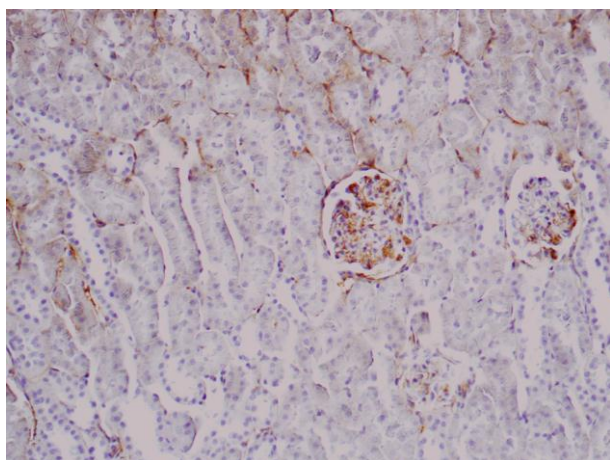
Използването на PAS- реакция при шестмесечните Wistar плъхове демонстрира още по-отчетливо контурите на базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули, в сравнение с младата възрастова група, което дава основание да се предположи за развиващ се процес на началното им задебеление. В част от препаратите се установява и интрагломеруларно разположен PAS-позитивен материал (фиг. 12).



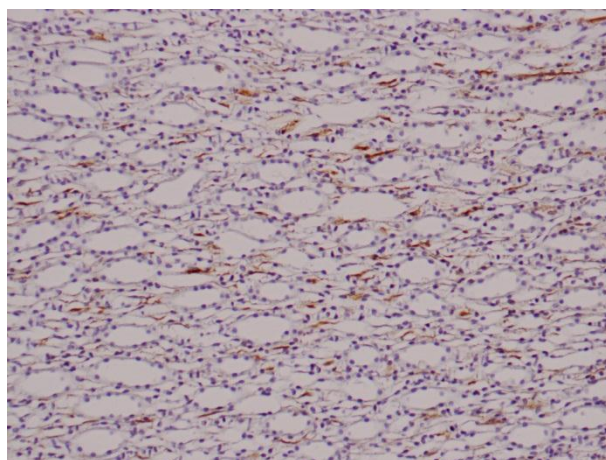
Фиг. 11. Интерстициална и интрагломерулна фиброза (стрелки), WR, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x400.



Фиг. 12. PAS - позитивен материал интрагломеруларно (стрелка), WR, възраст – 6 месеца, PAS-реакция. Увеличение – x1000.



Фиг. 13. Имунохистохимично изследване за pNOS, WR, възраст 6 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

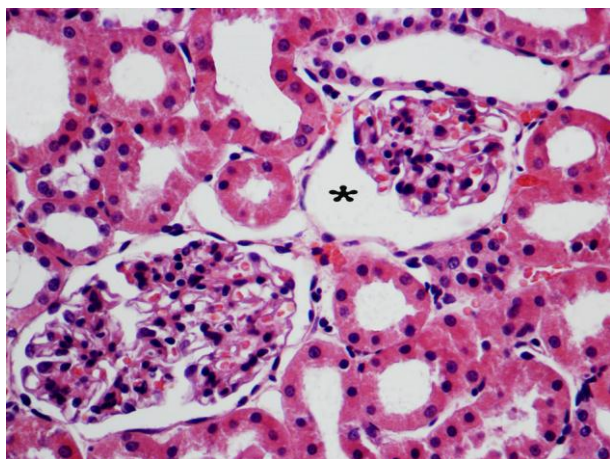


Фиг. 14. Имунохистохимично изследване за pNOS, WR, възраст 6 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

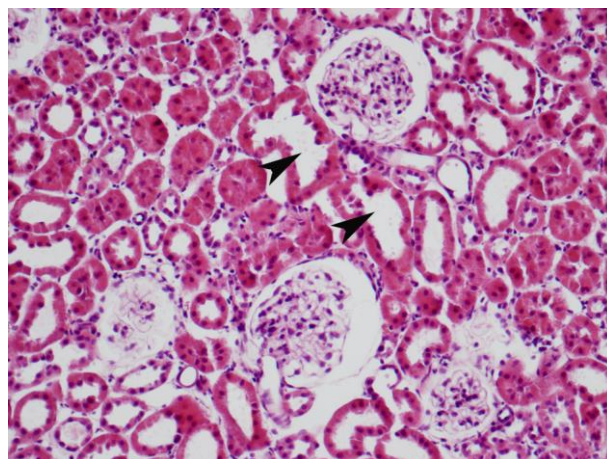
Имунохистохимичното оцветяване за pNOS при шестмесечните плъхове показва хетерогенно разпределение на ензима. Изразено положителна експресия на pNOS се установява интрагломеруларно, в париеталния лист на Баумановата капсула на юкстамедуларните и междинни нефрони. Умерено изразена активност на ензима се установява по хода на проксимални и дистални тубулни сегменти (фиг. 13). По протежение на събирателните каналчета по-интензивна имуноекспресия се наблюдава във вътрешната медула (фиг. 14).

Рутинното оцветяване с ХЕ при дванадесетмесечните Wistar плъхове отразява ясно възрастово обусловените морфологични промени в структурата на бъбрека. Установява се увеличен брой на склеротично изменени гломерули по хода на бъбречния кортекс. Това се изразява в сбръчкване на гломерулните клъбца, не личат ясно лумените на капилярните клъбца. Отчетливо се наблюдава увеличение на Баумановото пространство като при част от бъбречните телца се установяват наличието на контакт между париеталния и висцерален лист на капсулата (фиг. 15). Голяма част от проксималните и дистални тубулни

сегменти се представят с дилатирани лумени, като епителът, който ги тапицира е нискокубичен (фиг. 16).

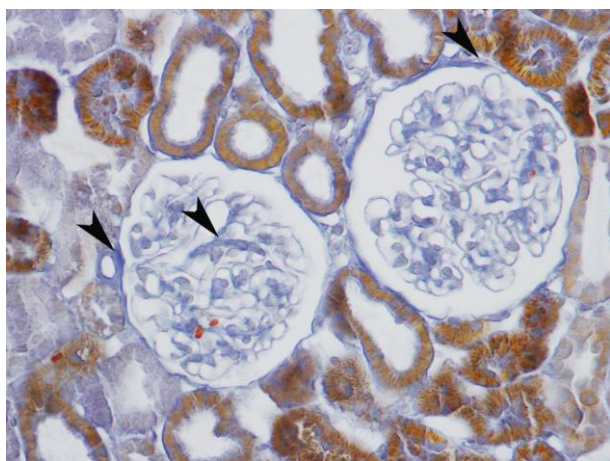


Фиг. 15. Гломерулосклероза и увеличено пространство на Баумановата капсула (звезда), WR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.

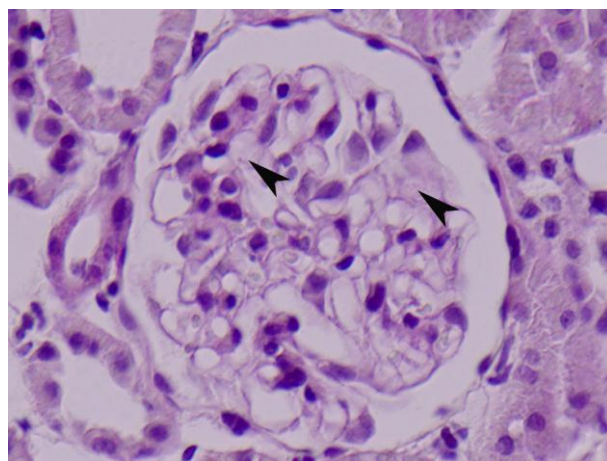


Фиг. 16. Дилатирани тубулни сегменти (стрелки), WR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – х200.

При трихромното оцветяване по Малори при дванадесетмесечните Wistar плъхове ясно се открива повсеместно развита интерстициална фиброза в бъбречната структура. В областта на кортекса отчетливо се виждат интензивно оцветени в синьо снопчета колагенни влакна разположени около бъбречните телца, включително и в самите гломерули. Повлекла от фини колагенни влакна се установяват около тубулите, чийто епител е оцветен в кафяво. Добре представена е и периваскуларната фиброза от концентрични и анастомозиращи помежду си влакна около интратеналните кръвоносни съдове (фиг. 17).



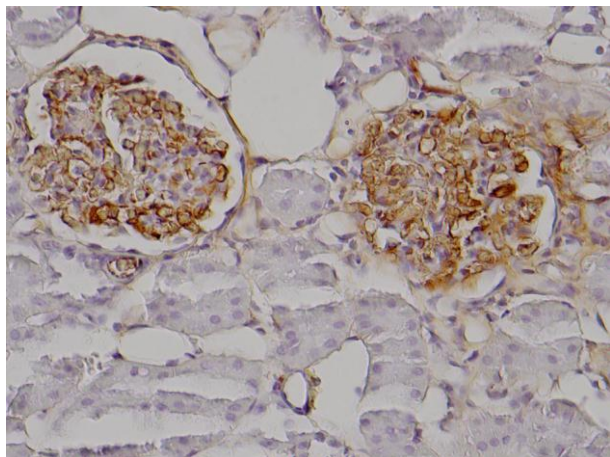
Фиг. 17. Интерстициална и интрагломерулна фиброза (стрелки), WR, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х400.



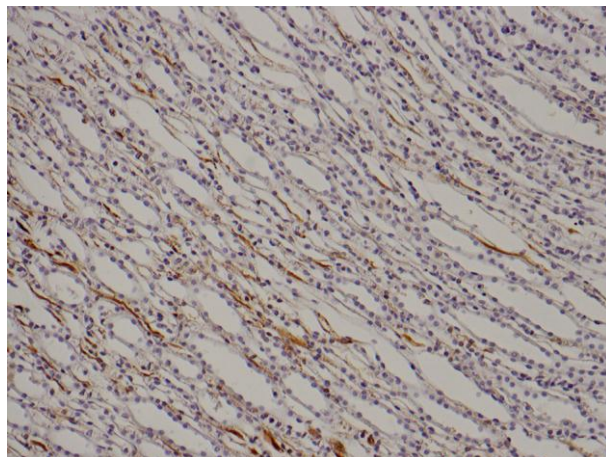
Фиг. 18. PAS - позитивен материал интрагломеруларно (стрелки), WR, възраст – 12 месеца, PAS-реакция. Увеличение – х1000.

Използването на PAS- реакция при дванадесетмесечните Wistar плъхове отразява още по-детайлно контурите на гломеруларните базални мембрани на бъбречните телца, включително и на тубулните сегменти по протежение на кортекса и медулата, което предполага, че

е светлинномикроскопски израз на развиващото им се задебеление. Наблюдава се интрагломеруларното отлагане на хиалин като в засегнатите участъци не личат ясно капилярните лумени (фиг. 18).



Фиг. 19. Имунохистохимично изследване за pNOS, WR, възраст 12 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x400.



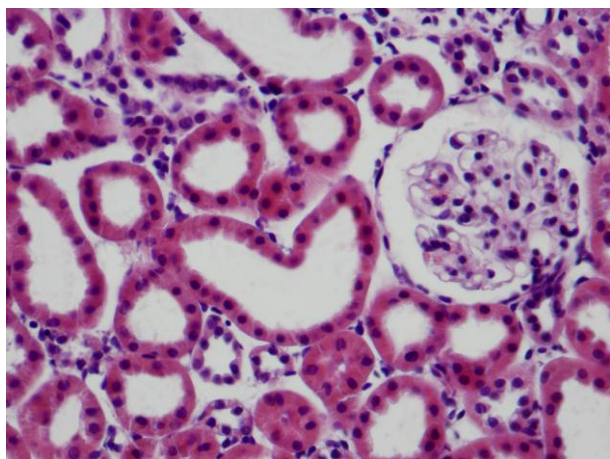
Фиг. 20. Имунохистохимично изследване за pNOS, WR, възраст 12 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

Имунохистохимичното оцветяване за pNOS при възрастната група плъхове показва хетерогенно разпределение на ензима. Силно положителна активност на pNOS се открива в париеталния лист на Баумановата капсула, интрагломеруларно, както и в клетките на *macula densa*. Слаба до липсваща е експресията на ензима по хода на проксималните и дистални тубули (фиг. 19). Отчетливо положителна е реакцията и по хода на събирателните каналчета (фиг.20).

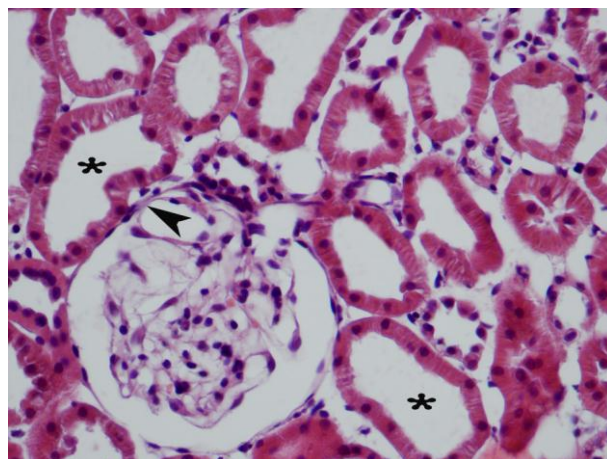
При четиримесечни SHR при оцветяването с ХЕ ясно се разграничават основните структурните компоненти на бъбречния кортекс и медула. Бъбречните телца на нефроните показват относително нормална морфология като не се описват съществени промени по хода на гломерулите и Баумановите капсули. Отчетливо се демонстрират границите на Баумановото пространство като не се установява наличие на патологични контакти между париеталния и висцералния лист на капсулите. Едноредният кубичен епител на проксималните и дистални каналчета е представен от клетки с централно разположено базофилно ядро. Трудното разграничаване на лумените на проксималните тубули е във връзка с добре изразената клетъчна микровилозност. Наблюдават се и различни по калибър интратенални кръвоносни съдове разположени по хода на бъбречния кортекс и медула (фиг.21).

При шестмесечните SHR при оцветяването с ХЕ се установява нарушаване на нормалната морфология на бъбречната структура. Налице е увеличен брой на склеротично изменени гломерули, които видимо са сбръчкани, съдържащи еозинофилен материал. Регистрира се нарастване на Баумановото пространство, като при някои бъбречни телца, особено по хода на вътрешния кортекс се описват патологични контакти между париеталния и висцерален лист на Баумановата капсула.

На надлъжните срезове ясно се вижда дилатация на проксималните и дистални тубулни сегменти (фиг. 22).



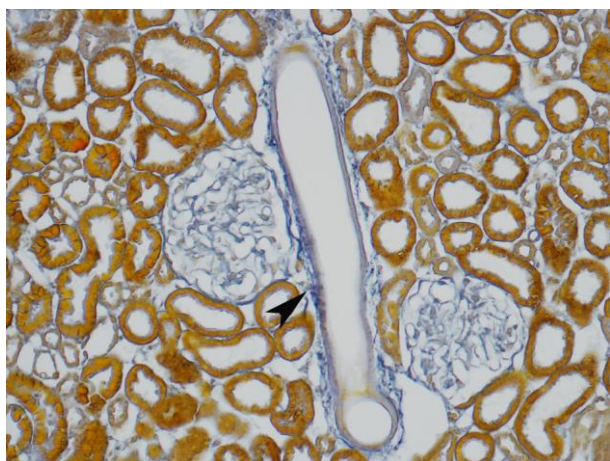
Фиг. 21. Препарат от бъбрек, SHR, възраст – 4 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.



