МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

КАТЕДРА ПО АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ

ДИСЕРТАЦИЯ

д-р Станчо Стефанов Станчев

СОФИЯ 2018

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

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.

Съдържание:

Използвани съкращения **2**
I. Въведение **3**
II. Литературен обзор **5**
1. Нормална морфология и ултраструктура на бъбреците 5
2. Произход и развитие на бъбреците 15
3. Възрастово-зависими структурни изменения в бъбреците. 19
4. Морфологични промени в бъбреците вследствие на артериална хипертония. 21
5. Азотен оксид (NO) и азотен оксид-синтаза (Nitric oxide synthase, NOS) 23
5.1. Роля на азотния оксид и механизъм на синтез 23
5.2. Експресия на изоформите на NOS в бъбреците 26
5.3. Ефекти от действието на NO в бъбреците 27
5.4. Регулация на експресията на nNOS 34
III. Цел и задачи **36**
IV. Материал и методи **37**
1. Експериментални животни 37
2. Фиксиране на хистологичния материал 38
3. Изготвяне на парафинови тъканни срези 38
4. Оцветяване с хематоксилин и еозин 39
5. Оцветяване по метода на Малори 40
6. PAS (перйодна киселина, реактив на Шиф) - реакция 41
7. Методика на имунохистохимичната процедура 42
8. Методика на електронномикроскопското изследване 45
9. Микроскопиране и анализ на получените резултати 46
V. Собствени резултати **48**
1. Обосновка за използваните хистологични, хистохимични и имунохистохимични техники при изготвянето на препарати от бъбрек на плъх 48
2. Качествени характеристики на бъбречната структура през различни етапи от постналталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR 51
3. Морфологични промени в нефроните от проведеното електронномикроскопско изследване 66
4. Количествени характеристики на бъбречните телца и гломерулите на кортикални и юкстамедуларни нефрони през различни етапи от постналталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR 71
VI. Обсъждане **85**
1. Постнатални промени по хода на нефроните и интерстициума на бъбрек 85
2. Ултраструктурни промени в нефроните и интерстициума на бъбрек при нормотензивни Wistar плъхове и SHR 96
3. Характеристика на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони на нормотензивни Wistar плъхове и SHR 103
4. Роля на азотния оксид и експресия на nNOS в бъбречната структура през постналталното развитие на нормотензивни Wistar плъхове и SHR 109
VII. Изводи **115**
VIII. Приноси **116**
IX. Публикации по дисертационния труд **117**
X. Научни съобщения във връзка с дисертационния труд **118**
XI. Библиография **119**

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

BH4 - тетрахидробиоптерин

NLA- нитро-L-аргинин

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

рГЦ - разтворима гуанилат циклаза

ЮГА – юкстагломерулярен апарат

ТГОВ – тубулогломерулярна 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

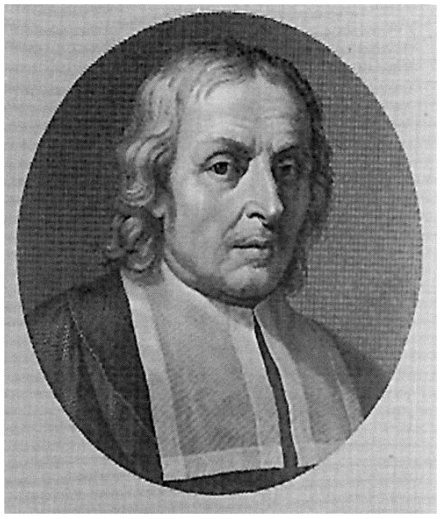
WR – плъхове от порода Wistar (Вистар)

SHR-К – спонтанно хипертензивни плъхове кортикални нефрони

SHR-Ю – спонтанно хипертензивни плъхове юкстамедуларни нефрони

WR-К – Wistar плъхове кортикални нефрони

WR-Ю – Wistar плъхове юкстамедуларни нефрони



Марчело Малпиги (1628-1694)
/основоположник на бъбречната микроанатомия/

I. Въведение

Настъпващите през постнаталното развитие морфологични промени в бъбречната структура могат да бъдат както възрастово обусловени, така и вследствие на подлежащ патологичен процес. Комплексни изследвания на отделителната система и в частност на бъбреците показват, че макар и със значителен функционален резерв, настъпващите 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.

Като социално значимо заболяване есенциалната хипертония е сред водещите фактори за развитието на хронична бъбречна увреда. Настъпващите вследствие на този патологичен процес морфологични промени са повсеместно представени по хода на бъбречния паренхим и интерстициум. Налице са различни мнения относно използването на гломерулните и тубулоинтерстициални изменения при обективизиране на бъбречния функционален капацитет. Настоящият труд е опит да се

направи комплексна качествена и количествена оценка на настъпващите през постналното развитие възрастово зависими промени, както и вследствие на артериална хипертония, с което да се допълнят и обогатят данните относно бъбречната морфология в норма и патология. Въпреки наложеното през годините становище за eNOS като ключов регулатор на редица бъбречни функции, ние поставяме акцент върху значението на nNOS, чиято експресия търпи съществени изменения при проведеното имунохистохимично изследване през различните възрастови групи експериментални модели животни. С оглед използваните комплексни техники за изследване на бъбречната структура считаме, че настоящата работа може да послужи като полезен източник на информация в областта на морфологичните науки и нефрологията.

II. Литературен обзор

1. Нормална морфология и ултраструктура на бъбреците

При бозайниците бъбречният паренхим се състои от две ясно разграничими части: външна - кортекс и вътрешна - медула. Кортексът заема пространството между бъбречната капсула и aa. arcuatae и структурно включва гломерулите и хетерогенна популация от тубулни сегменти – прави тубулни сегменти, подредени в медуларни лъчи, разположени между кортико-медуларната зона и бъбречната капсула, както и от извити тубулни сегменти.

Медулата е разположена между aa. arcuatae и върховете на пирамидите. Състои се от външна и вътрешна част, не съдържа гломерули, извити тубулни сегменти почти не се наблюдават, с изключение в областта на кортикомедуларната зона. Външната медула се отличава с наличието на тънко възходящо рамо на примката на Хенле и се подразделя на външна и вътрешна ивица. Морфологично двете ивици се разграничават по наличието на проксимални тубулни сегменти, които се наблюдават само във външната ивица. Вътрешната медула се подразделя условно на две или три области като основата й е разположена между границата с външната медула и папилата. Тази част се означава още като първа област на вътрешната медула. Папилата включва терминалната част от вътрешната медула и се разделя на две части, като първата обхваща проксималната, а втората - дисталната й част, включително и папиларния връх (Clapp 1987; Maunsbach 1976).

Гломерулите се разполагат в бъбречния кортекс и се състоят от капиляри, които водят началото си от vas afferens и се оттичат към vas efferens. Обхванати са от капсулата на Бауман като цялата структура се означава като corpusculum renale. Гломерулите, които се разполагат в близост до бъбречната капсула се наричат кортикални. Кортикалните и междинните нефроните имат къси примки на Хенле. Гломерулите

разположени дълбоко във вътрешния кортекс се означават като юкстамедуларни и нефроните, към които принадлежат имат дълги примки на Хенле.

Интрагломерулярният мезангиум се разполага сред капилярните примки и се състои от мезангиални клетки и аморфен мезангиален матрикс. Тези клетки са с неправилна форма, с дълги цитоплазмени израстъци, разположени под ендотелните клетки върху капилярната базална мембрана. Съдържат ендоцитозни везикули, лизозомален компартмент и множество микрофиламенти, особено в цитоплазмените израстъци, които влизат в контакт с капилярните примки. Мезангиалните клетки притежават контрактилна, ендоцитозна и фагоцитозна способност като участват в регулацията на гломерулната филтрация чрез промяна в капилярната пропускливост, осъществяват разграждането на имунни комплекси и структурни компоненти на гломерулите (Schlöndorff 1996; Tisher и Brenner 1993).