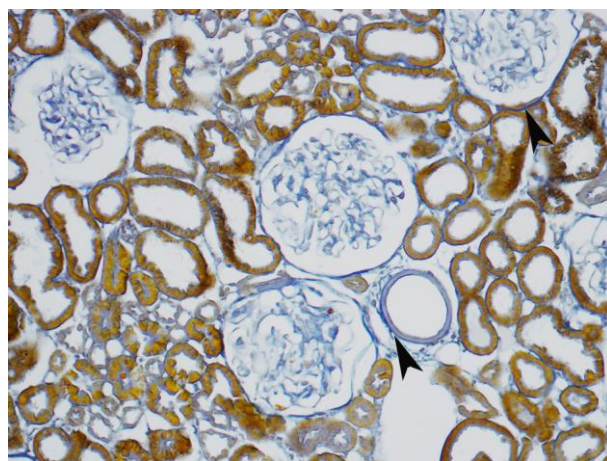
Фиг. 22. Контакт между париетален и висцерален листове на Бауманова капсула (стрелка) и дилатирани тубулни сегменти (звезди), SHR, възраст 6 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.

При трихромното оцветяване по Малори при четиримесечните SHR се виждат фини колагенни влакна оцветени в интензивно син цвят около бъбречните телца, перигломеруларно като този процес е по-силно изразен при юкстамедуларните нефрони; концентрично подредени съединителнотъканни влакна около интратреналните кръвоносни съдове израз на развиваща се периваскуларна фиброза (фиг. 23).

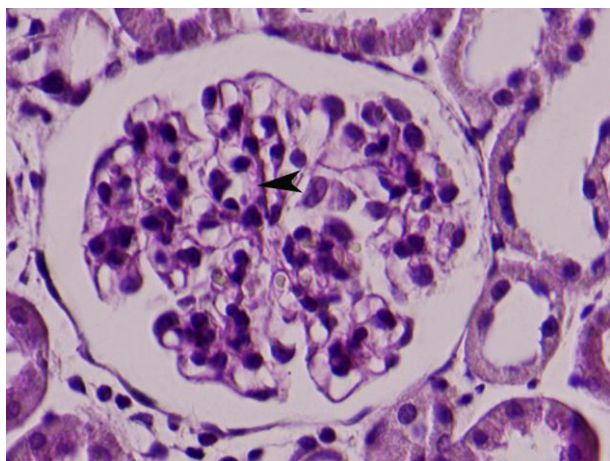
При шестмесечните SHR при трихромното оцветяване по Малори най-ясно се демонстрират оцветени в син цвят снопчета от колагенни влакна около бъбречните телца на юкстамедуларните и междинни нефрони. Отчетлива е и периваскуларната фиброза в по-големите по калибър кръвоносни съдове. Наблюдава се нарастваща експанзия на съединителнотъканни повлекла между тубулните сегменти (фиг. 24).



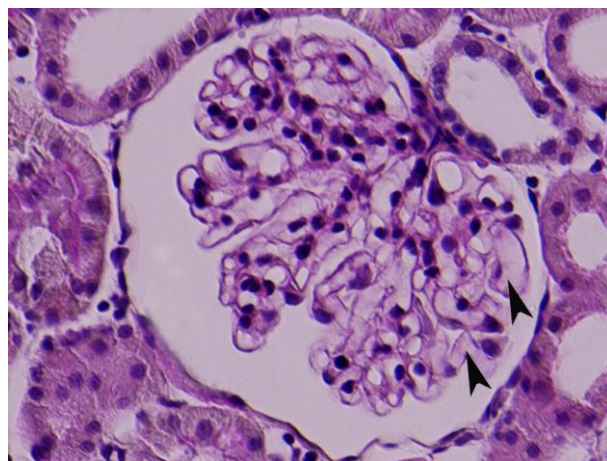
Фиг. 23. Периваскуларна фиброза (стрелка), SHR, възраст 4 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х200.



Фиг. 24. Интерстициална фиброза (стрелки), SHR, възраст 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х200.



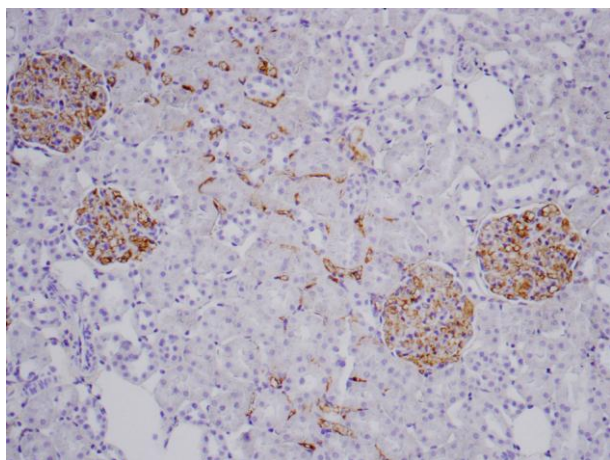
Фиг. 25. PAS - позитивен материал интра-гломеруларно (стрелка), SHR, възраст – 4 месеца, PAS-реакция. Увеличение – x1000.



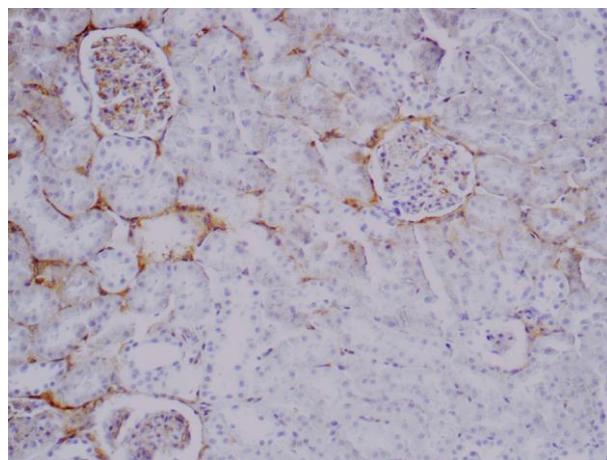
Фиг. 26. PAS - позитивен материал интра-гломеруларно (стрелка), SHR, възраст – 6 месеца, PAS-реакция. Увеличение – x1000.

Използването на PAS-реакция при младите и зрели SHR позволява да се наблюдава по-детайлно светлинномикроскопската характеристика на базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули. Гломерулната хиалиноза е демонстрирана в пурпурновиолетов цвят чрез използвания хистохимичен метод, като този процес е по-изразен при възрастната група животни (фиг. 25; 26).

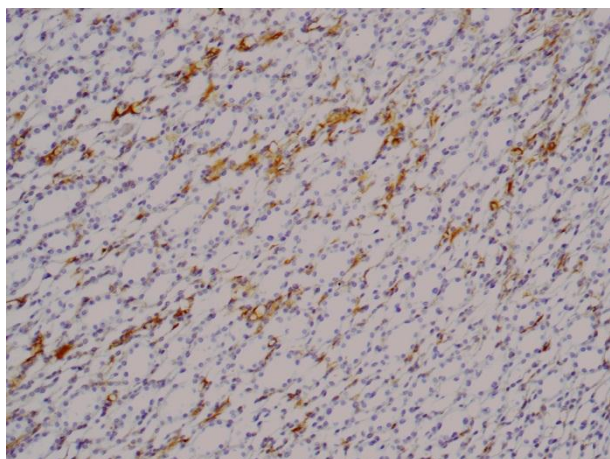
Имунохистохимичното оцветяване за pNOS при четири- и шестмесечни SHR показва хетерогенно разпределение на ензима в бъбречната структура. И в двете възрастови групи се установява силно положителна активност на pNOS интрагломеруларно (фиг. 27; 28). Умерено положителна е реакцията при междинните и кортикални нефрони. При шестмесечните плъхове се установява по-силна експресия на ензима в парияталния лист на Баумановата капсула, както и по хода на проксималните тубулни сегменти. По отношение на дисталните тубули и в двете възрастови групи се наблюдава хетерогенно разпределение на ензима от липсващо до едва доловимо оцветяване. Медуларни събирателни каналчета показват умерена до силна имунореактивност (фиг. 29; 30).



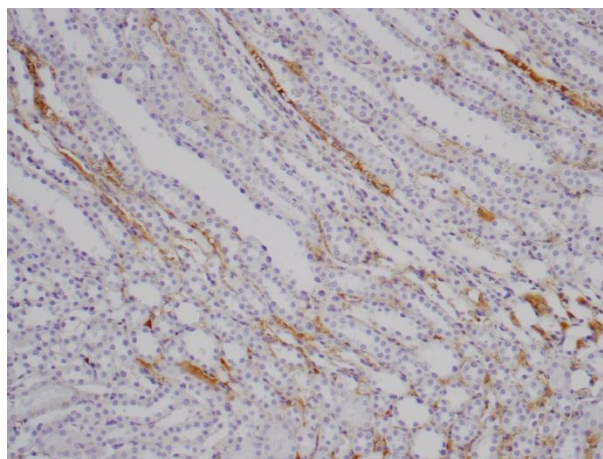
Фиг. 27. Имунохистохимично изследване за pNOS, SHR, възраст 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.



Фиг. 28. Имунохистохимично изследване за pNOS, SHR, възраст 6 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

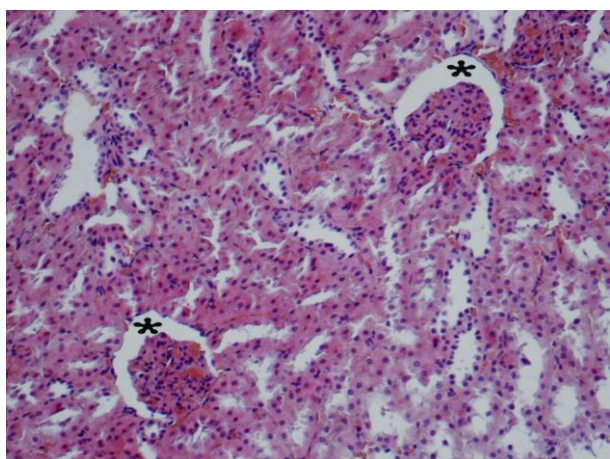


Фиг. 29. Имунохистохимично изследване за pNOS, SHR, възраст 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

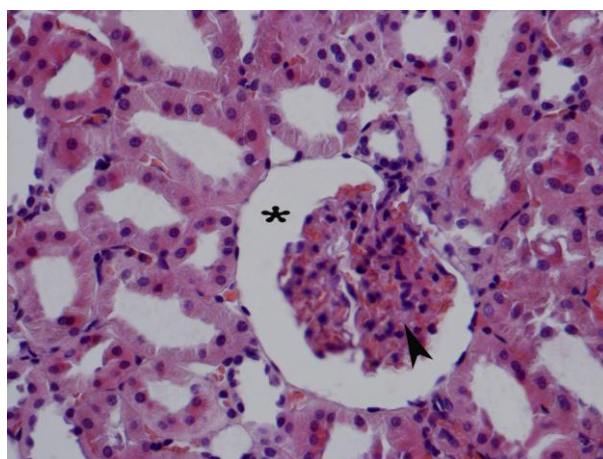


Фиг. 30. Имунохистохимично изследване за pNOS, SHR, възраст 6 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

При дванадесетмесечните SHR използването на оцветяването с ХЕ разкрива в най-голяма степен обусловените от артериалната хипертония промени в бъбречната структура. По протежение на кортекса се установява нарастващ брой на склерозирали гломерули – сбръчкване и заличена морфология на гломерулните клъбца, които морфологично добиват вид на плътни еозинофилни структури. Наблюдава се увеличение на Баумановото пространство като при част от нефрони се установяват патологични контакти между париеталния и висцералния лист на Баумановите капсули. Описаните промени са най-ясно изразени по хода на бъбречните телца на юкстамедуларните и междинни нефрони, т.е. в по-голяма степен са засегнати вътрешните две трети от кортекса. По протежение на проксималните и дистални тубули се наблюдава атрофия, която се изразява с дилатация на лумените им, тапициращият епител е представен от нискокубични клетки като част от тях са с заличени до липсващи ядра (фиг. 31; 32).



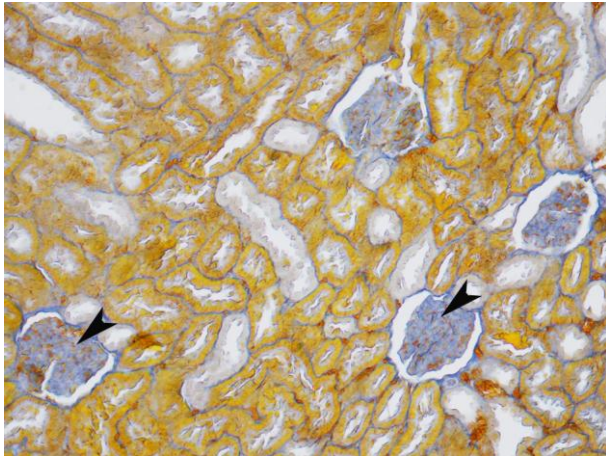
Фиг. 31. Гломерулосклероза. Увеличено пространство на Баумановата капсула (звезди), SHR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – x200.



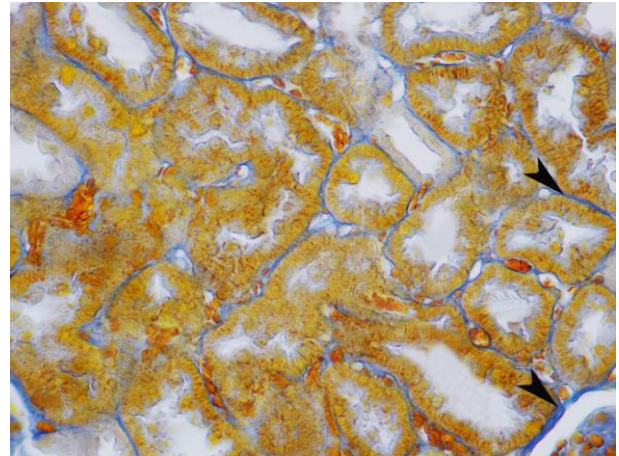
Фиг. 32. Увеличено пространство на Баумановата капсула (звезда) и заличена морфология на капилярните лумени (стрелка), SHR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – x400.

При трихромното оцветяване по Малори при дванадесетмесечните SHR ясно се наблюдава дифузно развита интерстициална фиброза. В

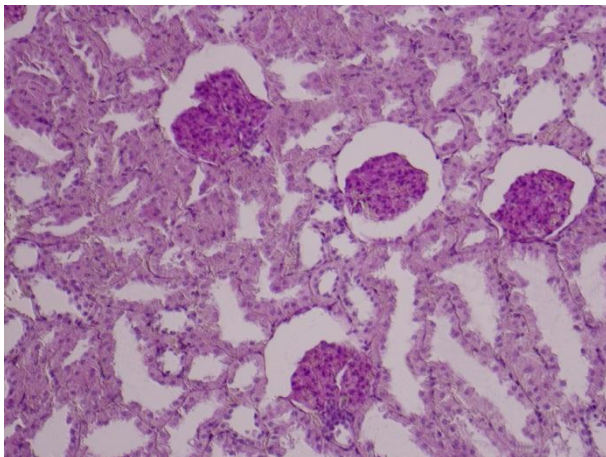
бъбречните телца на трите основни вида нефрони се откриват интензивно оцветени в син цвят снопове от колагенни влакна, разположени перигломеруларно и в съседство с париеталния лист на Баумановата капсула. Отчетливо се вижда изразена периваскуларна фиброза на артериолите на съдовия полюс на бъбречните телца, особено при юкстамедуларните и междинни нефрони, добре изразени концентрично подредени снопове колагенни влакна около по-големите по калибър интраваскуларни кръвоносни съдове. Увеличение на интерстициалната съединителна тъкан се установява по протежение на проксималните и дистални тубулни сегменти (фиг. 33; 34).



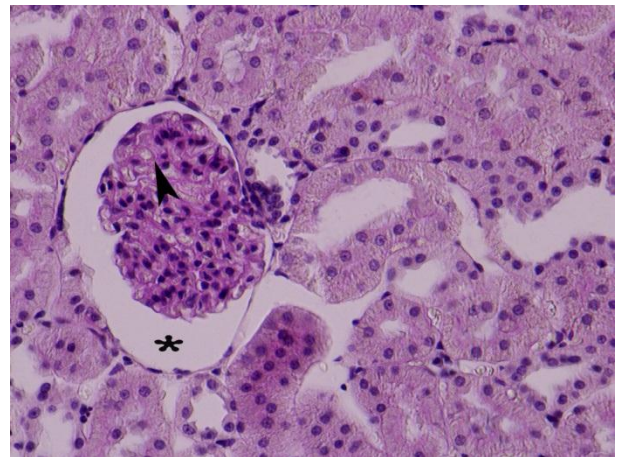
Фиг. 33. Гломерулосклероза (стрелки), SHR, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х200.



Фиг. 34. Тубулоинтерстициална фиброза (стрелки), SHR, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х400.



Фиг. 35. Гломерулна хиалиноза, SHR, възраст – 12 месеца, PAS-реакция. Увеличение – х200.

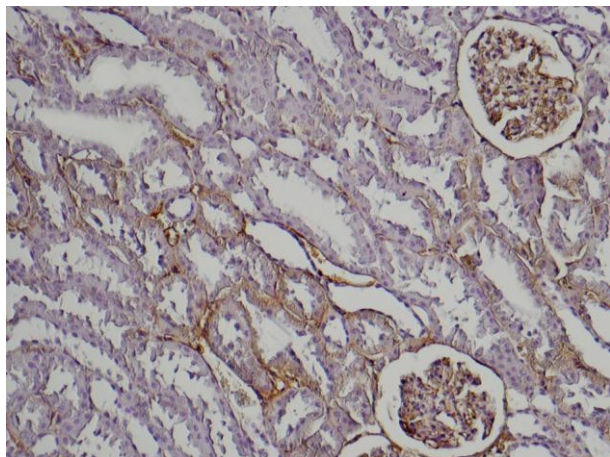


Фиг. 36. Гломерулна хиалиноза (стрелка) и увеличено пространство на Баумановата капсула (звезда), SHR, възраст – 12 месеца, PAS-реакция. Увеличение – х400.

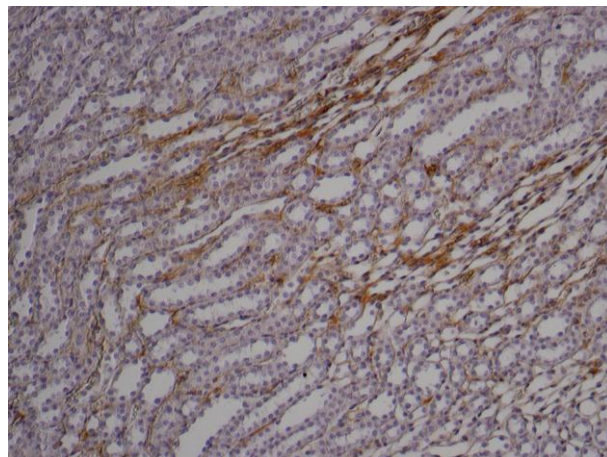
Използването на PAS-реакция при възрастните SHR отразява още по-отчетливо базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули на светлинномикроскопско ниво в сравнение с по-младите възрастови групи SHR. Съдовите изменения са представени от удвояване на вътрешната еластична мембрана на аркуатните и интерлобуларни артерии, както и пролиферация на гладкомускулни клетки проникващи в tunica intima. Налице е хиалинна артериосклероза на аркуатните артерии

и гломерулните капиляри, като капилярните лумени са със заличена морфология (фиг. 35; 36).

Имунохистохимичното оцветяване за pNOS при възрастните SHR показва хетерогенно разпределение на ензима в бъбрека. Силно положителна експресия се установява в клетките на macula densa, париеталния лист на Баумановата капсула. Положителна реакция се отчита по хода на проксималните и събирателни тубулни сегменти.



Фиг. 37. Имунохистохимично изследване за pNOS, SHR, възраст 12 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.



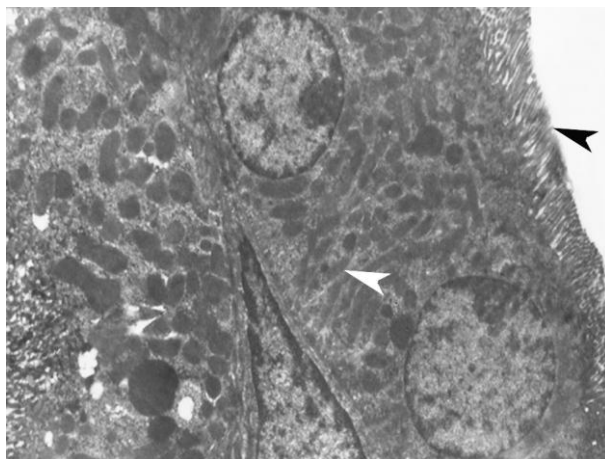
Фиг. 38. Имунохистохимично изследване за pNOS, SHR, възраст 12 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

2. Морфологични промени в нефроните от проведеното електронномикроскопско изследване

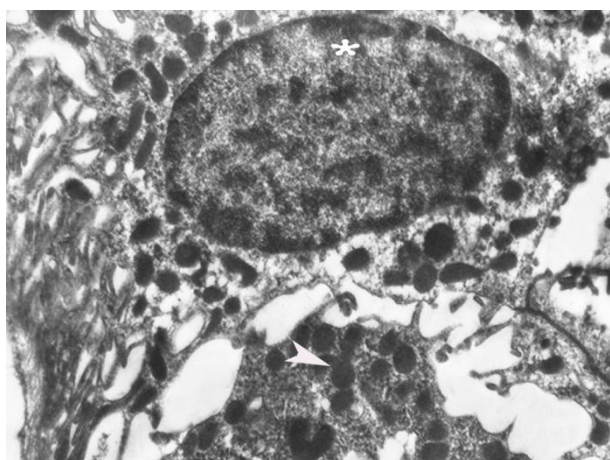
При четиримесечните Wistar плъхове и SHR не се наблюдават отчетливи дегенеративни промени в ултраструктурата на трите основни вида нефрони. Ясно се демонстрира морфологичния субстрат на гломерулната филтрационна бариера (фиг. 39). По хода на проксималните тубулни сегменти високия кубичен епител се характеризира с добре изразена микровилозност, а при по-големите увеличения се демонстрират междуклетъчните контакти представени от интердигитации. В апикалния клетъчен компартмент се наблюдават множество лизозоми, пероксизоми и ендоцитозни везикули, както и голям брой митохондрии разположени перинуклеарно в базалните нагъвания на плазмалемата (фиг. 40; 41; 42). Кубичните клетки на дисталните тубули се представят със слабо изразена микровилозност и базални нагъвания съдържащи митохондрии. Освен това, в цитоплазмата им се наблюдават различни по размер везикули, а междуклетъчните контакти са представени от интердигитации. В някои дистални тубулни сегменти се разграничават т.нар. гладки клетки, които не притежават стрирана повърхност и са видово специфични у плъх. Главните и интеркалатни клетки тапициращи събирателните тубули се характеризират с множество базални нагъвания на плазмалемата, но сравнителната оценка между двата клетъчни типа показва, че главните клетки имат по-оскъдно количество клетъчни органели.



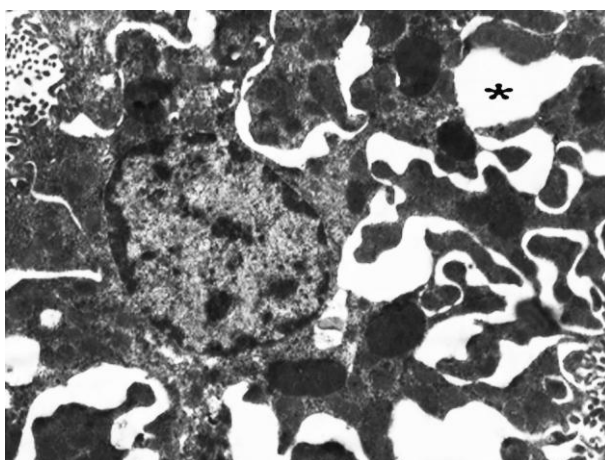
Фиг. 39. Гломерулна филтрационна бариера – ясно личи морфологията на подоцитите и цитоплазмените им израстъци, SHR, възраст – 4 месеца. Увеличение – $\times 11700$.



Фиг. 40. Тубулни епителни клетки с ясно изразена микровилозност и голямо количество митохондрии (стрелки), SHR, възраст – 4 месеца. Увеличение – $\times 7400$.

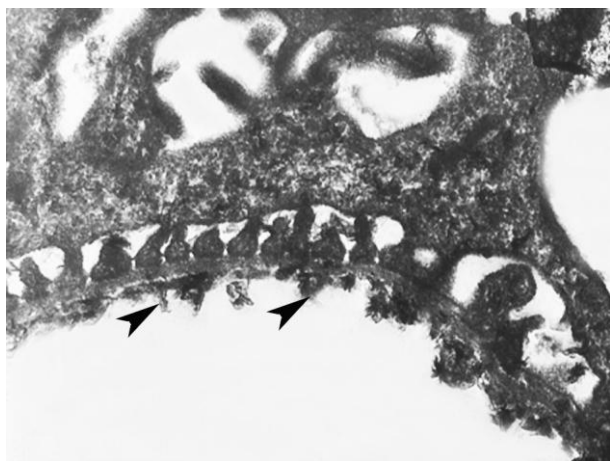


Фиг. 41. Базален компармент на тубулна епителна клетка – клетъчно ядро (звезда) и базални нагъвания с митохондрии (стрелка), WR, възраст – 4 месеца. Увеличение – $\times 13800$.

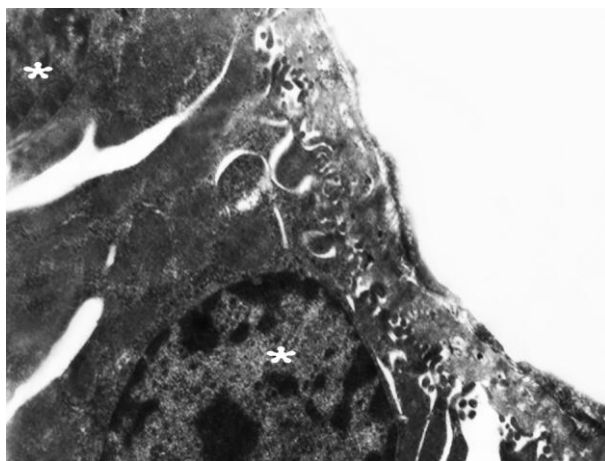


Фиг. 42. Базални нагъвания на тубулна епителна клетка (звезда), WR, възраст – 4 месеца. Увеличение – $\times 8800$.

При зрелите шестмесечни Wistar плъхове се наблюдават процеси на уплътнение и задебеление на гломерулните базални мембрани. Сходни промени се описват и по хода на базалните мембрани на проксималните и дистални тубулни сегменти. Част от подоцитите показват признаци на дегенерация, изразяваща се с вакуолизация на цитоплазмата и наличието на електроннопътни включения (фиг. 43). Изследването на проксималните и дистални тубулни сегменти показва съществени промени в междуклетъчните контакти на тапициращия ги епител, изразяващи се с появата на тесни цепковидни пространства между съседните клетки (фиг. 44). При някои от тях се установяват редуцира апикална микровилозност, намален брой митохондрии в базалните нагъвания и увеличено количество електроннопътни гранули.



Фиг. 43. Гломерулна филтрационна бариера, фенестриран ендотел (стрелки), WR, възраст – 6 месеца. Увеличение – $\times 32000$.

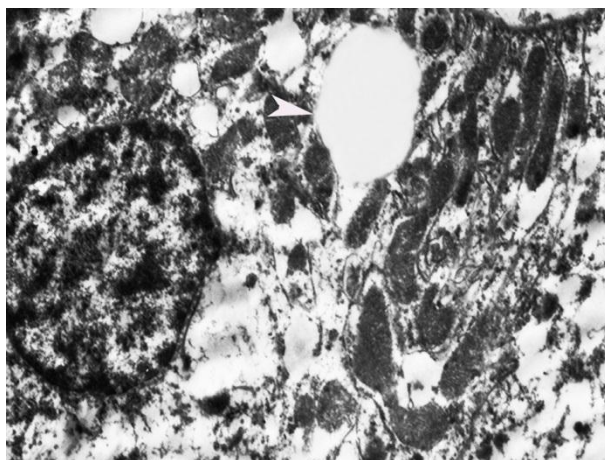


Фиг. 44. Ядра на съседни тубулни епителни клетки (звезди) и разширено междуклетъчно пространство, WR, възраст – 6 месеца. Увеличение – $\times 24000$.

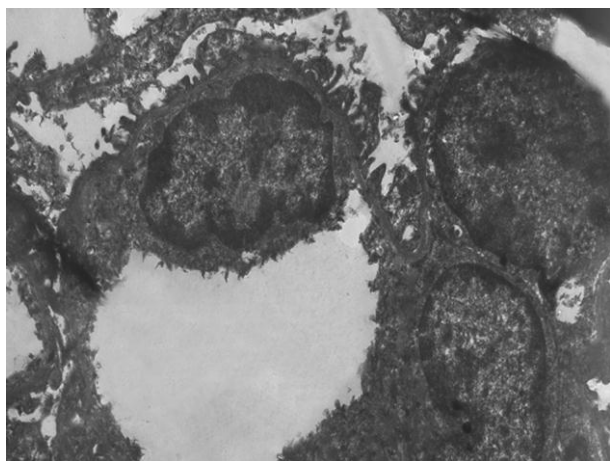
При възрастните дванадесетмесечни Wistar плъхове се демонстрира повсеместно уплътнение и задебеление на гломерулните базални мембрани. При голяма част от подоцитите се установява вакуолизация на цитоплазмата, кондензация на хроматина в клетъчните ядра, намален брой цитоплазмени израстъци, част от които губят връзката си с базалната мембрана. Това е причината в тези участъци да не личат ясно границите между филтрационните цепки (фиг. 45). При част от бъбречните телца се установяват патологични контакти между париеталния и висцерален листове на Баумановите капсула, както и подоцитопения при сравняване с находките получени от по-младите възрастови групи. Проксималните и дистални тубулни сегменти се характеризират със задебеление на базалните мембрани и появата на значителни пространства в областта на междуклетъчните контакти на тапициращия ги епител. В някои клетки се наблюдават увеличен брой електроннопътни гранули и вакуоли, редуциране гъстотата на базалните нагъвания и митохондрияте, както и загуба на контакт с подлежащата базалната мембрана (фиг. 46).