Капилярните примки се състоят от три основни слоя: базална мембрана, с разположен фенестриран ендотел откъм страната на капилярния лумен и висцерални епителни клетки откъм филтрационната страна. Тази структура представлява морфологичен субстрат на гломерулната филтрационна бариера. Селективната й пропускливост се определя от механичните и електростатичните й свойства. Отрицателно заредените нискомолекулни протеини не се пропускат и остават в кръвното русло, докато тези със същата молекулна маса, но неутрално или положително заредени могат да бъдат филтрирани (Bohrer и съавт. 1978; Brenner и съавт. 1977; Caulfield и Farquhar 1974; Chang и съавт. 1975; Kanwar и Farquhar 1979; Tisher и Brenner 1993).

Фенестрираният ендотел при човека се характеризира с наличието на пори с диаметър 70- 100nm (Tisher и Brenner 1993). Гломерулната базална мембрана се състои от три слоя, които в зависимост от разположението и електронната им плътност се означават като lamina rara interna, върху която

залягат ендотелните клетки, lamina rara externa, върху която се разполагат висцералните епителни клетки и lamina densa – електронноплътен слой. Висцералните епителни клетки, т.нар. подоцити залягат от филтрационната страна на капилярните примки с цитоплазмени израстъци, наричани още първични и вторични крачета (Verlander 1998). Тези клетки допринасят за структурната стабилност на капилярното клъбце и селективната пропускливост на филтрационната бариера, синтезират компонентите на базалната мембрана, имат ендоцитозни и фагоцитозни свойства (Kerjaschki 1994; Mundel и Kriz 1995).

Юкстагломерулярният апарат (ЮГА) е разположен в съседство с гломерула, участва в регулацията на системното кръвно налягане и гломерулната филтрационна честота (Schnermann и Briggs 1992). Морфологичният субстрат на ЮГА включва аферентната и еферентна артериоли, екстрагломерулярна мезангиална област и macula densa. Macula densa представлява своеобразна плочка, изградена от специализирани епителни клетки, локализирани в дисталната част на кортикалното дебело възходящо рамо на примката на Хенле. Macula densa е разположена в непосредствена близост до екстрагломерулярната мезангиална област между аферентната и еферентна артериоли, като е свързана с гломерула на същия нефрон. Изграждащите я клетки са по- високи и по-тесни, в сравнение с тези на дебелото възходящо рамо на примката на Хенле. Функционално клетките й възприемат промени в тубулната течност в дисталния отдел на нефрона и въздействат на останалата част от ЮГА, което води до модулиране на кръвния поток или резистентността на гломерула, с последваща промяна на филтрационната честота.

Екстрагломерулярният мезангиум е разположен между аферентната и еферентна артериоли и macula densa. Изграден е от видоизменени гладкомускулни клетки с удължена форма и проминиращи микрофиламенти в цитоплазмата, което е във връзка с контрактилната им способност. Екстрагломерулярните мезангиални клетки се свързват

посредством цепковидни контакти, както помежду си, така и със съседни интрагломеруларни мезангиални клетки, не съдържат гранули, но понякога в някои от тях могат да бъдат наблюдавани гранули с ренин, особено в периферията на мезангиума. Функционално са свързани с приемането на сигнали от macula densa и регулацията на кръвния поток към аферентната и еферентна артериоли. В резултат на това настъпват промени в гломерулното перфузионно налягане – главен фактор, определящ гломерулната филтрационна честота (Verlander 1998).

Юкстагломеруларните грануларни клетки са разположени в стената на аферентната, а в някои случаи и на еферентната артериола (Kriz и Kaissling 1992; Lemley и Kriz 1994). Те представляват видоизменени гладкомускулни клетки, които съдържат гранули с ренин. Счита се, че отделяне на ренин настъпва при понижение на перфузионното налягане в аферентната артериола, посредством директна симпатикова стимулация, което води до активиране на системата ренин-ангиотензин-алдостерон с последващо повишаване на системното кръвно налягане.

Проксималният тубулен сегмент е тапициран с кубичен епител с проминираща апикална четковидна повърхност и функционално е свързан с реабсорбция на вода, елекролити, глюкоза, нискомолекулни протеини, пептиди и аминокиселини посредством активен и пасивен транспорт. Във връзка с това, клетките притежават обширна апикална и базолатерална повърхност, с което се обезпечава голямата абсорбтивна площ на плазмалемата. Клетките притежават ясно обособени ендоцитозен и лизозомален компартменти за реабсорбция и преработка на макромолеули, както и множество митохондрии, осигуряващи енергия за активния транспорт. Транспортните механизми включват Na^+/K^+-АТФ-за, локализирана базолатерално на плазмалемата, както и специфични транспортери и канали с апикално и базолатерално разположение на клетъчната мембрана. Проксималната тубулна реабсорбция на

нискомолекулни протеини и пептиди се осъществява посредством рецептор-медиирана ендоцитоза (Maunsbach 1976).

Проксималният тубул има извита и права част, които се подразделят на отделни сегменти, означавани като S1, S2 и S3, въз основа на ултраструктурната им характеристика (Maunsbach 1966). Проксималният извит тубул е локализиран в кортекса, започва от Баумановата капсула и в края си преминава в проксималния прав тубул, който е разположен в медуларните лъчи в бъбречния кортекс и достига до външната ивица на външната медула (Verlander 1998).

S1- сегментът представлява началната част на проксималното извито каналче и се характеризира с високи кубични епителни клетки с четковидна повърхност, апикално разположени едноцитозни везикули и проминиращ лизозомален компартмент. В базалните нагъвания на плазмалемата се намират вертикално ориентиентирани митохондрии, а междуклетъчните контакти се осъществяват посредством интердигитации (Welling и Welling 1975).

S2-сегментът включва останалата част на проксималното извито каналче и началната част на проксималното право каналче. В сравнение с S1- сегмент, клетките са по - ниски, с по - слабо изразена апикална микровилозност, редуциран брой базалните нагъвания, митохондрии, ендоцитозни везикули и лизозоми. В базалния компартмент се разполагат цитоплазмени разширения, предизвикани от множество повърхностни вгъвания на клетъчната мембрана (Verlander 1998).

В клетките на проксималното право каналче у плъх се установяват множество пероксизоми, което е видово специфична особеност, тъй като при други животински видове, вкл. и при човек тези органели преобладават в клетките на проксималното извито каналче **(**Zaar 1992).

S3-сегментът обхваща частта от проксималното право каналче, разположена между вътрешния кортекс и външната ивица на външната медула. Всички части на проксималните тубули, разположени във

външната медула на практика представляват S3-сегменти, въпреки че някои извити каналчета се разполагат в областта на кортикомедуларната граница. Клетките на S3-сегмента притежават обширна апикална четковидна повърхност, но се наблюдава редуциране на специализираните образувания по базолатералната повърхност на клетъчната мембрана, в сравнение с тези на S1- и S2- сегменти. Освен това, у плъхове тези клетки се отличават с относително по-малък брой митохондрии, едноцитозни везикули и лизозоми (Verlander 1998).

В дисталния край на S3-сегмента на проксималния тубул се намира рязък преход на тапициращия епител представен от плоските клетки на тънкото низходящо рамо на примката на Хенле. При нефроните с къса примка на Хенле, тънкото низходящо рамо достига до границата между външната и вътрешната медула, докато при тези с дълга примка на Хенле, то достига дълбоко във вътрешната медула, след което се продължава в тънкото възходящо рамо на примката на Хенле.

По протежение на тънкото рамо на примката на Хенле не се наблюдава активен транспорт като тапициращият епител се характеризира с оскъдно количество клетъчни органели и специализирани образувания на плазмалемата. Този сегмент от нефрона функционално е свързан с концентрацията на урината като този процес се подпомага от пасивни транспортери за урея и водни канали.