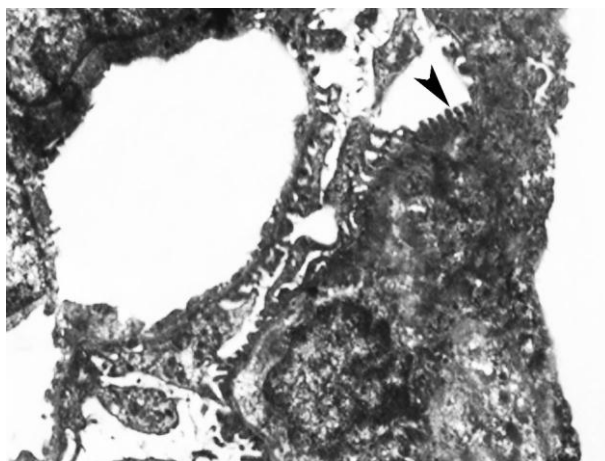
Фиг. 45. Гломерулна филтрационна бариера, WR, възраст – 12 месеца. Увеличение – $\times 10500$.



Фиг. 46. Вакуолизация на цитоплазмата на тубулна епителна клетка (стрелки), WR, възраст – 12 месеца. Увеличение – $\times 10900$.

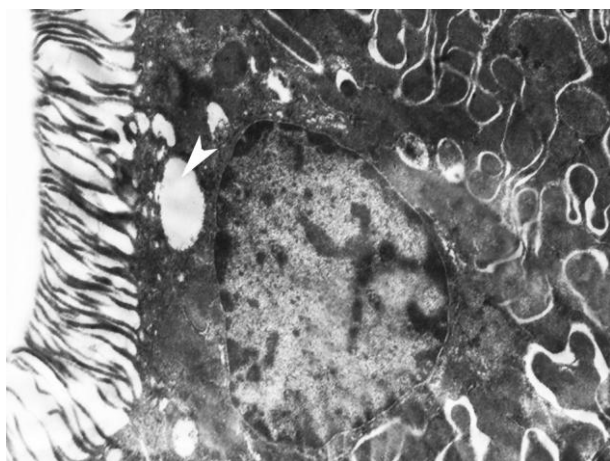


Фиг. 47. Гломерулна филтрационна бариера, SHR, възраст – 6 месеца. Увеличение – $\times 11500$.



Фиг. 48. Гломерулна филтрационна бариера, подоцитна увреда (стрелка), SHR, възраст – 12 месеца. Увеличение – $\times 11900$.

При шестмесечните и дванадесетмесечни SHR най-съществени структурни изменения се установяват при юкстамедуларните и междинни нефрони. При тях се наблюдава значително задебеление на гломерулните базални мембрани, в сравнение с контролните групи плъхове. Представят се нарастващ брой подоцити, чиито крачета загубват връзката си с базалната мембрана като в тези участъци трудно могат да бъдат определени границите на загражданите от тях филтрационни цепки. В някои подоцити се установяват признаци на развиващ се процес на апоптоза, което морфологично се представя с кондензация на хроматина в клетъчните им ядра (фиг. 47; 48).



Фиг. 49. Вакуолизация на цитоплазмата на тубулна епителна клетка (стрелка), SHR, възраст – 6 месеца. Увеличение – $\times 21000$.



Фиг. 50. Цепковидни пространства между тубулни епителни клетки и кондензация на клетъчните ядра, SHR, възраст – 12 месеца. Увеличение – $\times 5600$.

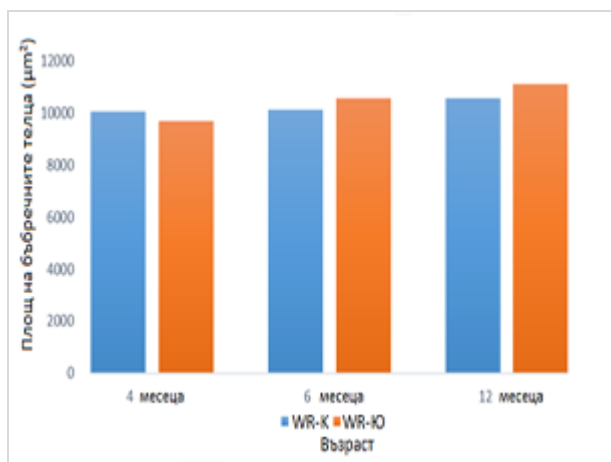
По хода на проксималните и дистални тубулни сегменти ясно се вижда задебеляването на базалните им мембрани, както и обособяването на пространства в областта на междуклетъчните контакти на тапициращия ги епител (фиг. 49; 50).

3. Количествени характеристики на бъбречните телца и гломерулите на кортикални и юкстамедуларни нефрони през различни етапи от постнаталното развитие на нормотензивни Wistar плъхове и SHR

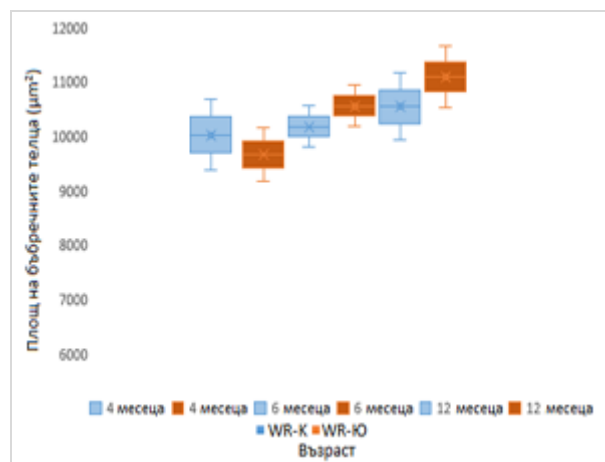
3.1. Сравнителен количествен анализ между кортикални и юкстамедуларни нефрони през различни възрастови периоди от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове

Сравнителният анализ при четиримесечните Wistar плъхове показва незначително по-голяма площ на бъбречните телца на кортикалните в сравнение с юкстамедуларните нефрони. С напредване на възрастта при шестмесечните плъхове се наблюдава плавно увеличение на изследвания морфометричен показател с известен превес при юкстамедуларните нефрони. При дванадесетмесечните Wistar плъхове се описва нарастване на площта на бъбречните телца на кортикалните нефрони, която е съпоставима по стойност с тази при юкстамедуларните нефрони на шестмесечните плъхове. Във възрастната група плъхове площта на бъбречните телца на юкстамедуларните нефрони достига най-висока стойност (таблица 1; фиг. 51).

Визуалният анализ на диаграмата Box Plot показва при сравнение на площта на бъбречните телца на кортикалните с тези на юкстамедуларни нефрони при отделните групи Wistar плъхове следните различия: при четиримесечните плъхове се наблюдават средни стойности на площта на бъбречните телца на кортикални нефрони по-големи от средните при юкстамедуларните нефрони. При шестмесечните и дванадесетмесечните плъхове площта на бъбречните телца на юкстамедуларните нефрони е забележимо по-висока от тази при кортикалните нефрони (фиг. 52).



Фиг. 51. Средни стойности на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове

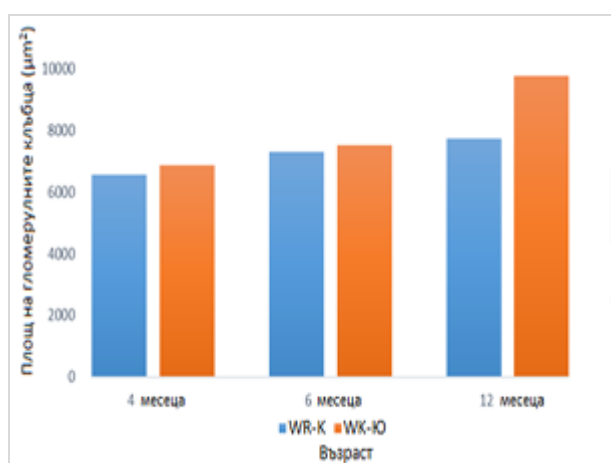


Фиг. 52. Сравнителен анализ на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.

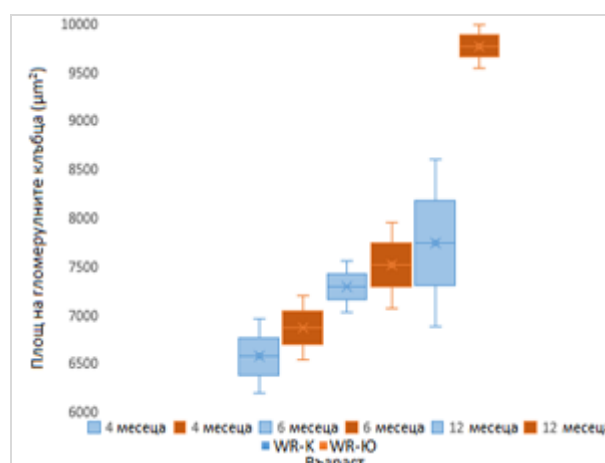
WR	Кортикални нефрони		Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на бъбречни телца (μm ²)		Площ на бъбречните телца (μm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	10035,7	660,5	9664,4	487,9	p< 0,0001
6 месеца	10120,3	375,3	10561,1	377,1	p< 0,000001
12 месеца	10560,8	617,4	11092,8	563,7	p< 0,000001

Таблица 1. Количествена характеристика на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.

При четиримесечните Wistar плъхове показва незначително по-голяма площ на гломерулните клъбца на юкстамедуларните в сравнение с тези на кортикалните нефрони. С напредването на възрастта при шестмесечните плъхове се наблюдава прогресиращо увеличение на изследвания морфометричен показател, като се запазва тенденцията за по-голяма площ на гломерулните клъбца на юкстамедуларните нефрони. При дванадесетмесечните животни още по-демонстративно се вижда нарастването на изследвания морфометричния показател при юкстамедуларните нефрони, където достига и най-висока стойност (фиг. 53; фиг. 54; таблица 2).



Фиг. 53. Средни стойности на площта на гломерулните клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.



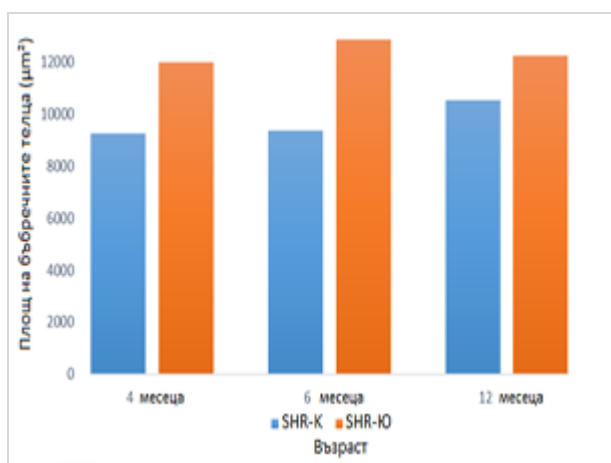
Фиг. 54. Сравнителен анализ на площта на гломерулните клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.

WR	Кортикални нефрони		Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на гломерулни клъбца (µm ²)		Площ на гломерулни клъбца (µm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	6572,4	386,7	6866,1	334,4	P<0,00001
6 месеца	7287,1	261,2	7510,8	445,8	P<0,0001
12 месеца	7738,1	864	9767,5	225,5	P<0,000001

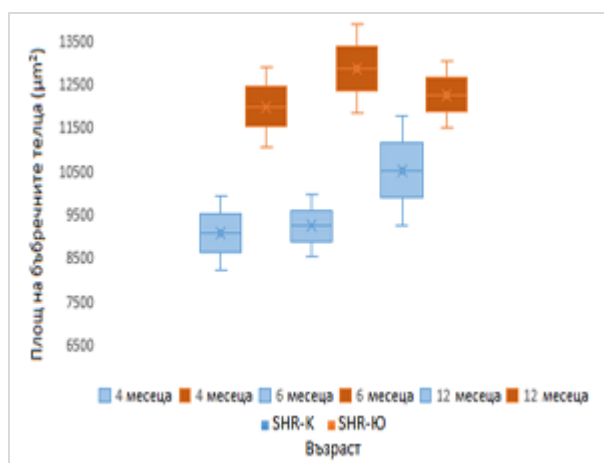
Таблица 2. Количествена характеристика на площта на гломерулните клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.

3.2. Сравнителен количествен анализ между кортикални и юкстамедуларни нефрони през различни възрастови периоди от постнаталното развитие при SHR

Сравнителният анализ при четиримесечните SHR показва значително по-голяма площ на бъбречните телца на юкстамедуларните в сравнение с кортикалните нефрони. При шестмесечните SHR тази разлика е още по-демонстративна, като изследвания морфометричен показател при юкстамедуларните нефрони достига най-висока стойност. В групата на дванадесетмесечните SHR се установява продължаващо нарастване на площта на бъбречните телца на кортикалните нефрони, докато при юкстамедуларните нефрони се наблюдава понижение на изследвания показател, който става приблизително сравним с резултатите получени за юкстамедуларните нефрони при четиримесечната група плъхове (таблица 3; фиг.55; фиг. 56).



Фиг. 55. Средни стойности на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.



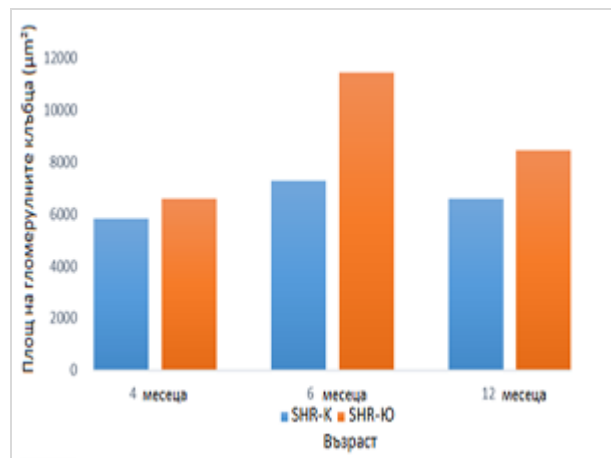
Фиг. 56. Сравнителен анализ на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.

SHR	Кортикални нефрони		Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на бъбречни телца (µm ²)		Площ на бъбречните телца (µm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	9238,8	861,2	11975,1	921,9	P<0,00001
6 месеца	9359	713,2	12834,3	1020	P<0,000001
12 месеца	10504,2	1265,8	12245,6	762,4	P<0,000001

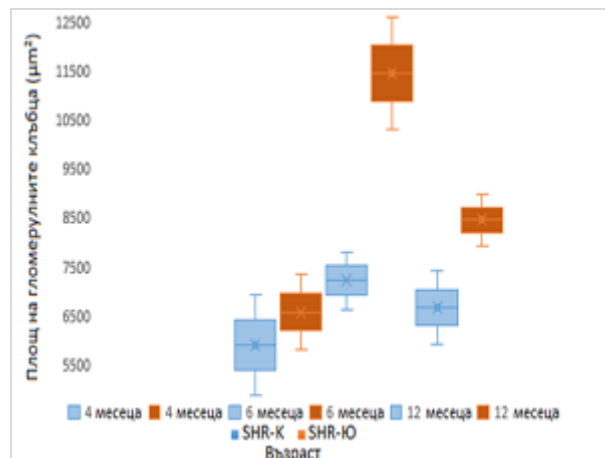
Таблица 3. Количествена характеристика на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.

Сравнителният анализ при четиримесечните SHR показва по-голяма площ на гломерулните клъбца на юкстамедуларните в сравнение с кортикалните нефрони. С напредване на възрастта при шестмесечните SHR се наблюдава значително увеличение на изследвания морфометричен показател и при двата вида нефрони,

като най-демонстративна е тази промяна при юкстамедуларните нефрони, където площта на гломерулните клъбца достига най-висока стойност. При дванадесетмесечните SHR се установява намаляване на площта на гломерулните клъбца на сравняваните нефрони, като промяната засяга значително в по-голяма степен юкстамедуларните нефрони (фиг. 57; фиг. 58; таблица 4).



Фиг. 57. Средни стойности на площта на гломерулните клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.



Фиг. 58. Сравнителен анализ на площта на гломерулните клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.

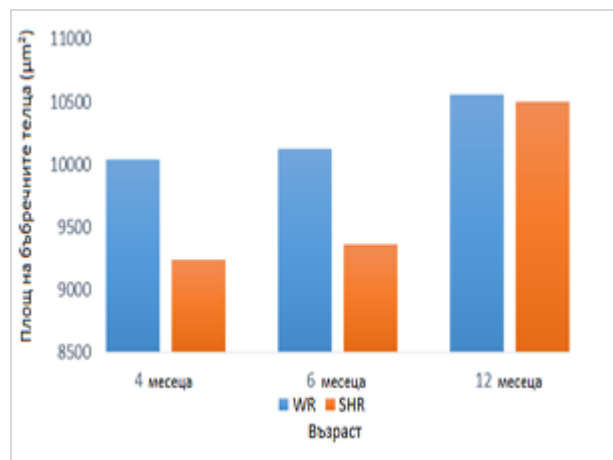
SHR	Кортикални нефрони		Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на гломерулни клъбца (µm ²)		Площ на гломерулни клъбца (µm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	5822,6	1013,9	6579,4	759,8	P<0,00001
6 месеца	7278,5	588	11446,4	1152,9	P<0,0000001
12 месеца	6595,8	742,5	8453,6	517,3	P<0,000001

Таблица 4. Количествена характеристика на площта на гломерулните клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.

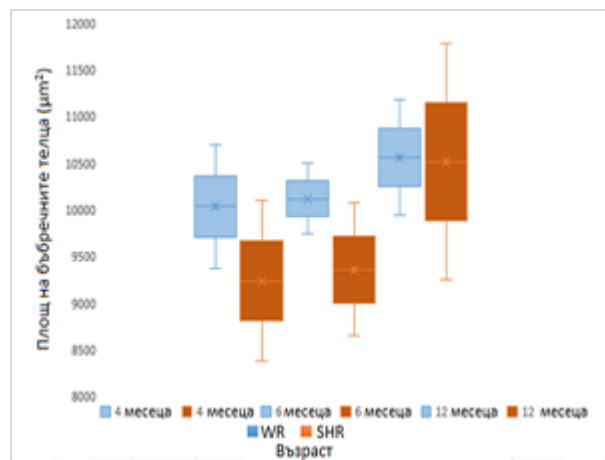
3.3. Сравнителна количествена характеристика на площта на бъбречните телца и гломерулите на кортикални нефрони през различни етапи от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar и SHR

Сравнителният анализ при четиримесечните Wistar плъхове и SHR показва, че площта на бъбречните телца на кортикалните нефрони е по-голяма при нормотензивната група. Подобни резултати се наблюдават и при шестмесечните Wistar плъхове и SHR като не се установяват съществени различия на изследвания морфометричен показател с групите на четиримесечните животни. Значително увеличение на площта на бъбречните телца се наблюдава при дванадесетмесечните SHR, което е съпоставимо с това на съответстващата им по възраст нормотензивна група (фиг. 59; таблица 5). Визуалният анализ на диаграмата Box plot показва, че при шестмесечните плъхове има явно изразени различия. При

групите на четиримесечните Wistar плъхове и SHR, средните показатели и съответните доверителни интервали в контролната група са леко занижени. При дванадесетмесечните плъхове няма значими различия между средните, но има при доверителния интервал за средното (фиг. 60).



Фиг. 59. Средни стойности на площта на бъбречните телца на кортикални нефрони при Wistar плъхове и SHR.



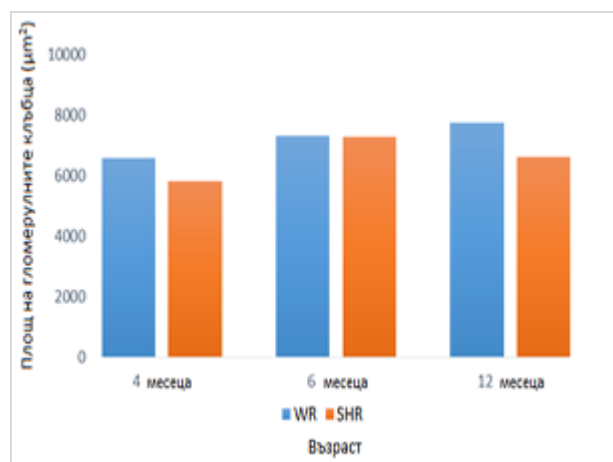
Фиг.60. Сравнителен анализ на площта на бъбречните телца на кортикални нефрони при Wistar плъхове и SHR.

WR	Кортикални нефрони		SHR	Кортикални нефрони		TTEST
	Площ на бъбречни телца (µm ²)			Площ на бъбречни телца (µm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	10035,7	660,5	4 месеца	9238,8	861,2	
6 месеца	10120,3	375,3	6 месеца	9359	713,2	
12 месеца	10560,8	617,4	12 месеца	10504,2	1265,8	
						P<0,00001
						P<0,00001
						P>0,05

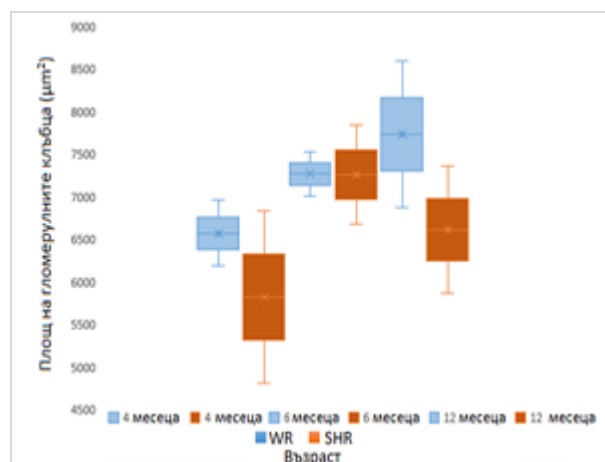
Таблица 5. Количествена характеристика на площта на бъбречните телца на кортикални нефрони при Wistar плъхове и SHR.

При четиримесечните Wistar плъхове и SHR площта на гломерулните клъбца е по-голяма при нормотензивната група. С напредване на възрастта при шестмесечните плъхове се наблюдава увеличение на площта като се установява сходство в стойностите на изследвания морфометричен показател при двете групи. При дванадесетмесечните Wistar плъхове се описва продължаващо нарастване на площта на гломерулните клъбца, докато при SHR се регистрира намаление, като площта става съпоставима с тази на четиримесечните нормотензивни плъхове. Тези резултати потвърждават възприетото схващане за по-ранно развиващ се процес на гломерулосклероза в условия на артериална хипертония. При нормотензивните групи плъхове се наблюдава плавно нарастване на изследвания морфометричен показател, с най-висока стойност в групата на дванадесетмесечните животни, докато при SHR най-голяма площ на гломерулните клъбца се установява при шестмесечните плъхове (таблица 6; фиг. 61). При възрастните Wistar плъхове и SHR има явно изразени различия – контролната група е със средно доста по-малко от

експерименталната. При четиримесечните плъхове средните показатели и съответните довеерителни интервали в контролната група са леко занижени. При шестмесечните плъхове няма значими различия между средните, но има при доверителния интервал за средното (фиг. 62).



Фиг. 61. Средни стойности на площта на гломерулните клъбца на кортикални нефрони при Wistar плъхове и SHR.



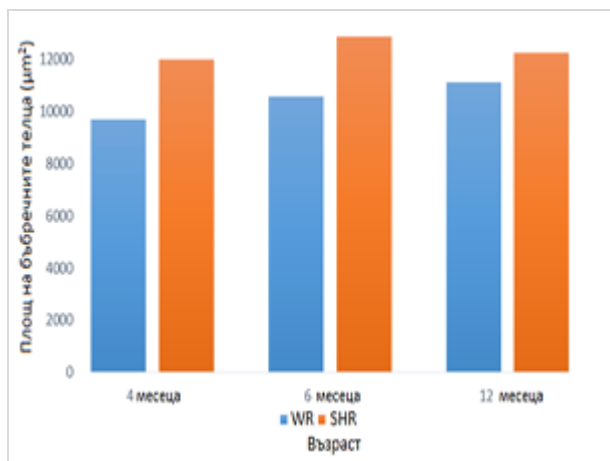
Фиг. 62. Сравнителен анализ на площта на гломерулните клъбца на кортикални нефрони при Wistar плъхове и SHR.

WR	Кортикални нефрони		SHR	Кортикални нефрони		TTEST
	Площ на гломерулни кълбца (μm ²)			Площ на гломерулни кълбца (μm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	6572,4	386,7	4 месеца	5822,6	1013,9	P<0,00001
6 месеца	7287,1	261,2	6 месеца	7278,5	588	P>0,05
12 месеца	7738,1	864	12 месеца	6595,8	742,5	P<0,00001

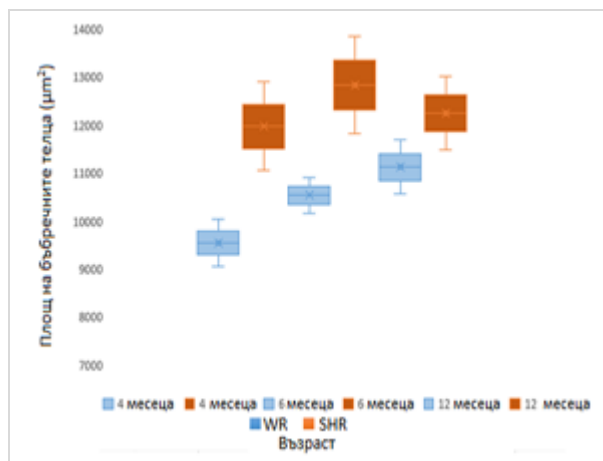
Таблица 6. Количествена характеристика на площта на гломерулните клъбца на кортикални нефрони при Wistar плъхове и SHR.

3.4. Сравнителна количествена характеристика на площта на бъбречните телца и гломерулите на юкстамедуларни нефрони през различни етапи от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR

Сравнителният анализ при четиримесечните групи плъхове показва, че площта на бъбречните телца е по-голяма при групата на SHR. Нарастване на стойността на изследвания морфометричния показател се регистрира при групите на шестмесечните плъхове, което е по-добре изразено при хипертензивните животни. С напредването на възрастта се установява нарастване на площта на бъбречните телца при дванадесетмесечните нормотензивни Wistar плъхове, докато при SHR групата се наблюдава намаление, което е приблизително съпоставимо с площта на бъбречните телца при четиримесечните SHR (фиг. 63; таблица 7). Диаграмата Box Plot показва изразени различия по отношение на изследвания морфометричен показател – контролната група е със средно и доверителен интервал значително над съответните стойности в експерименталната група (фиг. 64).



Фиг. 63. Средни стойности на площта на бъбречните телца на юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове и SHR.



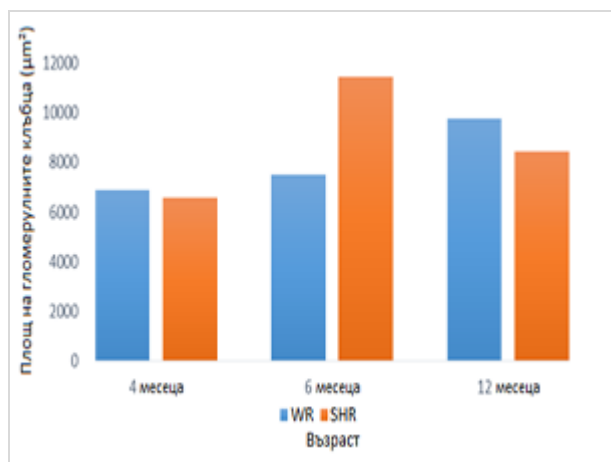
Фиг. 64. Сравнителен анализ на площта на бъбречните телца на юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове и SHR.

WR	Юкстамедуларни нефрони		SHR	Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на бъбречни телца (μm ²)			Площ на бъбречни телца (μm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	9664,4	487,9	4 месеца	11975,1	921,9	P<0,00001
6 месеца	10561,1	377,1	6 месеца	12834,3	1020	P<0,00001
12 месеца	11092,8	563,7	12 месеца	12245,6	762,4	P<0,00001

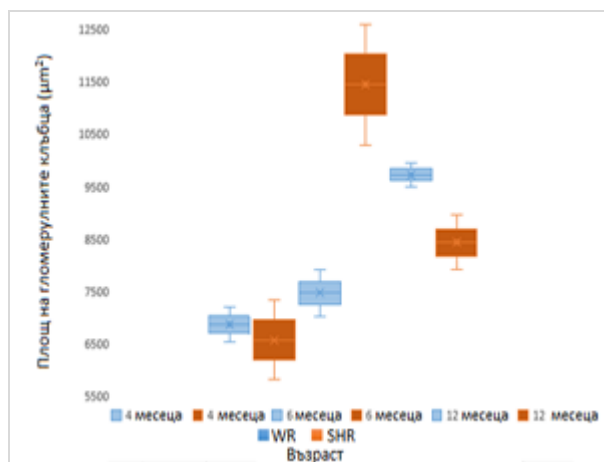
Таблица 7. Количествена характеристика на площта на бъбречните телца на юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове и SHR.

Сравнителният анализ при четиримесечните групи плъхове не показва съществени различия на площта на гломерулните клъбца на юкстамедуларните нефрони, като нормотензивната група се характеризира с незначително по-голяма стойност на изследвания морфометричен показател. При шестмесечните групи се наблюдава плавно нарастване на площта на гломерулните клъбца при Wistar плъховете, докато при SHR увеличението е значително, където площта достига най-висока стойност. Получените резултати свидетелстват, че наблюдаваното скокообразно нарастване на изследвания показател при SHR е обусловено от действието на подлежащата артериална хипертония, а не възрастово обусловено изменение, тъй като промените в площта на гломерулните клъбца при нормотензивните плъхове се развиват с по-бавни темпове. При дванадесетмесечните групи се установява продължаващо нарастване на площта при нормотензивните плъхове, докато при SHR се наблюдава съществено намаляване на показателя, което е сигурен белег за развит процес на гломерулосклероза (фиг. 65; таблица 8). При четиримесечните групи има значими различия – нормотензивната група е със средно доста по-малко от SHR. При шестмесечните плъхове средните показатели и съответните доверителни интервали при Wistar плъховете са много над SHR. При дванадесетмесечните плъхове отново се наблюдават различия, но

параметрите на нормотензивната група са по-ниски от тези при SHR (фиг. 66).