В тънкото низходящо рамо на примката на Хенле се описват четири типа епителни клетки, които имат специфично разположение при нефроните с къси и дълги примки на Хенле. При тези с къси примки, тънкото низходящо рамо е изцяло съставено от тип 1 епителни клетки, които са плоски, бедни на клетъчни органели, с оскъдни специализирани структури на плазмалемата. При нефроните с дълги примки тънкото низходящо рамо в частта му разположена във външната медула е тапицирана от тип 2 епителни клетки, докато тази във вътрешната медула е представена от тип 3 епителни клетки. Епителните клетки тип 2 са най-

високи, имат проминиращи латерални интердигитации на клетъчната мембрана, голямо количество митохондрии и наличие на Na^+/K^+-АТФ-за, като се установяват някои структурни особености при различните видове (Imai и Yoshitomi 1990; Madsen и Brenner 1989). Тип 3 епителни клетки са плоски, с малък брой митохондрии и латерални интердигитации, но в сравнение с клетките тип 1 и 4 се отличават със силно развити проминиращи апикални мембранни микропроекции. Епителните клетки тип 4 се разполагат в тънкото възходящо рамо на нефроните с дълги примки. Те са плоски, с латерално разположени интердигитации, бедни на митохондрии и апикални мембранни микропроекции.

Епителът на дебелото възходящо рамо на примката на Хенле е кубичен и се характеризира с вертикално ориентирани митохондрии, разположени в базалните нагъвания на плазмалемата. В цитоплазмата на тези клетки се установяват апикално разположени везикули и къси мембранни микропроекции. Тази част от нефрона е функционално свързана със значителна реабсорбция на Na^+ и Cl^-, но е непроницаема за вода. Реабсорбцията на Na^+ се осъществява посредством активен транспорт чрез базолатерално разположена Na^+/K^+-АТФ-за. Разположеният апикално буметанид-чувствителен $Na^+/K^+/2\ Cl^-$-котранспортер е място на действие на примкови диуретици (Hebert и съавт. 1996).

Въпреки сходната морфология на дебелото възходящо рамо във външната медула и кортекса, се установяват някои сегментни и клетъчни различия. Така например клетките в частта от дебелото възходящо рамо разположена във вътрешната ивица на външната медула са по-високи, в сравнение с по-дисталната му част (Madsen и Tisher 1986; Welling и Hill 1978). Кортикално разположеното дебело възходящо рамо се изгражда от клетки с проминиращи латерални интердигитации и къси апикални микропроекции на клетъчната мембрана. При плъхове са установени два типа клетки в тази част на нефрона – гладки и неравни, в зависимост от наличието на апикално разположени микропроекции на плазмалемата

(Allen и Tisher 1976). В дисталната част на кортикалното дебело възходящо рамо се разполага macula densa, съставна част на ЮГА (Verlander 1998).

Дистално от macula densa се разполага дисталното каналче, което въз основа на морфологични и физиологични критерии се подразделя на три ясно разграничими сегмента – дистално извито каналче, свързващ сегмент и начално събирателно каналче. Те се разполагат в кортекса и се разпростират между дисталния край на дебелото възходящо рамо и кортикалното събирателно каналче, намиращо се в медуларните лъчи. Клетките на дисталното извито каналче са по-високи от тези на дебелото възходящо рамо и се характеризират с къси микровили, апикално разположени в цитоплазмата везикули и дълбоки базални нагъвания на плазмалемата, в които се намират вертикално ориентирани митохондрии, разположени базално спрямо клетъчното ядро. Този сегмент на нефрона е непроницаем за вода като се отличава от дебелото възходящо рамо с наличието на апикално разположен тиазид-чувствителен Na^+/Cl^--котранспортер и липсата на буметанид-чувствителен $Na^+/K^+/2Cl^-$-котранспортер. Основните транспортни механизми са представени от базолатерално разположени Na^+/K^+-АТФ-за, Ca^{2+}-АТФ-за, Na^+/Ca^{2+}-обменник и апикално локализиран Ca^{2+}- канал (Plotkin и съавт. 1996; Borke и съавт. 1987; Friedman и Gesek 1995; Kumar и Penniston 1991; Yu и съавт. 1992).

Дисталното извито каналче се продължава в свързващия сегмент. Няколко свързващи сегмента се обединяват и се вливат в началния събирателен тубул, който впоследствие преминава в кортикалното събирателно каналче, разположено в медуларния лъч. Свързващият сегмент се характеризира с хетерогенна популация клетки, всред която преобладават клетките на свързващия сегмент и интеркалатни клетки, като при някои животински видове вкл. при човек се установяват клетки на дисталното извито каналче и главни клетки (Madsen и Brenner 1989). Клетките на свързващия сегмент са по-бедни на митохондрии и апикални

микропроекции на плазмалемата в сравнение с тези на дисталното извито каналче. Функционално те са свързани с реабсорбцията на Na^+ и двувалентни катиони, притежават апикално разположени водни канали, които се намират под влияние на антидиуретичния хормон (Knepper 1997). Интеркалатните клетки се подразделят на три типа – А, В и С. Клетките тип А осъществяват секреция на H^+, докато тип В на бикарбонати и са тясно свързани с регулацията на алкално-киселинното равновесие. Клетките тип С са специфични за свързващия сегмент, богати са на митохондрии, апикални мембранни микропроекции , като при мишки се установява апикално разположена H^+-АТФ-за (Teng-umnuay и съавт. 1996).

Епителът на началното събирателно каналче е по-нисък в сравнение с този на свързващия сегмент и се състои от два клетъчни типа – интеркалатни и главни клетки. В зависимост от своето разположение събирателното каналче се разделя на няколко сегмента, които показват някои структурни и функционални различия – 1. кортикално събирателно каналче; 2. събирателно каналче на външната и вътрешната ивица на външната медула; 3. събирателно каналче на вътрешната медула, което се подразделя на два или три сегмента (Clapp и съавт. 1989; LeFurgey и Tisher 1979; Ridderstrale и съавт. 1988;Clapp и съавт. 1987; Sands и Knepper 1987). Терминалните сегменти на събирателните каналчета на вътрешната медула се сливат помежду си и формират каналчета на Белини на върха на бъбречната папила (Verlander 1998).

Кортикалното събирателно каналче е съставено от главни и интеркалатни клетки. Преобладаващата клетъчна популация е представена от главните клетки, които са относително нискокубични, с централно разположена цилия и множество базални нагъвания на плазмалемата. Поради ограниченото количество органели при светлинна микроскопия тези клетки се описват като светли, за разлика от интеркалатните клетки, които се означават като тъмни (Verlander 1998). Главните клетки осъществяват реабсорбция на Na^+ и секреция на K^+ посредством

базолатерална Na^+/K^+-АТФ-за и апикално разположени Na^+- и K^+- канали, които са чувствителни към алдостерон (Wade и съавт. 1990). Освен това апикално разположените водни канали аквапорин 2 се намират под влияние на антидиуретичния хормон (Agre и съавт. 1995; Knepper 1997). Интеркалатните клетки са представени от тип А и тип В (Alper и съавт. 1989; Brown и съавт. 1988; Hamm и съавт. 1991; Verlander и съавт. 1987; Wade и съавт. 1990).

Събирателните каналчета на външната медула се състоят от два клетъчни типа - главни, които имат сходна морфология с тези на кортикалното събирателно каналче и интеркалатни , подобни на описаните тип А клетки (Wade и съавт. 1990).

Събирателните каналчета на вътрешната медула се характеризират с клетки, които съдържат вазопресин-чувствителни водни канали, аквапорин 2, както и апикално разположени транспортери за урея (Hediger и съавт. 1996; Knepper 1997; Sands и съавт. 1996; Sands и съавт. 1987; Shayakul и Hediger 1996). Началната част на събирателното каналче, разположена във вътрешната медула, показва сходна морфология с това във вътрешната ивица на външната медула, но се наблюдава редуциране в броя на интеркалатните клетки (Clapp и съавт. 1987; Hansen и съавт. 1980).