Фиг. 65. Средни стойности на площта на гломерулните клъбца на юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове и SHR.



Фиг. 66. Сравнителен анализ на площта на гломерулните клъбца на юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове и SHR.

WR	Юкстамедуларни нефрони		SHR	Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на гломерулни клъбца (μm ²)			Площ на гломерулни клъбца (μm ²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	6866,1	334,4	4 месеца	6579,4	759,8	P<0,001
6 месеца	7510,8	445,8	6 месеца	11446,4	1152,9	P<0,00001
12 месеца	9767,5	225,5	12 месеца	8453,6	517,3	P<0,00001

Таблица 8. Количествена характеристика на площта на гломерулните клъбца на юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове и SHR.

V. Обсъждане

1. Постнатални промени по хода на нефроните и интерстциума на бъбрек.

Както според налични данни (Zhou и съавт. 2008; Martin и Sheaff 2007), така и нашите резултати потвърждават, че с напредването на възрастта настъпват ясно изразени морфологични промени по хода на структурните елементи на нефроните и бъбречния интерстициум, които се асоциират с прогресивно намаляване на бъбречната функция. Поради тази причина е важно да се направи ясно разграничение между възрастово обусловените и придобитите вследствие на подлежащ патологичен процес изменения в структурата на бъбрека. Артериалната хипертония като социално значимо заболяване (Lawes и съавт. 2008) причинява значителни органични поражения, включително повишена честота на мозъчно съдови инциденти, миокардна хипертрофия и хронична бъбречна увреда (Schmieder 2010). Използваните в настоящия труд SHR като класически модел на есенциална хипертония у човек показват значително по-ранни и по-тежки морфологични изменения в бъбречната структура в сравнение с нормотензивните им контроли. Демонстрираните от нас възрастово обусловена гломерулосклероза и тубулоинтерстициална фиброза при различни възрастови групи Wistar плъхове и SHR се потвърждава от изследванията на Ofstad и Iversen (2005).

В сравнително изследване между прехипертензивни SHR и Wistar плъхове се наблюдават различия в пролиферативните и биосинтетични процеси в бъбречната структура на двете породи животни. SHR се характеризира с по-слаба експресия на фибронектин по хода на гломерулите (Lopes de Faria и съавт. 1997), който има съществено значение в процеса на ангиогенезата (George и съавт. 1993). Ако този дефицит е налице по време на пренаталното развитие, това може да доведе до нарушение в гломерулогенезата и впоследствие гломерулите да бъдат по-уязвими към увреда. Разрастването на екстрацелуларния гломеруларен матрикс и развиващата се хипоцелуларност в гломерулните капилярни клъбца са типични морфологични находки в процеса на гломерулосклерозата. Установено е, че редица растежни фактори като трансформиращия фактор β участват в развиващата се съединителнотъканна пролиферация (Sugiyama и съавт. 1996). Счита се, че комплексни механизми са свързани с развитието на възрастово обусловената гломерулна увреда. Като важни рискови фактори се отбелязват повишеното интрагломеруларно налягане, гломерулната хипертрофия, мъжкия пол (Baylis и Corman 1998). Значение се отдава и

на ниското тегло при раждането, което се асоциира с повишен риск от развитие на артериална хипертония в по-късна възраст (Curhan и съавт. 1996). Според Mackenzie и съавтори (1996) обяснението за това се крие в генетично обусловеното или придобито намаляване в броя на нефроните, като това тяхно предположение се потвърждава от факта, че бъбреците на SHR се характеризират с 10% до 25% по-малко нефрони в сравнение с нормотензивните им контроли (Merlet-Bénichou и съавт. 1994). В допълнение превалиращата активност на симпатиковия дял на вегетативната нервна система и ренин-ангиотензиновата система се считат като водещи патогенетични фактори, поддържащи трайно повишени стойности на кръвното налягане, както и за развитието на сърдечносъдови и бъбречни увреждания при хора и експериментални животни (Zhou и съавт. 2003; Gonzalez и съавт. 2002; Navar 2004).

Според Feld и съавтори (1977) не се установяват морфологични различия в структурата на бъбрек при SHR и Wistar плъхове до 30 седмица от постнаталното развитие. Наши данни показват, че дори в младите възрастови групи се наблюдават качествени промени, като при SHR се наблюдава развитието на перигломеруларна фиброза, която е по-изразена във вътрешния кортекс, включително разрастване на съединителнотъканни елементи по хода на тубулоинтерстициума. Най-демонстративни са резултатите от трихромното оцветяване по Малори, при които ясно личат нежни синьо оцветени колагенни влакна около бъбречните телца и интерстициума. Това дава основание да се предположи, че в значително по-млада възраст настъпват морфологични различия между двете породи плъхове.

В литературата няма точно определение за перигломеруларна фиброза. Jenkins и съавтори (2011) отнасят перигломеруларната фиброза за гломерули, които са с отворени капилярни лумени, но базалната мембрана на Баумановата капсула се характеризира с ламеларен строеж и отлагане на концентрични слоеве колаген около или вътре в нея. В бъбречната патология увеличението на компонентите на базалната мембрана се означава като склероза, докато нарастването на интерстициалния колаген – фиброза. В случаите на перигломеруларна фиброза често пъти се наблюдават и двата процеса, като интерстициалния колаген може да прониква в базалната мембрана или да се разполага от външната или вътрешната ѝ страна. Този процес трябва да засяга поне 50% от обиколката на гломерула, включително и тубулния полюс на Баумановата капсула. Трябва да се отбележи и факта, че пълната дегенерация на единичен нефрон е свързана със загуба на $40 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ епителна тъкан в бъбречната структура у плъх, като този обем се заема от съединителнотъканни повлекла (Venkatachalam и съавт. 2010).

Към описаните морфологични промени по хода на бъбречните телца в условия на артериална хипертония се отнасят и увеличение на PAS-позитивен материал в областта на Баумановата капсула, увеличен процент на склерозирали гломерули, отлагането на хиалинен материал в гломерулните капилярни клъбца като тези находки са най-ясно изразени

по хода на юкстамедуларните нефрони (Feld и съавт. 1977), което се потвърждава от настоящото изследване при зрелите и възрастни SHR. В част от резултатите се наблюдава фокално позитивиране на PAS-позитивен материал в гломерулните капилярни клъбца, докато други гломерули са с изцяло заличена морфология. Тази тенденция за по-агресивен ход на структурните изменения по хода на вътрешния кортекс съответстват с резултатите от проведените ни морфометрични анализи. Редица изследвания обаче показват, че не винаги има строга зависимост между артериалната хипертония и развитието на гломерулосклерозата. Дори и при третирани от раждането с антихипертензивна терапия SHR се установява развитие на фокална сегментна гломерулосклероза (Feld и съавт. 1981; Smeda и съавт. 1988).

Според някои автори измененията в бъбречния интерстициален обем и развиващата се фиброза корелират по-добре с промените в бъбречната функция, отколкото оценяването на морфологията на гломерулите (Bohle и съавт. 1990; Екпоуан и съавт. 1990). Причината за това, е че не всички гломерулни клъбца, които са представени с ясно разграничими капилярни лумени са функционално годни.

В противовес на изложената по-горе информация, много автори считат, че не тубулоинтерстициалните промени, а оценяването на морфологията на гломерулите корелира по-добре с бъбречната функция. Установена е възможността за цялостно заличаване на гломерули и заместването им от съединителнотъканни елементи, както в експериментални модели животни, така и при човек (Kriz и Le Hir 2005; Kanvar 1984). Нови изследвания показват, че най-добра корелация с бъбречната функция има броя на функциониращите нефрони (Вајета и съавт. 1999).

Съществуващата хипотеза, че интерстициалната фиброза предизвиква структурни изменения по хода на нефроните се отрича от Kaissling и съавтори (2013). В своето изследване авторите демонстрират тубулни сегменти на интактни нефрони, които се характеризират с нормална морфология, въпреки че са заобиколени от съединителнотъканни повлекла или дегенерирани тубули. Част от резултатите ни потвърждават това становище, защото установяваме участъци на изразена интерстициална фиброза без съществено изменение в структурата на тубулните сегменти при SHR и нормотензивните Wistar плъхове. Въпреки това не е изключена възможността прогресиращата интерстициалната фиброза да предизвиква морфологични изменения в нефроните.

Налице са данни, че с напредването на възрастта се наблюдава повишено отлагане на хиалин и мезангиална пролиферация по хода на гломерулите, като този процес е по-добре изразен във външните зони на кората (Ноу и съавт. 2003; Mañalich и съавт. 2000). В настоящата работа отлагането на хиалин се демонстрира най-ясно с хистохимичната PAS-реакция като в част от препаратите се наблюдава обтурация на гломерулните капилярни примки при възрастните възрастови групи. Докато при нормотензивните Wistar плъхове не се установи определена

предилекция към определен вид нефрони, то при SHR тези промени преобладават по хода на вътрешните две трети на кората.

В литературата се обсъжда и теорията за оксидативния стрес като възможен патогенетичен механизъм за развитието на гломерулосклерозата. Повишена продукция на свободни радикали се описва в различни експериментални модели на есенциална хипертония, включително и при SHR. Въз основа на това Pletiskaitz и Gomes (2012) демонстрират гломерулна хипертрофия дори при двумесечни SHR в сравнение с нормотензивните им контроли. Тези резултати потвърждават нашето заключение, че морфологични изменения по хода бъбречните телца могат да бъдат наблюдавани в значително по-ранна възраст от възприеманата от много автори долна граница от 30 седмица на постнаталното развитие.

Израз на развиващата се нефроангиосклероза е и описваната от много автори миоинтимна хипертрофия на аркуатните и интерлобуларни артерии, удвояване на вътрешната еластична мембрана, атрофия по хода на tunica media, изразяваща се със заместване на гладкомускулни клетки от фиброзни пофлекла (Meyrier 1999) , което се потвърждава и от нашите резултати при по-възрастните групи плъхове. Според Feld и съавтори (1977) съдовите изменения в бъбречната структура при SHR са представени повсеместно на 50 седмична възраст, като находките включват разрушаване на вътрешната еластична мембрана, хиперплазия и хипертрофия на гладкомускулни клетки с пролиферация на tunica intima, както и отлагането на фибриноиден материал с облитерация на съдовия лумен. Освен това други източници описват хиалинни еозинофилни отлагания в гломерулите, които са с белези на сегментна склероза със задебелени капилярни стени като в някои случаи те са изцяло склерозирали (Meyrier 1999).

Известно е, че в норма в бъбречната структура преобладават предимно колагенови молекули тип 1 и 3. Бъбречната интерстициална фиброза е процес, който се характеризира с натрупването предимно на колагенни влакна в резултат на различни патологични процеси (Farris и Colvin 2012). Разположените в интерстициума фибробласти имат съществено значение за развитието на тези морфологични промени. При тези клетки не се установява експресия на специфични маркерни молекули, което прави тяхното изследване относително трудно (Boor и съавт. 2010). Въпреки това разграничаването на фибробластите от останалите интерстициални клетки се осъществява чрез наличието на F-актин в цитоскелета им, както и на добре изразения гранулиран ендоплазмен ретикулум (Kaissling и Le Hir 2008). Освен с повишена пролиферативна активност, тези клетки се характеризират и с фенотипни промени, които настъпват при взаимодействието им с увредените базални мембрани на тубулните сегменти (Lin и съавт. 2008), като се трансформират в т.нар. миофибробластоподобни клетки, експресиращи гладкомускулен α -актинин (Alpers и съавт. 1994). От друга страна според Kriz и съавтори (2011) миофибробластите, които произлизат от интерстициално разположените фибробласти, означавани още от някои

автори като периваскуларни фибробласти или перицити (Humphreys и съавт. 2010), имат водеща роля в ремоделирането на тубулоинтерстициума. В развитието на фиброзните изменения се обсъжда и значението на интерстициално разположените дендритни клетки. Изследванията показват, че при намалената им численост, тубулоинтерстициалните промени са по-слабо изразени (Neumann и съавт. 2009). Съществуват данни, че тубулните епителни клетки могат да претърпят т.нар. епително-мезенхимна трансформация, която допринася за развиващата се фиброза. Този процес се изразява със загуба на експресия на маркерни молекули на епителната тъкан като Е-кадхерин и придобиване на виментинова активност (Boor и съавт. 2010; Tang и съавт. 2011). Така трансформираните клетки се характеризират с повишена подвижност и способност да преминават през базалните мембрани в интерстициалното пространство. Налице са убедителни данни за миграционната способност на тубулните епителни клетки в интерстициума на миши бъбрек (Zeisberg и Neilson 2009). От направената литературна справка в човешката популация също се наблюдават фенотипни изменения при тези клетки, но липсват данни потвърждаващи миграционната им способност (Quaggin и съавт. 2011). Според други автори при патологични условия тубулните клетки могат да придобият присъщи за макрофагите свойства, които са свързани със системата на комплемента и молекулите на главния комплекс на тъканна съвместимост. Нови изследвания показват, че в процеса на стареене тубулните епителни клетки могат да придобият т.нар. свързан със стареенето секреторен фенотип, който се характеризира с повишена секреция на проинфламаторни цитокини (Yang и съавт. 2010). Още повече развиващата се левкоцитъчна инфилтрация е важен фактор в прогресирането на тубулоинтерстициалната фиброза.

Наши данни показват, че с напредване на възрастта се развива атрофия и дилатиране на тубулни сегменти като това е най-добре изразено във вътрешния кортекс при дванадесетмесечните SHR, като описаните промени са съпроводени с интерстициална фиброза и левкоцитна инфилтрация. Според някои източници тези изменения са свързани с развиващата се интерстициална фиброза като авторите отдават значение на фактори като промени в бъбречния кръвоток и гломерулната филтрационна честота (Farris и Colvin 2012). От друга страна в случай на стеноза на бъбречната артерия се наблюдава изразена тубулна атрофия с оскъдна фиброза, което свидетелства, че тези два процеса не са пряко свързани (Colvin и съавт. 2012). В действителност резултатите ни показват, че в процеса на стареене при SHR се наблюдава положителна корелация между разрастването на съединителнотъканни елементи и тубулната атрофия, като се установи по-голяма степен на засягане на тубулни сегменти по хода на вътрешния кортекс.