Терминалната част на събирателното каналче достига до папилата и се подразделя на проксимален и дистален отдел (Isozaki и съавт. 1993; Clapp и съавт. 1987; Madsen и съавт. 1988). В началната си част клетките са кубични, с оскъдно количество органели, докато в дистална посока преминават в призматична форма. В този сегмент не се установяват интеркалатни клетки. Формираната урина попада в бъбречното легенче през area cribrosa разположена на върха на бъбречната папила, чиято външна повърхност е тапицирана от еднореден кубичен епител (Verlander 1998).

2. Произход и развитие на бъбреците

В процеса на нефрогенезата през пренаталния период се формират три структури - pronephros, mesonephros и metanephros, всяка от които произлиза от т.нар. мезонефричен хребет, който води началото си от междинната мезодерма. Pronephros и mesonephros са междинен етап от развитието на бъбреците, докато дефинитивния бъбрек се формира от metanephros (Kostić 1968; Popović 1988; Nikolić и съавт. 2004, Potter и Osathanondh 1966; Williams и съавт. 1995; Rana 1998; Nigam 1996; Duančić 1968).

Развитието на pronephros започва в края на третата седмица от преембрионалния период от първите пет краниални сегмента на мезонефричния гребен. В човешкия ембрион pronephros е представен от седем до десет клетъчни струпвания, които впоследствие придобиват везикуларна форма. Везикулите се удължават и формират тубули. Краищата на латералния тубул се удължават каудално като достигат най-близко разположения по – долу тубул и се свързват с него. По този начин се формира пронефричния канал, който се удължава каудално. В медиалния си край тубулите имат отвори (нефростоми), чрез които осъществяват комуникация с целомната кухина. Пронефричните тубули са къси, не са напълно диференцирани, не получават разклонения от аортата, така че гломерули не се формират. Регресията на пронефричните тубули започва много рано като краниално разположените тубули изчезват преди появата на каудалнте (Kostić 1968). След тяхното отпадане пронефричния канал също се подлага на обратно развитие, като в края на четвъртата седмица от ембрионалното развитие пронефросът почти напълно изчезва (Popović 1988).

Mesonephros се появява в началото на четвъртата седмица от ембрионалния период (Nikolić и съавт. 2004). Разполага се по протежение от шести краниален до трети лумбален сегмент на мезонефричния хребет и се характеризира със значително по-голяма и сложна структура, отколкото

предшестващия го pronephros. Формирането на mesonephros започва от клетъчни струпвания, произлизащи от мезонефричния хребет, каудално от pronephros. Преминавайки във везикуларна форма, формираните везикули се удължават и образуват тубули. Мезонефричният тубул (с S-образна форма) се състои от медиално разширен и вдлъбнат край – Бауманова капсула, с който влиза в контакт с аортни капиляри и се формират Малпигиевите телца. При свързването на проксималния и дисталния сегмент се формира мезонефричния канал, който е продължение на пронефричния канал. Мезонефричният канал се удължава каудално и извива вентрално като се отваря в клаоката. Счита се, че в mesonephros се образуват около 70-80 гломерули и тубули, но тяхното развитие не се осъществява в еднакъв времеви интервал. Във всеки mesonephros максималният брой на гломерулните тубулни единици (нефрони) през петата и шеста седмица от развитието наброява около 30 (Potter и Osathanondh 1966). Това е времето, в което mesonephros достига максимална дължина и представлява голям, овален, билатерален орган, лежащ върху задната стена на телесната кухина, от двете страни на срединната линия (Williams и съавт. 1995). Малпигиевите телца и извитите части на мезонефричните тубули се разполагат медиално, а мезонефричния (Волфов) събирателен канал латерално. Mesonephros, за разлика от pronephros, е значително по-голям, с повече извивки на тубулите и не е свързан с телесната кухина. Той изчезва в края на осмата седмица от пренаталното развитие. Дегенерацията на краниално разположените гломерули и тубули настъпва преди тази на каудално разположените. При женските фетуси няколко каудално разположени тубули остават като нефункциониращи структури (epoophoron и paroophoron), раположени в широките връзки на матката, докато мезонефричния канал изчезва напълно. При мъжките фетуси оставащите мезонефрични тубули формират еферентните канали на тестиса, ростралните и каудални аберантни канали и paradidymis, докато от мезонефричния канал се развиват каналчестите

системи на epididymis, ductus deferens, семенното мехурче и еякулаторния канал (Nikolić и съавт. 2004).

Metanephros започва развитието си в края на петата седмица от ембрионалния период и представлява крайния етап от нефрогенезата. Тази структура произлиза от евагинация на мезонефричния канал - уретерната пъпка, локално струпване на мезенхим, наречено метанефрична бластема, от която се формира бъбречната структура, както и от ангиогенезен мезенхим, мигриращ по-късно в метанефричната бластема и даващ началото на гломерулите и vasa recta (Williams и съавт. 1995). Уретерната луковица, от която се формира бъдещия уретер, се развива през втория месец от ембрионалния период от долната част на мезонефричния канал, която се намира в непосредствена близост до свързването му с клоаката (Čukuranović и Vlajković 2005). Уретерната луковица прораства дорзокраниално и прониква в метанефричната бластема със свободния си краниален край (Williams и съавт. 1995). По-нататъшното развитие на metanephros включва реципрочни индуктивни взаимодействия между уретерната луковица и метанефричната бластема. След проникването в метанефричната бластема, уретерната луковица се разполага в първичното бъбречно легенче, след което започва процес на дихотомно делене, което има за резултат образуване на чашките и събирателните канали (Rana 1998). Това е и моментът, в който метанефричната бластема се диференцира в два типа клетки – нефрогенни и клетки на стромата. От нефрогенните клетки се развиват нефроните като в начало на този процес, те са представени от струпвания, които преминават през везикулна форма, впоследствие придобиват формата на запетая и накрая след прогресивно удължаване се формира S-образна тубулна структура. Проксималният край на тази S-образна структура, заедно с капилярите, произлизащи от разположените в близост кръвоносни съдове, ще формират бъбречните телца, докато останалата част ще образува проксималните и дисталните тубули, както и примката на Хенле. Свързването на дисталните тубули със

събирателния канал, показва връзката между секреторната и екскреторна част на бъбрека. От клетките на стромата се развива бъбречната съединителната тъкан.

Образуването на нови нефроните приключва в периода между 28 и 36 гестационна седмица, така че техният брой е дефинитивен при раждането (Nigam 1996; Duančić 1968). При новороденото всеки бъбрек има около 1 милион нефрона в различна степен на развитие. Най- голям брой зрели нефрони са локализирани в съседство с медулата, докато диференцираността им намалява по посока повърхността на кортекса. Трябва да се отбележи, че структурното и функционалното им развитие продължава и след раждането (Čukuranović и Vlajković 2005).

Дефинитивните бъбреци започват развитието си в малкия таз, латерално от аортата. Те се придвижват в краниална посока, при което се изместват латерално, а хилусите им от вентрално се ротират медиално. Разположените в тазова позиция бъбреци се кръвоснабдяват от клонове на общата хълбочна артерия. С придвижването в краниална посока бъбречните артерии изхождат от съответстващи сегменти на аортата, докато повечето каудално разположени клонове отпадат. В около 25% от популацията може да наблюдават допълнителни бъбречни артерии (Sykes 1963). Най- интензивен растеж на бъбреците – трикратно нарастване на обема им, се наблюдава между 14 и 16 седмица от пренаталния период (Vlajković и съавт. 2005).

Редица изследвания подчертават връзката между нефрогенезата и развитието на бъбречна патология през постнаталния период. Счита се, че някои заболявания могат да бъдат в тясна връзка с процеси, настъпили през пренаталното развитие (Welham и съавт. 2002; Ingelfinger и Woods 2002). Така например конгениталният дефицит на нефрони може да бъде предиспозиция за развитието на артериална хипертония в по - късен етап от живота (Brenner и съавт. 1988).