Оценяването на интерстициалната фиброза чрез използването на трихромни хистологични техники е възприета практика, но според някои автори тези изследвания се характеризират с ниска възпроизводимост

(Furness и Taub 2001). Въпреки това, трихромното оцветяване по Малори, използвано в настоящия труд, отразява в динамика настъпващите процеси на ремоделиране на бъбречната структура у плъх. Докато при младите и зрелите нормотензивните Wistar плъхове интерстициалната фиброза е представена от нежни съединителнитъканни повлекла разпределени относително равномерно по хода на бъбречния кортекс и медула, при възрастните плъхове се демонстрира най-ясно перитубуларното отлагане на колагенни влакна, както и в областта на бъбречните телца на юкстамедуларните нефрони. Този процес е съпроводен от развиваща се тубулна атрофия, представена с дилатирани тубулни сегменти и преминаване към нискокубичен епител, като описаните находки са сигурен белег за настъпващи дегенеративни промени. Към тях трябва да се причислят и нарастващата честота на проксимални тубулни сегменти с ясно разграничими лумени, което предполага редуциране на микровилозността на тапициращите ги клетки. Тези резултати се потвърждават и от данните, получени от проведеното електронномикроскопско изследване, проследяващо ултраструктурните промени в нефроните и тубулоинтерстициума. В условия на артериална хипертония интерстициалната фиброза започва развитието си в значителна по-ранна възраст и се характеризира с по-агресивен ход, като тубулната атрофия е повсеместно представена по хода на проксималните и дистални тубули.

В литературата са налице морфометрични изследвания оценяващи развитието на интерстициалната фиброза върху препарати с трихромно оцветяване, както и при имухистохимичното проследяване на експресията на колаген тип 1 и 3 (Servais и съавт. 2009; Feldman и съавт. 2000). Редица автори твърдят, че са налице недостатъци при количествения анализ на интерстициалната фиброза. Към тях се отнасят начина на вземане на биопсичния материал, защото резултати, получени при оценяването на серийни биопсии показват прогресиращо намаляване в степента на фиброзните изменения (Serón и Moreso 2007). Според нас интерстициалната фиброза не може да бъде представена еднакво по цялото протежение на бъбречната структура, затова трябва да се отдаде значение и на участъците, от които се изготвят хистологичните препарати. Това се подкрепя и от резултатите ни, които показват, че фиброзните изменения по хода на вътрешния кортекс на бъбреците при SHR са по-силно изразени, но оценката на фиброзата трябва да бъде комплексна, за да се придобие меродавна представа за развитието на този процес. Някои изследвания акцентират на формиращата се възпалителна инфилтрация в областта на фиброзно изменените участъци по хода на тубулоинтерстициума като рисков фактор в развитието на прогресивната бъбречна увреда (Mannon и съавт. 2010).

2. Ултраструктурни промени в нефроните и интерстициума на бъбрек при нормотензивни Wistar плъхове и SHR

Извършените от нас електронномикроскопски изследвания върху бъбреците на нормотензивни Wistar плъхове и SHR, позволиха да се оценят ултраструктурните промени в бъбречните телца и тубулоинтерстициума. Както настоящата работа, така и редица източници показват, че при част от окачествените с нормална морфология гломерулни клъбца и тубулни сегменти на нефроните при светлинномикроскопското наблюдение се установяват структурни промени от проведената електронна микроскопия. По данни от сравнителни проучвания между стари SHR и Wistar плъхове, най-съществените ултраструктурни промени се наблюдават по хода на вътрешния кортекс на бъбреците при SHR, докато при нормотензивните плъховете не се установява такава зависимост (Christiansen и съавт. 2004). Нашите резултат потвърждават по-тежкото засягане на юкстамедуларните нефрони при зрелите и възрастните SHR, в сравнение с контролните групи животни. Характеристиката на гломерулната филтрационна бариера, чиито трислоен морфологичен субстрат е представен от фенестриран ендотел, базална мембрана и подоцити (Jarad и Miner 2009), най-ясно бе демонстрирана при четиримесечните плъхове, което обясняваме с кратката давност на артериалната хипертония и липсата на развити структурни изменения вследствие на този патологичен процес. Въпреки това, в литературата се описват важни структурни различия на гломерулната филтрационна бариера между SHR и Wistar плъхове, които са налице още в прехипертензивния период от постнаталното развитие. Дори при шестседмични SHR се наблюдава по-малък диаметър на порите на фенестрирания ендотел, а в дванадесетседмични плъхове изразена вазоконстрикция на аферентните артериоли на гломерулите демонстрирана чрез сканираща електронна микроскопия (Evan и съавт. 1981). С напредване на възрастта настъпва намаление на плътността и площта на порите на фенестрирания ендотел при SHR. Използването на имунофлуоресцентна и трансмисионна електронна микроскопия демонстрира отлагането на IgG и фибрин в гломерулите, както и умерено увеличение на мезангиалния матрикс при 30 седмични SHR. Още повече при дванадесетмесечни плъхове, авторите описват изразено интрагломеруларно отлагане на фибрин и IgG, както и нарастващ процент на тромбозирали гломерули (Mandal и съавт. 1978). Нашите резултати показват, че при възрастните SHR се увеличава броя на гломерулите, в които се наблюдават клетъчни включвания в подоцитите особено по хода на юкстамедуларните нефрони. Описаните от нас сливания на подоцитните крачета, съдържащи мембранно ограничени електроннопътни включвания, както и прогресиращото задебеление на гломерулната базална мембрана се потвърждават от резултатите на Christiansen и съавтори (2004), които установяват още наличието на псевдокисти и уплътняване на цитоплазмата на подоцитите в близост с базалната мембрана, както и

вакуолизация на цитоплазмата на ендотелните клетки. Сравнително електронномикроскопско изследване между Wistar плъхове и SHR показва, че подоцитните крачета, както и загражданите от тях филтрационни цепки и цепкови диафрагми се характеризират с по-запазена структура при нормотензивната група животни (Garcia-Pinto и съавт. 2011), което се потвърждава и от нашите резултати. Авторите подчертават, че повишеното интрагломеруларно налягане е водещ патогенетичен механизъм в развитието на посочените ултраструктурни промени. Описваното в литературата задебеление на гломерулните базални мембрани вследствие на артериалната хипертония в настоящия труд най-ясно се демонстрира в групата на дванадесетмесечните SHR, особено по хода на юкстамедуларните нефрони. Трябва да отбележим, че качествени промени в ултраструктурата на гломерулите, макар и в по-малка степен се наблюдават при шестмесечните групи плъхове. Нарушената структура на гломерулната филтрационна бариера, която е своеобразен селективен филтър, води до развитието на протеинурия, която има водещо значение за тубулоинтерстициалните промени в бъбречната структура (Flack и съавт. 2010). Счита се, че отлагането на протеини в проксималните тубулни сегменти има изразен проинфламаторен и цитотоксичен ефект, стимулиращ развитието на фиброза (Abbate и съавт. 2006).

При електронномикроскопско изследване на бъбречната морфология на 12 и 24 седмични SHR и Wistar плъхове, се описва нормална структура на гломерулната филтрационна бариера при нормотензивните групи. При 12 седмичните SHR подоцитите се характеризират със скъсени и задебелени цитоподии, разширени цитотрабекули, а в цитоплазмата се откриват протеинови капчици. При по-възрастната група SHR подоцитите се представят с пръстовидни израстъци, а някои клетки са с заличена морфология. Важно значение за поддържането на нормалния структурен интегритет на подоцитите има трансмембрания протеин подокаликсин (Li и съавт. 2013). Интересно е да се отбележи, че се обсъжда ролята на този протеин в развитието на бъбречната увреда в условия на повишено кръвно налягане. В своето изследване Li и съавтори (2013) установяват, че в отсъствието на патология се наблюдава по-силна експресия на подокаликсин по хода на гломерулните епителни клетки в сравнение при артериална хипертония.

При редица експериментални модели животни, включително и при SHR, разположените в бъбречната медула интерстициални клетки се характеризират с редуцирана грануларна плътност (Mandal и съавт. 1975). Изследвания върху съдържанието на гранулите показват, че при плъхове основен компонент са липидните капки и гликопротеини (Bulgar и съавт. 1967).

Sunaga и съавтори (1979) при електронномикроскопско сравнително изследване за съдържанието на осмофилни гранули в интерстициалните клетки на бъбречната медула и папила при SHR и Wistar плъхове заключават, че средния брой осмофилни гранули варира между 10-15 при нормотензивните групи плъхове. В ранния стадий на артериалната

хипертония (8 и 10 седмични SHR) се наблюдава нарастване на броя на гранулите и ендоплазмения ретикулум, а впоследствие на по-късен етап редуциране в количеството им.

По литературни данни към основните електронномикроскопски находки по хода на проксималните и дистални тубулни сегменти при SHR се отнасят разширяване на пространството между тубулните епителни клетки в областта на интергигитациите, както и задебеление на базалните мембрани (Garcia-Pinto и съавт. 2011). Резултатите от настоящия труд също потвърждават описаните морфологични промени, като най-демонстративни бяха находките при дванадесетмесечната хипертензивна група. Съвременни изследвания се фокусират върху ултраструктурните промени в тубулните епителни клетки и в частност на митохондрияте и ендоплазмения ретикулум (He и съавт. 2014). Налице са данни, според които функционалният дефицит на тези мембранно ограничени клетъчни органели се обсъжда като нов патогенетичен механизъм в развитието на артериалната хипертония. (Liang 2011; Young и съавт. 2012). При хипертензивни условия се наблюдават скъсяване на митохондрияте, което е признак за тяхната увреда, както и разширяване на ендоплазмения ретикулум (Garcia-Pinto и съавт. 2011).

Съществуват данни, че при породата SHR се установява нарастващ брой бъбречни телца, при които в париеталния лист на Баумановата капсула се наблюдават епителни клетки с морфология характерна за проксималните тубулните сегменти (Haensly и съавт. 1982). Всъщност за наличието на висок кубичен епител по хода на париеталния лист на Баумановата капсула в структурата на човешки бъбрек при здрави индивиди се съобщава с честота около 25% (Ward 1970), като в условия на подлежащ онкологичен процес този процент нараства до 50-75% (Eulderink 1964). Сравнително електронномикроскопско изследване между SHR и Wistar плъхове показва, че през постнаталното развитие на двете породи се наблюдава нарастваща честота на висок кубичен епител като структурен елемент на Баумановата мембрана, като при 64 седмични SHR тази находка се описва в 81% от бъбречните телца, докато при контролната група процентът е съществено по-нисък 12% (Haensly и съавт. 1982). Дискутабилен е въпроса относно причините, обуславящи наблюдаваната промяна в морфологията на плоския епител като значение се отдава на артериалната хипертония в генезата на метаплазията. От друга страна не е изключена възможността трансформацията на епитела да се разглежда като етиологичен фактор в развитието на артериалната хипертония – високият кубичен епител може да доведе до нарушения във функцията на гломерулната филтрационна бариера.

3. Характеристика на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони на нормотензивни Wistar плъхове и SHR

Породата SHR е получена чрез селективно отглеждане на Wistar плъхове и е сред най-използваните експериментални модели на есенциална хипертония у човек (Zhang-James и съавт. 2013). Според Yen и съавтори (1974) три до четири гена са асоциирани с развитието на повишено кръвно налягане при тази порода плъхове. Макар, че повечето автори използват като утвърдена контролна група на SHR нормотензивни Wistar плъхове, в литературата са налице данни за известни количествени и физиологични различия в бъбречната структура при двете породи животни. Сравнително изследване показва, че общият брой гломерули, както и общия гломеруларен обем са по-ниски при млади SHR в сравнение с Wistar плъховете (Skov и съавт. 1994). Black и съавтори (2002) отричат наличието на такива количествени различия между двете породи плъхове, но заключават че общата филтрационна площ е по-голяма при хипертензивната група. Освен това, при SHR се наблюдава по-високо интрагломеруларно налягане по хода на юкстамедуларните в сравнение с кортикалните нефрони, което се регистрира от десетата седмица на постнаталното развитие и нараства с възрастта, докато при Wistar плъхове не се установяват подобни различия (Iversen и съавт. 1998). Тези особености в микроциркулацията на хипертензивните плъхове могат да обяснят причината за по-тежките морфологични промени настъпващи по хода на вътрешния кортекс и тубулоинтерстициум.

Гломерулният размер и броя на клетките в гломерулните клъбца се контролират чрез процеса на програмирана клетъчна смърт – апоптоза (Sugiyama и съавт. 1996) и могат да послужат за оценяване на развиващата се гломерулосклероза. В ранните етапи на този процес се установява постепенно нарастване на гломерулния размер, който впоследствие поради сбръчкване на гломерулното капилярно клъбце достига изходната си стойност, а по-късно се наблюдава продължаващо намаляване на този размер (Hughson и съавт. 2002). По наши данни с напредване на възрастта при Wistar плъховете е налице нарастване на площта на гломерулните клъбца по хода на кортикалните и юкстамедуларни нефрони, което свидетелства за развиващата се гломерулна хипертрофия. В литературата са налице противоречиви данни относно зависимостта между възрастта и промените в гломерулните размери. В част от изследванията се описва обратнопропорционална зависимост между размера на гломерулите и възрастта (Nyengaard и Bendtsen 1992), докато според Tan и съавтори (2009) през постнаталното развитие се установява съществено нарастване на процента на глобално склерозирани гломерули, съпроводено от нарастване на обема на несклерозиралите гломерули. Налице са и данни, според които не се открива съществена промяна в размерите на несклерозиралите гломерули, но се наблюдава значителна съединителнотъканна гломерулна пролиферация. Тези автори описват

два типа гломерули – тип 1 и тип 2, като тип 2 се характеризират с по-големи размери, по-високо съединителнотъканно съдържание и редуциране в броя на клетките на единица гломеруларна площ (Stojanović и съавт. 2012). Освен това в литературата съществуват несигурни данни относно достоверността на корелацията между промените в гломерулните размери, броя на бъбречните телца и склерозиралите гломерули през постнаталното развитие, тъй като гломерулния брой и размер са в зависимост от размера на тялото, както и възможността част от склерозиралите гломерули да бъдат заличени (Chan и съавт. 1990; Nyengaard и Bendtsen 1992). Изготвеният сравнителен анализ на площите на гломерулните клъбца на кортикалните и юкстамедуларни нефрони при SHR в настоящия труд демонстрира плавно увеличение на изследвания параметър по хода на кортикалните нефрони. Сходна корелация се открива и по хода на юкстамедуларните нефрони при младите и зрелите плъхове, но във възрастната група се установява намаляване на размера, което свидетелства, че разположените във вътрешния кортекс нефрони са по – тежко засегнати от процеса на гломерулосклероза. Тези резултати имат потвърдителен характер за по-ранния и агресивен ход на гломерулната увреда по хода на вътрешния кортекс в условия на артериална хипертония. Счита се, че повишеното интрагломеруларно налягане е водещ патогенетичен механизъм в развитието на този процес (Nagasawa и съавт. 2012).

Морфометрични изследвания показват, че в хода на стареенето и развитието на компенсаторна хипертрофия, средните обеми на гломерулните клъбца и бъбречните телца на юкстамедуларните нефрони са близо два пъти по-големи от тези на кортикалните нефрони (Olivetti и съавт. 1977). Според наши данни през постнаталното развитие на Wistar плъхове се наблюдава плавно нарастване на площта на бъбречните телца на кортикалните и юкстамедуларни нефрони, като такава тенденция се установява и при младите и зрели SHR. Във възрастната група SHR се наблюдава известно намаляване в площта на бъбречните телца на юкстамедуларните нефрони, което може да се обясни с настъпващите морфологични изменения по хода на нефроните вследствие на артериалната хипертония. Редица изследвания сред човешката популация описват плавно нарастване на диаметъра на бъбречните телца с напредването на възрастта, като този процес е по-изразен след 35 годишна възраст. Резултатите показват, че диаметърът варира между 150 и 250 μm (Banik и Aktar 2014).