3. Възрастово-зависими структурни изменения в бъбреците

Бъбреците се характеризират с редица възрастово-зависими структурни промени, които включват намаляване на бъбречната маса, артериална склероза и хиалиноза, гломерулосклероза, загуба на тубули и интерстициална фиброза. Етиопатогенезата на настъпващите морфологични промени не е напълно изяснена, но измененията са неспецифични и могат да бъдат наблюдавани при патологични състояния като захарен диабет и артериална хипертония (Pannarale и съавт. 2010).

Средната маса на бъбреците нараства от раждането до към четвъртото десетилетие от живота, достигайки 250-270 грама, след което прогресивно намалява с 10% за всяко следващо десетилетие (Zhou и съавт. 2008; Gourtsoyiannis и съавт. 1990; Long и съавт. 2005; Tauchi и съавт. 1971). Настъпващото понижение в теглото е съпроводено с редуциране на бъбречната субстанция, като кортексът се засяга в по- голяма степен от медулата (Gourtsoyiannis и съавт. 1990; Griffiths и съавт. 1976).

Възрастово обусловените съдови промени в бъбречната структура са сходни с тези наблюдавани в други органи и се представят с хипертрофия на tunica intima и tunica media, артериолосклероза, изявени атеросклеротични лезии (Hollenberg и съавт. 1974), както и хиалинна артериолосклероза (Pannarale и съавт. 2010).

Резултатите от постмортални ангиограми и хистологични изследвания показват изразени структурни изменения на прегломерулярните съдове, както и директни шънтове между аферентните и еферентните съдове. Задебелението на стените и стесняването на лумените на аферентните артериоли са в пряка зависимост с пролиферацията на съдовите гладкомускулни клетки (Davidson и съавт. 1969; Ljungqvist и Lagergren 1962; Long и съавт. 2005). По хода на интерлобуларните артерии се наблюдава фибро-интимна хиперплазия (Hollenberg и съавт. 1974), която може да се развие и при патологични състояния като хронична хипертония (Bolignano и съавт. 2014).

Гломерулогенезата е процес, зависещ от фактори като раса, пол, тегло при раждането (Bolignano и съавт. 2014), като броят на гломерулите в бъбрека варира от 330,000 до 1,100,000 (Nyengaard и Bendtsen 1992). С напредване на възрастта броят на функционално годните гломерули намалява (Ноу и съавт. 2003; Nyengaard и Bendtsen 1992), докато хиалинизираните и склерозирали гломерули се увеличават (Kaplan и съавт. 1975; Kappel и Olsen 1980; McLachlan и съавт. 1977; Rule и съавт. 2010). Според Smith и съавтори (1989), процентът на „нормално“ склерозиралите гломерули след четиридесетгодишна възраст може да бъде определен по формулата (възраст/2)-10. Описват се още фокална сегментна гломерулосклероза, склерозирали гломерули с шънтове между аферентната и еферентна артериоли, увеличаване на мезангиалния матрикс и задебеляване на гломерулярната базална мембрана. Прогресивното намаляване на размера на интактните кортикални гломерули, води до компенсаторна хипертрофия на юкстамедуларните гломерули (Silva 2005).

Човешките подоцити не могат да осъществяват клетъчно делене, затова броя на тези клетки намалява с възрастта. При възрастни плъхове подоцитите претърпяват хипертрофия, която преминава в апоптоза и подоцитопения, имащи за резултат развитието на гломерулосклероза (Wharram и съавт. 2005; Wiggins и съавт. 2005).

Тубулоинтерстициалните изменения морфологично включват атрофия на тубулите със задебеляване на базалната им мембрана, дилатация на лумените с натрупване на еозинофилна хиалинна материя, а тубулните епителни клетки придобиват плоска форма (Martin и Sheaff 2007). Описват се още намаление в броя, обема и дължината на тубулите, както и увеличен брой на т.нар. тубулни дивертикули. В дисталните и събирателните каналчета дивертикулите могат да доведат до развитието на прости кисти, наблюдавани често с напредване на възрастта. Установява се развитието на повсеместна интерстициална фиброза (Pannarale и съавт. 2010).

4. Морфологични промени в бъбреците, вследствие на артериална хипертония

През 1836 година Ричард Брайт описва връзката между артериалната хипертония и бъбречната увреда (Bright 1836). Възприеманото схващането, че бъбреците участват единствено в етиологията на високото кръвно налягане, впоследствие се разширява с откритието, че са и таргетен орган от действието на артериалната хипертония (Mountokalakis 1997).

Настъпващите промени в бъбреците, вследствие на малигнена артериална хипертония се обобщават с термина малигнена артериоларна нефросклероза и морфологично включват изразена пролиферация на гладкомускулни клетки в tunica intima на интерлобарните и малките артерии, чиито вид се описва като „ципа на лук“; фибриноидна некроза на гладкомускулни клетки в малките артерии и артериоли, обхващаща включително аферентните артериоли и води до развитието на фокална гломерулна увреда (Goldblatt и съавт. 1989).

При бенигнената артериална хипертония се описва т.нар. бенигнена артериоларна нефросклероза, която включва сбръчкване, хипоцелуларност и склероза на гломерулите; атрофия на тубулни клетки и значителни интерстициални изменения. Типично се наблюдава задебеляване на tunica intima, зависещо от калибъра на съдовете. Така например, по хода на аркуатните артерии то може да се дължи на отлагането на хиалин или екстрацелуларен протеин, докато в по-малките интерлобуларни артерии на гладкомускулна пролиферация. Наблюдава се още удвояване на lamina elastica interna на аркуатните и интерлобуларни артерии. Най-специфичната находка е хиалиноза на аферентните артериоли, с дегенерация на вътрешната еластична и базална мембрани, както и фибриноидна некроза, обхващаща целия съд (Goldblatt и съавт. 1989).

Съществуват различни експериментални модели на артериална хипертония, чрез които може да се изучават етиопатогенезата и

последиците от действието на високото кръвно налягане върху различните органи и системи.

Редица изследвания подчертават по-тежкото засягане на бъбречната струкура при SHR в сравнение с контролни Wistar плъхове. Към главните морфологични изменения се отнасят сегментна и глобална гломерулосклероза, артериоартериоларна склероза с възпалителна клетъчна инфилтрация. Към тубулоинтерстициалните изменения се описват атрофия и дилатация на тубулни сегменти, изразена интерстициална фиброза. По хода на интерлобуларните артерии се наблюдава значително задебеление в областта на tunica intima и tunica media, с пролиферация на гладкомускулни клетки. В аферентните артериоли се описват хиалиноза и периартериална фиброза с лимфоцитна инфилтрация (Komatsu и съавт. 1995).

5. Азотен оксид (NO) и азотен оксид-синтаза (Nitric oxide synthase, NOS)

5.1. Роля на азотния оксид и механизъм на синтез

Терминът азотен оксид (NO) е въведен от Джозеф Пристли, който през 1772 година го означава като „азотист газ‘‘ (Omer и съавт. 2012). Разглеждан е като токсично вещество и замърсител на въздуха до края на осемдесетте години (Schairer и съавт. 2012).

През 1980 година, Furchgott и Zawadski откриват произлизащ от ендотела релаксиращ фактор, който впоследствие се установява,че е газообразната молекула NO. Това откритие дава началото на редица проучвания, имащи за цел изясняване фунциите на NO, като през 1998 година Furchgott, Ignarro и Murad получават Нобеловата награда в областта на Физиологията или Медицината за откритията им относно NO като сигнална молекула в сърдечно – съдовата система (Sasser 2015).

Реактивността на NO се определя от физичните му свойства, които включват малък молекулен размер, голяма дифузионна способност и липофилност (Hughes 2008). Взаимодейства с желязо хем протеини като разтворима гуанилат циклаза (рГЦ), оксихемоглобин/хемоглобин и цитохром с оксидаза. Реакцията му със супероксидни анионни радикали има изразено патофизиологично действие (Toledo и Augusto 2012).

Обусловените от действието на NO ефекти в отделните органи и системи трудно могат да бъдат обобщени, а още по-малко унифицирани.

Като паракринен фактор NO е включен в редица физиологични процеси като контрол на съдовия тонус; регулация на клетъчния цикъл, инхибиране на съдовата гладкомускулна пролиферация и апоптоза на ендотелните клетки; антитромботично действие; участва в невротрансмисията (Sasser 2015); оказва влияние върху различни структури на нервната система (Dzambazova и съавт. 2011 а и б; Hinova-Palova и съавт. 2014); имунната система и процесите на възпаление (Georgiev 2015; Landzhov и съавт.

2012); кожа (Bocheva и съавт. 2012); миокард (Iliev и съавт. 2016). NO има цитопротективен ефект, но при висока концентрация е включен в ангиогенезата и развитието на туморните заболявания (Weigert и Brüne 2008; Paradise и съавт. 2010). Намалената бионаличност на NO води до развитие и прогресиране на сърдечно-съдови заболявания (Naseem 2005).

В бъбреците NO е важен регулатор на бъбречната хемодинамика, тубулогломерулярната обратна връзка (ТГОВ), натриевата хомеостаза, обусловената от кръвното налягане натриуреза, както и в процесите на развитие на бъбречна фиброза и увреда. Произлизащият от бъбреците NO участва в контрола на бъбречната функция чрез механизми, включващи повишаване на бъбречния кръвоток, инхибиране на натриевия транспорт по хода на нефрона, повлияване на секрецията на ренин. Нарушения, свързани с медиираната от NO сигнализация, са свързани с развитието на бъбречна увреда, както и на заболявания, засягащи вторично бъбреците като артериална хипертония, захарен диабет, исхемия и септичен шок (Sasser 2015).

В бозайниците синтезата на NO се осъществява под действието на каталитичната активност на групата ензими азотен оксид-синтаза (NOS) (Förstermann и Sessa 2012). Установени са три изоформи на NOS. Към тях се отнасят невронална изоформа на NOS (nNOS), известна още като тип 1 (NOS1), изолирана за първи път в нервна тъкан; индуцирана изоформа на NOS (iNOS), означавана още като тип 2 (NOS2); ендотелна изоформа на NOS (eNOS), известна още като тип 3 (NOS3), установена за първи път в ендотелни клетки. Описаните изоформи могат да се подразделят на конститутивни, към които се отнасят nNOS и eNOS и индуцибилни – iNOS, както и на калций-зависими nNOS и eNOS и калций- независими – iNOS (Alderton и съавт. 2001).

Всички изоформи съдържат хем и се свързват с калмодулин като използват L-аргинин и молекулен кислород като субстрат, а като кофактори редуциран никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат (НАДФ),

флавин аденин динуклеотид (ФАД), флавин мононуклеотид (ФМН) и тетрахидробиоптерин (BH4).

По отношение на структурата си и трите изоформи на NOS представляват хомодимери (Förstermann и Sessa 2011). Мономерите на NOS не са в състояние да катализират продукцията на NO, защото не могат да се свързват с кофактора BH4, както и с L- аргинин. Функционален димер се формира в присъсвието на хем (Klatt и съавт. 1996; List и съавт. 1997), тъй като е необходим за трансдоменния пренос на електрони от флавиновите редуктази до хема на другия мономер (Abu-Soud и Stuehr 1993; Brunner и съавт. 1998). Функционално активната NOS пренася електрони от НАДФ през флавиновите редуктази ФАД и ФМН в карбокси-терминалния редуктазен домен до хем в амино-терминалния оксигеназен домен. Оксигеназният домен свързва кофактора BH4, молекулния кислород и L-аргинин (Crane и съавт. 1998; Alderton и съавт. 2001). Изоформите на NOS осъществяват двустъпален процес на окисление, който включва образуването на N-хидкрокси-L-аргинин и последващото му окисление до NO (Stuehr и съавт. 2001) като вторичен продукт от синтезата на NO се образува L- цитрулин (Ruiz и съавт. 1999).

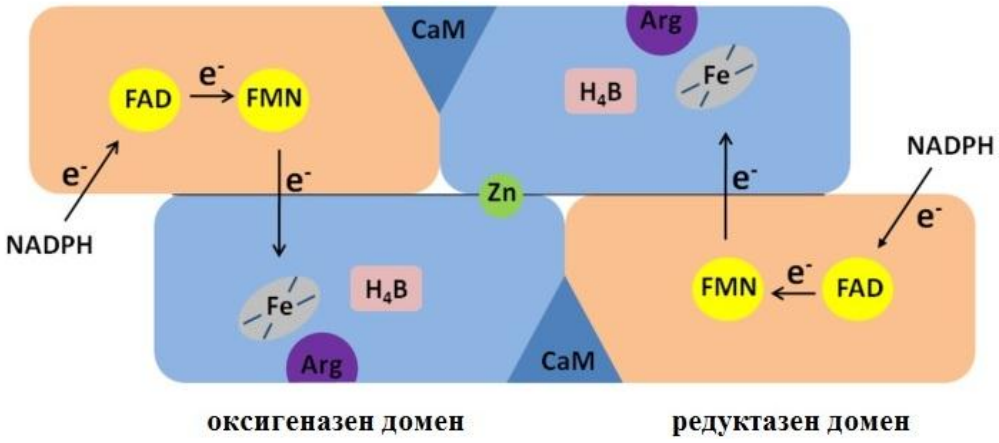


Схема 1. Димерна структура на NOS (по Fischmann и съавт. 1999)

5.2. Експресия на изоформите на NOS в бъбреците

Описаните изоформи на NOS- nNOS, eNOS и iNOS се кодират от различни гени, с различна локализация, регулация, каталитична активност и чувствителност към инхибитори, с 51-57% хомоложност в човешката популация (Alderton и съавт. 2001).

Генът на nNOS е локализиран в късото рамо на 12 хромозома (Kishimoto и съавт. 1992) и се състои от 29 екзона. Инициращият кодон е локализиран в екзон 2, а терминиращия кодон – в екзон 29 (Mount и Power 2006). Генният продукт е протеин с молекулна маса 160 кDA и се означава като nNOS α. Описани са няколко варианта на nNOS като nNOSβ (136 kDa) и nNOSγ (125 kDa) (Huang и съавт. 1993).

Установена е експресия и на трите изоформи на NOS в бъбреците като NO може да бъде синтезиран от конститутивно представени ензими в клетките, както и след имунно стимулиране (Fernández и съавт. 2003). eNOS е представена главно в съдовия ендотел, клетките на дебелото възходящо рамо на примката на Хенле, събирателните каналчета, докато nNOS се експресира в macula densa, капсулата на Бауман, в част от клетките на кортикалното дебело възходящо рамо на примката на Хенле и събирателните каналчета, еферентните артериоли (Lee 2008; Ollerstam и съавт. 2002). nNOS е представена в мембраната на малки везикули, както и в цитозола и клетъчната мембрана на клетките на macula densa (Wilcox и съавт. 1992; Tojo и съавт. 1994;). N- терминалния участък на ензима е прикрепен към цитоскелетния протеин PSD-93, който се екпресира в базолатералната част на клетъчната мембрана (Tojo и съавт. 1999).

iNOS не се установява при физиологични условия, но може да бъде индуцирана de novo при експериментални и патологични състояния (Choi и съавт. 2012). Локализацията на iNOS не е ясно установена (Sharma 2004). Функционални изследвания потвърждават експресията й в клетките на проксималните тубулни сегменти, докато in vitro изследвания демонстрират наличието на iNOS в гломерулярните мезангиални клетки и

в клетките на вътрешните медуларни събирателни каналчета (Mohaupt и съавт. 1994).