Според Hughson и съавтори (2003) средния гломеруларен обем е в пряка зависимост от броя на нефроните в бъбрека, като по-малкия брой нефрони обуславя по-голям гломеруларен обем. В своето изследване Haruhara и съавтори (2015) не откриват съществени различия в средната гломеруларна плътност при нормотензивни и хипертензивни донори. Всъщност ниската гломеруларна плътност се счита като независим рисков фактор за развитие и прогресиране на бъбречна патология (Tsuboi и съавт. 2011). Трябва да се отбележи и факта, че теглото при раждането е от съществено значение за общия брой нефрони в бъбреците (Zidar и

съавт. 1998). Следователно процесът на нефрогенезата е тясно свързан с хода на настъпващите през постнаталното развитие промени на изследваните от нас морфометрични показатели. От направената литературна справка формирането на нефроните при човек завършва към 36 гестационна седмица на бременността, докато у плъх този процес е значително по-дълъг и приключва към 15 ден от постнаталното развитие (Hinchliffe и съавт. 1991; Zoetis и Hurtt 2003). Налице са данни, според които през неонаталния период кортикалните нефрони са незрели и продължават развитието си от метанефричната бластема, докато юкстамедуларните нефрони са напълно развити и следователно с по-голям гломеруларен размер (Lumbers 1995). Морфометрични изследвания показват противоречиви резултати относно възприетото схващане, че в човешкия бъбрек юкстамедуларните гломерули са по-големи по размер в сравнение с тези във външния кортекс. В подкрепа на това твърдение са изследвания, които установяват по-голям размер на юкстамедуларните гломерули (Artacho-Perula и съавт. 1993), както и че аферентните артериоли се характеризират с по-голям диаметър по хода на вътрешния кортекс при млади плъхове (Gattone и съавт. 1983).

Според някои източници в отсъствието на подлежаща патология не се наблюдават съществени различия в размера на гломерулите по хода на външния и вътрешния кортекс. Авторите подчертават, че с напредването на възрастта нараства процентът на глобално склерозиралите гломерули, като този процес е по-изразен по хода на външния кортекс. Това дава основание да се предположи, че в условия на артериална хипертония, развиващата се исхемична гломерулосклероза засяга първоначално и в по-голяма степен гломерулите на юстамедуларните нефрони, което се изразява с компенсаторната им хипертрофия (Newbold и съавт. 1992). Важно е да се отбележи, че при анализиране на биопсии от човешки бъбреци се установяват някои расови особености. При афроамериканци се наблюдава по-агресивен ход на хипертензивната нефросклероза, както и по-голям гломеруларен обем в сравнение с бялата популация (Pesce и съавт. 1994).

Изследвания върху примати, които са биологично и филогенетично по-близки до човека, показват, че гломерулите на нефроните във вътрешния кортекс се характеризират с по-голям размер от кортикалните нефрони, като сред тях също се отчита по-голяма вариабилност на изследвания морфометричен показател. Още повече принадлежащите на юкстамедуларните нефрони аферентни артериоли са с по-голям диаметър от тези разположени във външния кортекс. Въз основа на това, авторите заключават, че включително и при примати се наблюдава хетерогенност на гломерулните обеми по хода на трите основни вида нефрони (Skov и съавт. 1999). Наши данни от изготвения сравнителен анализ на площта на гломерулните клъбца на изследваните два основни вида нефрони при SHR показват, че при шестмесечната група се описва нарастване на показателя, който достига максимална стойност по хода на юкстамедуларните нефрони, а при възрастната група се установява

намаляване на площта на изследваните гломерули. Трябва да се подчертае, че само при възрастните SHR се наблюдава намаляване на площта на бъбречните телца на юкстамедуларните нефрони. Тези резултати потвърждават възприетото схващане за по-ранното и по-тежко засягане на юкстамедуларните нефрони в условия на артериална хипертония. При възрастните нормотензивни контроли се установява продължаващо нарастване на площта на гломерулите, което свидетелства, че процесът на гломерулосклерозата е по-слабо изразен.

Според Arataki (1926) се наблюдават някои възрастово обусловени морфометрични промени по хода на гломерулите при здрави плъхове. Разположените във външния кортекс гломерулни клъбца са с по-малък диаметър от тези на юкстамедуларните нефрони. Освен това, авторът описва двуфазов процес на гломеруларен растеж – интензивно нарастване до 150 ден след раждането, последвано от по-плавен темп до 500 ден от постнаталното развитие. В нашето изследване при дванадесетмесечните нормотензивни Wistar плъхове е налице продължаващо нарастване на размерите на гломерулните клъбца, в сравнение с по-младите възрастови групи, което потвърждава описаната от Arataki тенденция за по-голям гломеруларен размер по хода на юкстамедуларните нефрони. При проследяване на възрастните SHR ясно се виждат намаляване на площта на гломерулите, което показва, че в условия на артериална хипертония е налице отклонение от описания в норма гломеруларен растеж, както и по-ранно развиваща се гломерулосклероза, особено по хода на вътрешния кортекс в сравнение с контролната група животни.

4. Роля на азотния оксид и експресия на невроналната азотен оксид синтаза през постнаталното развитие на нормотензивни Wistar плъхове и SHR

В литературата наличната информацията относно ролята на NO като регулаторна молекула в контрола на редица бъбречни функции трудно може да бъде обобщена, но за нейната важност свидетелства експресията и на трите изоформи на ензима NOS в бъбречната структура (Bachmann и съавт. 1995; Ahn и съавт. 1994). Сред тях водещо значение се отдава на nNOS, която участва в контрола на артериалното налягане, а освен това са налице и данни за модулиращата ѝ активност на съдовия тонус (Ichihara и съавт. 1998). Прилагането на селективен инхибитор на nNOS предизвиква артериална хипертония, която някои автори обясняват с повишена активност на ТГОВ, а според други с нарушаване функцията на бъбречната медула (Ollerstam и съавт. 1997; Mattson и Bellehumeur 1996).

Изследванията, изучаващи функцията на NO в бъбречния контрол на кръвното налягане са насочени в две основни направления – кортекс и медула. Обикновено бъбречната кора се асоциира с осъществяването на ТГОВ и редица автори описват повишена експресия на конститутивната

NOS в условия на артериална хипертония (Welch и съавт. 1999). От друга страна, медулата е основното място, където се синтезира NO, който контролира обусловената от кръвното налягане натриуреза, посредством повлияване на медуларния кръвоток и натриева екскреция (Zou и Cowley 1997). Налице са данни за повишена активност на конститутивните изоформи на NOS в бъбречната медула при SHR спрямо прилежащия кортекс, както и при сравняване с медулата на нормотензивни Wistar плъхове (Nayakawa и Raji 1998; Nava и съавт. 1996). Като недостатък на тези изследвания може да се посочи липсата на ясно разграничаване на локализацията на калций-зависимите изоформи на NOS – eNOS и nNOS.

Чрез имунохистохимични методи е установена експресия на протеиновия инхибитор на nNOS в ендотелните клетки на гломерулните клъбца, аферентните артериоли и vasa rectae. По хода на вътрешната медула се наблюдава силно положителна реакция в апикалната част на клетките на събирателните каналчета, където всъщност е и основната локализация на nNOS. Важно е да се отбележи липсата на експресия на протеиновия регулатор в клетките на macula densa, което предполага, че регулацията на nNOS в тази зона се осъществява посредством други механизми (Roczniak и съавт. 2000).

Проследяването на промените в имунореактивността на nNOS в бъбречната структура при SHR и Wistar плъхове, позволява да се изучат настъпващите изменения в експресията на тази конститутивната изоформа на ензима в норма и в условия на развита артериална хипертония. В по-тесен смисъл, това дава възможност да се преоцени ролята на синтезирания от nNOS NO, защото от направения литературен обзор преваляваща е информацията относно eNOS. В своето изследване Fernández и съавтори (2003) описват при зрели Wistar плъхове силно положителна експресия на nNOS във вътрешната медула в близост до бъбречната папила и по-слаба до умерена в периферната ѝ част, докато външната медула е с липсваща имунореактивност. По протежение на кортекса се наблюдава положителна имунохистохимична реакция в клетките на macula densa, включително и в париеталния и висцерален лист на Баумановата капсула. Сравняването на тези резултати с получените при изследване на SHR показват нарастваща имуноекспресия на nNOS в бъбречната медула, която се изразява със нарастващ интензитет на имунохистохимичната реакция във вътрешната медула, както и позитивиране на експресия във външната сърцевина.

Изследвания върху имуноекспресията на nNOS в бъбречната структура показват ясно изразена положителна експресия на изоформата в клетките на събирателните каналчета на вътрешната медула с разпределение на ензима в цитоплазмата и перинуклеарно (Roczniak и съавт. 1999). Към структурите, в които се установява експресия на nNOS се включват клетките на macula densa, както и гломерулните епителни клетки (Bachmann и съавт. 1995). Нашите резултати също потвърждават описаното разпределение на nNOS като установихме тенденция към нарастваща имуноекспресия на ензима с напредване на възрастта, особено в хипертензивните групи плъхове. Това би помогнало на бъдещи

изследвания за по-пълното разбиране на ролята на nNOS в контрола на бъбречните функции.

От направената литературна справка значителна част от изследванията се фокусират върху ендотелната изоформа на NOS в контрола на бъбречната функция. Погрешно би било да се заключи, че само една от изоформите на NOS има водещо значение в регулацията на бъбречната хемодинамика. В настоящата работа анализирахме детайлно имуноекспресията на nNOS в отделните структурни елементи на нефроните в норма и патология, с което разширяваме информацията относно разпределението на тази изоформа. Резултатите ни ясно показват нарастващата имуноекспресия на nNOS, която колерира положително с давността на артериалната хипертония. Това дава основание да предположим, че повишената активност на nNOS има ренопротективен ефект по отношение развитието на структурните изменения и последващия ги функционален дефицит на бъбреците в условия на повишено кръвно налягане.

VI. Изводи

Съпоставката на получените резултати в настоящия труд с данните от детайлно направената литературна справка позволява да се направят следните изводи:

1. Морфологичните промени в нефроните и бъбречния интерстициум са с ясно подчертана тенденция за по-ранен и агресивен ход при хипертензивните групи животни.

2. С напредване на възрастта при SHR броя на склеротично променените гломерули на юкстамедуларни нефрони нараства.

3. През постнаталното развитие на Wistar плъхове и SHR настъпват промени в експресията на nNOS в бъбречната структура, с характерно разпределение на ензима в бъбречния кортекс и медула.

4. С напредване на възрастта на Wistar плъховете и SHR се наблюдава нарастваща експресия на nNOS в структурните елементи на нефроните, особено по протежение на бъбречните телца и вътрешната медула.

5. Електронномикроскопското изследване показва по-изразено засягане на гломерулната филтрационна бариера у SHR.

6. Най-съществените ултраструктурни промени на тубулните епителни клетки са свързани с редуциране на микровилите и разширяване на междуклетъчните пространства.

7. Данните от изготвения количествен анализ на изследваните морфометрични показатели ясно демонстрират, че процесите на гломерулна хипертрофия и последваща гломерулосклероза се развиват с по-бързи темпове у SHR, като предилекционно по-тежко засегнати са юкстамедуларните в сравнение с кортикалните нефрони.

VII. Приноси

Научни приноси с оригинален характер:

1. Комплексна оценка на настъпващите морфологични промени в бъбречната структура през постнаталното развитие на Wistar плъхове и SHR, посредством използването на хистологични, хистохимични, електронномикроскопски и имунохистохимични техники.

Научни приноси с потвърдителен характер:

1. Проследяване на светлинномикроскопските промени в нефроните и бъбречния интерстициум при различни възрастови групи Wistar плъхове и SHR.

2. Ултраструктурна характеристика на гломерулната филтрационна бариера и тубулните епителни клетки при различни възрастови групи Wistar плъхове и SHR.

3. Детайлно проследяване на промените в експресията на nNOS в бъбречната структура при млади, зрели и възрастни Wistar плъхове и SHR.

4. Сравнителен количествен анализ на настъпващите промени в площта на бъбречните телца и гломерули на кортикални и юкстамедуларни нефрони при различни възрастови групи Wistar плъхове и SHR.

VIII. Публикации по дисертационния труд

1. **Stanchev S**, Iliev A, Malinova L, Landzhov B, Ovtsharov W. (2018) Light microscopic and ultrastructural kidney changes in spontaneously hypertensive rats. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, (in press)

(IF – 0,251)

2. **Stanchev S**, Iliev A, Malinova L, Landzhov B, Hinova-Palova D. (2017) Histological study on the postnatal alterations in the rat kidney. *Scripta Scientifica Medica*, 49(1): 38-42.

3. **Stanchev SS**, Iliev AA, Malinova LG, Landzhov BV, Kotov GN, Hinova-Palova DV. (2017) Light microscopic study on renal morphological alterations in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 10(1): 18-24.

IX. Цитирания

Stanchev S, Iliev A, Malinova L, Landzhov B, Hinova-Palova D. (2017) Histological study on the postnatal alterations in the rat kidney. *Scripta Scientifica Medica*, 49(1): 38-42.

1. Savova K, Yordanova P, Dimitrov D, Tsenov S, Trendafilov D, Georgieva B. (2017) Light microscopic morphological characteristics and data on the ultrastructure of the cardiomyocytes. *Academia Anatomica International*, 3(2): 4-8.

Stanchev SS, Iliev AA, Malinova LG, Landzhov BV, Kotov GN, Hinova-Palova DV. (2017) Light microscopic study on renal morphological alterations in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 10(1): 18-24.

2. Savova K, Yordanova P, Dimitrov D, Tsenov S, Trendafilov D, Georgieva B. (2017) Light microscopic morphological characteristics and data on the ultrastructure of the cardiomyocytes. *Academia Anatomica International*, 3(2): 4-8.

X. Научни съобщения във връзка с дисертационния труд

1. **Stanchev S**, Dimitrov D, Iliev A, Malinova L, Landzhov B, Hinova-Palova D. A histological analysis of changes in the morphology of the kidneys in spontaneously hypertensive rats. XVI International Congress of Medical Sciences, May 11 – 14, 2017, Sofia. Abstracts, p. 40.
2. **Stanchev S**, Tsenov S, Iliev A, Malinova L, Landzhov B, Hinova-Palova D. Light microscopic morphological study of the rat kidney during the postnatal period. XVI International Congress of Medical Sciences, May 11 – 14, 2017, Sofia. Abstracts, p. 64.
3. **Stanchev S**, Iliev A, Malinova L, Landzhov B. Age-related changes of nNOS immunoreactivity in renal corpuscles of spontaneously hypertensive rats. XXIII National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with international participation, October 5 – 7, 2017, Varna. Abstracts, p. 27.
4. **Stanchev St**, Iliev Al, Kotov G, Malinova L, Landzhov B. A comparative analysis of the changes in superficial and juxtamedullary nephrons in spontaneously hypertensive rats. VII National Conference with international participation “Morphological Days”, June 8 – 10, 2018, Sofia. Program, p. 5.