5.3. Ефекти от действието на NO в бъбреците

NO има съществена роля в регулацията на редица бъбречни функции като контрол на бъбречния кръвоток, поддържане на гломерулната и медуларната хемодинамика, повлиява обусловената от кръвното налягане натриуреза, отслабване на ТГОВ, инхибиране на тубулната Na^+ реабсорбция, повлияване на симпатиковата нервна активност. Крайният ефект от действието на NO в бъбрека е стимулиране на натриурезата и диурезата (Ren и съавт. 2000; Ito и Ren 1993).

NO има изразен модулиращ ефект върху съдовия тонус на бъбречните кръвоносни съдове. Изследвания, използващи инхибитори на NOS – аналози на L-аргинин като nitro-L-arginine (NLA) и N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), водят до увеличение на реналната съдовата резистентност с 50% и намаляване на бъбречния кръвоток с 25%. Уместно е да се отбележи, че NO има водеща роля в регулацията на медуларния кръвоток като по този начин повлиява натриевия баланс и кръвното налягане. Директната инфузия на инхибитор на NOS L-NAME в бъбречната медула води до понижаване на медуларния кръвоток с 40 %, без промяна в кортикалния кръвоток. Прилагането на L-NAME в бъбречната медула за 5 дни води до натриева задръжка и артериална хипертония, като този ефект се наблюдава и при хронично интравенозно приложение на L-NAME в ниски дози (Tojo и съавт. 2006).

Обусловената от кръвното налягане натриуреза е важен регулаторен механизъм, който способства за поддържането на нормално кръвно налягане и натриев баланс в организма. Той се намира под влиянието на NO и се изразява с нарастваща натриуреза при повишаване на артериалното налягане.

Установено е, че NO повлиява и/или медиира ефектите на симпатиковата инервация на бъбреците. Така например той отслабва

обусловената от симпатиковата активност вазоконстрикция в изолиран перфузиран бъбрек от плъх. От друга страна NO способства за повишената проксимална тубулна натриева реабсорбция, вследствие на симпатикова стимулация. Известно е, че NO има натриуретичен ефект, но това е рядък пример, в който NO води до повишена натриева реабсорбция в бъбрека (Tojo и съавт. 2006).

Дискутабилен е въпроса относно влиянието на NO върху секрецията на ренин. Използването на селективен инхибитор на nNOS 7-Nitroindazole (7-NI) не води до промяна в секрецията на ренин (Beierwaltes 1994). Други автори установяват, че NO може както да стимулира, така и да инхибира секрецията на ренин (He и съавт. 1995), като синтезирания от eNOS NO инхибира, а полученият от nNOS в клетките на macula densa NO стимулира секрецията на ренин (Thorup и Persson 1996).

Изследвания, изучаващи връзката между NOS и ренин-ангиотензиновата система при мишки с липсващ ген за nNOS, установяват понижена плазмена ренинова активност (Paliege и съавт. 2004). Оказва се солевия прием има съществено значение за активността на nNOS и продукцията на ренин (Wilcox и съавт. 1998). Така бедната на сол диета увеличава експресията на nNOS и стимулира продукцията на ренин, докато високият солеви прием е с противоположен ефект. Нарастващата активност на nNOS се съпътства от увеличена плазмената ренинова активност, което показва, че продуцирания от nNOS от клетките на macula densa NO стимулира образуването на ренин (Tojo и съавт. 2006). Противоречиви са данните относно влиянието на eNOS върху плазмената ренинова активност при изследвания върху мишки с липсващ ген за eNOS (Wagner и съавт. 2000; Shesely и съавт. 1996), но участието на eNOS в продукцията на ренин е безспорно (Tojo и съавт. 2006).

NO е включен в регулацията на ТГОВ, която има важно значение за поддържането на гломерулната филтрационна честота (Briggs и Schnermann 1996). ТГОВ се осъществява с участието на ЮГА, по-точно с

клетките на macula densa, като определя тонуса на аферентната артериола (Ren и съавт. 2001).

Този авторегулаторен механизъм се изразява в това, че при намалена реабсорбция в проксималните отдели на нефрона или увеличена гломерулна филтрация, тубулният воден и солеви товар към macula densa се увеличава. Това води до увеличаване концентрацията на Cl^- и Na^+ в тубулната течност, което се регистрира от клетките на macula densa и стимулира секрецията на ренин. Образуваният ангиотензин II предизвиква вазоконстрикция предимно на аферентната артериола и гломерулната филтрация намалява поради намаленото хидростатичното налягане в гломерулните капиляри (Витанова и Гърчев 2008).

Много хормони и локални фактори като простагландини, ангиотензин II, тромбоксан и други могат да повлияват чувствителността на ТГОБ (Franco и съавт. 1988; Boberg и съавт. 1985). Вазоконстриктори като ангиотензин я усилват, докато вазодилататори като атриален натриуретичен фактор я подтискат (Ren и съавт. 2000). Дилатиращ ефект по отношение на аферентната артериола имат NO произлизащ от nNOS в macula densa, eNOS в ендотела на гломерулите и артериолите, iNOS в гладкомускулните клетки на аферентната артериола. При обемно обременяване чувствителността на ТГОВ се намалява (Persson и съавт. 1979) като това позволява преминаването на по-голям поток през клетките на macula densa без да настъпва вазоконстрикция на гломеруларните артериоли и ограничаване на гломерулната филтрация (Brown и съавт. 2003).

Продуцираният от nNOS NO в клетките на macula densa отслабва обусловената от ТГОВ вазоконстрикция на аферентната артериола (Ren и съавт. 2001). Тази молекула има кратък полуживот и разстоянието, което изминава чрез дифузия от macula densa до аферентната артериола е в порядъка на 100-200 μm (Lancaster 1994). Съществуват няколко хипотези относно механизма на действие на NO образуван от nNOS в macula densa:

1. NO може да изпълнява ролята на автакоид и да повлиява клетките на macula densa;

2. NO може да въздейства върху юкстагломерулярните мезангиални клетки, които опосредстват предаването на сигнали от macula densa до аферентната артериола;

3. чрез процеса на дифузия NO да достига до аферентната артериола и да предизвиква дилатацията й (Ren и съавт. 2000).

NO осъществява действието си посредством редица вторични посредници, като голяма част от ефектите му се медиират от цикличен гуанозинмонофосфат (цГМФ) (Biondi и Romero 1990). NO стимулира образуването на цГМФ не само в съдовете, но и в бъбречните тубули, вкл. проксималния тубул, дебелото възходящо рамо на примката на Хенле и събирателния канал (Siragy и съавт. 1992; Berkelmans и съавт. 1991; Heuzé-Joubert и съавт. 1992; Roczniak и Burns 1996).

За да се разбере механизма на действие на NO трябва да се установи мястото на активиране на разтворимата гуанилат циклаза (рГЦ). Подтиснатата активност на рГЦ в клетките на macula densa чрез използването на инхибитор води до усилване на ТГОВ, но не повлиява ендотел-зависимата релаксация на аферентната артериолата, обусловена от ацетилхолин (Ren и съавт. 2000). Наблюдаваният ефект не може да бъде обяснен с дифузия на инхибитора до аферентната артериола и/или мезангиалните клетки, защото при инхибиране на рГЦ в тези структури не се установяват промени в ТГОВ (Ren и съавт. 2000).

От друга страна перфузирането на macula densa с дибутирил цГМФ с цел повишаване нивото на цГМФ в този сегмент на нефрона води до притъпяване на ТГОВ, без да дилатира контрахираните от норепинефрин аферентни артериоли. Следователно, NO отслабва ТГОВ, действайки по-скоро като автокоид в клетките на macula densa, отколкото да дифундира до аферентната артериола (Ren и съавт. 2000).

Продуцираният в аферентната артериола NO би трябвало също да подтиска ТГОВ, но директното прилагане на инхибитор на рГЦ в аферентната артериола и мезангиалните клетки, не повлиява този авторегулаторен механизъм. Това дава основание да се предположи, че образуваният от ендотелните клетки NO няма съществено влияние върху ТГОВ (Ren и съавт. 2000).

Използването на селективен инхибитор на nNOS (7-NI) или на рГЦ при увеличено ниво на цГМФ в macula densa води до дилатиране на аферентната артериола (Ren и съавт. 2000).

Прилагането на инхибитор на рГЦ в macula densa, последвано от въвеждане на инхибитор на nNOS не предизвиква промяна в диаметъра на аферентната артериола. Следователно NO медиира ефектите си посредством цГМФ (Ren и съавт. 2000). Счита се, че NO стимулира рГЦ в macula densa и увеличава нивото на цГМФ, който активира цГМФ-зависима протеин киназа включена в процес с все още неизяснен механизъм, който повлиява ТГОВ (Ren и съавт. 2000).

Установено е, че при дълготрайната регулация на ТГОВ, бедната на сол диета, увеличава експресията на nNOS в macula densa и стимулира образуването на ренин. Полученият NO има вазодилатиращ ефект върху аферентната артериола, с което регулира гломерулната филтрационна честота (Ren и съавт. 2001).

При краткотрайната регулация на ТГОВ, микроперфузията с високо солево съдържание на macula densa, води до увеличена продукция на NO от nNOS, която е установена чрез флуоресцентен метод (Liu и съавт. 2002). Сигналът за висока солева концентрация се регистрира от апикално разположения $Na^+/K^+/Cl^-$ - котранспортер на клетките на macula densa и води до вазоконстрикция на аферентните артериоли посредством аденозин и АТФ с последващо редуциране на гломерулното капилярно налягане. Полученият от nNOS NO вероятно противодейства на настъпващата вазоконстрикция, явявайки се по този начин модулатор на ТГОВ (фиг. 2).

Прилаганият солеви прием върху експресията на nNOS и освобождаването на NO има противоположно действие при краткотрайната и дълготрайна регулация на ТГОВ, но все още не са напълно изяснени механизмите на регулация на nNOS в macula densa (Tojo и съавт. 2006).

Изследване, проследяващо последиците от селективното инхибиране на nNOS с 7-NI върху кръвното налягане, гломерулната филтрационна честота и ТГОВ в плъхове показва, че острото приложение на 7-NI не води до промяна в кръвното налягане, но сенсибилизира ТГОВ. След едноседмичен прием на 7-NI се регистрира повишаване на кръвното налягане в сравнение с контролите, както и на ТГОВ. Прилагането на 7-NI за 4 седмици води до още по- значимо повишение на кръвно налягане, отколкото в контролите. Тези резултати дават основание да се предположи, че нарушеният синтез на NO може да има съществено значение за развитието на артериална хипертония (Ollerstam и съавт. 1997).

Не се изключва възможността за участие на други изоформи на NOS в регулацията на ТГОВ при хронично инхибиране на nNOS (Ollerstam и съавт. 1997). При нормални условия iNOS няма регулаторна функция (Thorup и Persson 1996), но това не може да бъде изключено при хипертония. От друга страна, продукцията на NO от eNOS може да бъде стимулирана от стрес, предизвикан от ТГОВ вазоконстрикция (Rubanyi и съавт. 1986; Buga и съавт. 1991; Juncos и съавт. 1996).

Прилагането на неселективен инхибитор на NOS води до блокиране синтезата на NO, от която и да е от трите изоформи на ензима. Измерването на артериоларния диаметър в изолиран юкстамедуларен нефрон показва намален артериоларен отговор при по- високо бъбречно перфузионно налягане. Това предполага наличието на втори вазодилататор на бъбречните артериоли (Bouriquet и Casellas 1995).

Редица автори изучаващи развитието на артериална хипертония при SHR установяват първично повишена активност на ТГОВ, водеща до

намалена гломерулна филтрационна честота. Това има за резултат задръжка на вода и соли и повишаване на кръвното налягане (Daniels и съавт. 1990; Boberg и Perrson 1986).

При SHR се описва повишена експресия на nNOS в macula densa, заедно с НАДФН-оксидазата (Tojo и съавт. 2006). НАДФН-оксидазата образува супероксидни аниони, които взаимодействаики с NO водят до намалената му бионаличност поради получаването на пероксинитрат (Chabrashvili и съавт. 2002; Welch и съавт. 2000; Tojo и съавт. 2006). Оттук следва, че балансът между супероксида и NO определя бионаличността на NO и експресията на nNOS (Tojo и съавт. 2006).

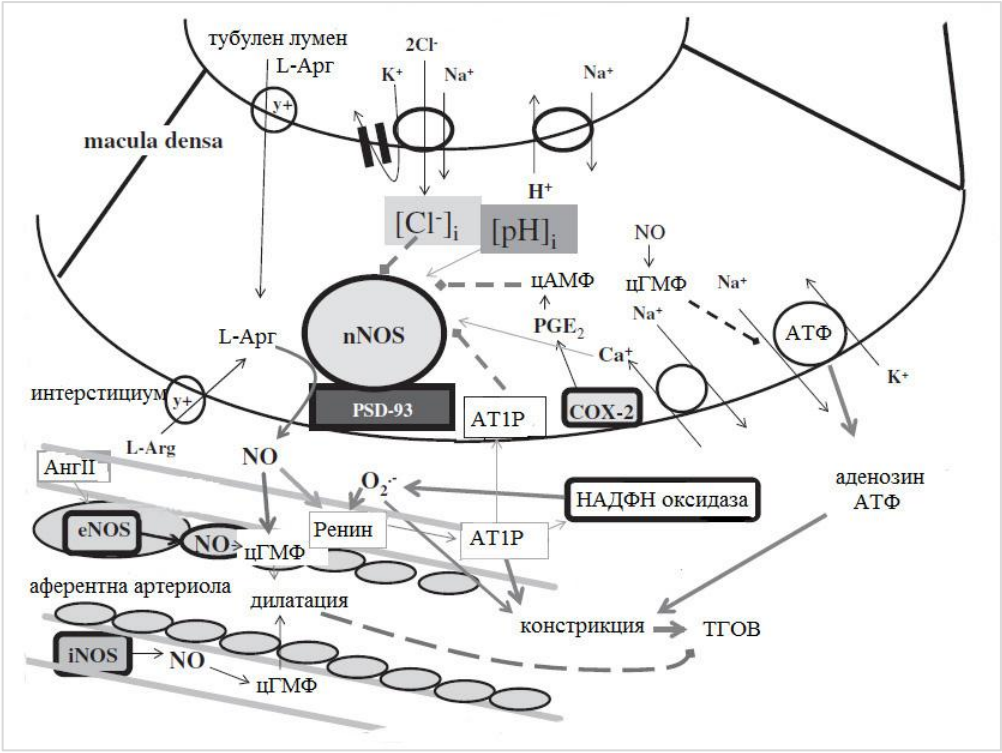


Схема 2. Регулация на ТГОВ от nNOS, eNOS, НАДФН- оксидаза, ренин-ангиотензиновата система и взаимодействието им в ЮГА (по Tojo и съавт., 2006).

Редуцирането на супероксидните аниони чрез прилагането на миметик на супероксид дисмутазата има изразен вазодилатиращ ефект върху аферентните артериоли при SHR, като този ефект не се наблюдава при Wistar плъхове. Предполага се, че супероксидните аниони допринасят за вазоконстрикцията на аферентните артериоли при SHR (Ichihara и съавт.

2001). Освен това се счита, че НАДФН-оксидазата и бъбречната ренин-ангиотензинова система са важни фактори при развитието на артериална хипертония (фиг.2) (Tojo и съавт. 2006).

5.4. Регулация на експресията на nNOS

Експресията на nNOS зависи от редица фактори като солеви прием, вътреклетъчно pH, ангиотензин II и други (Tojo и съавт. 2006).

Промяната в солевия прием повлиява в най-голяма степен експресията на nNOS в macula densa, но данните относно началото на настъпващите промени в продукцията на NO са оскъдни. Така например, богатата на сол диета при плъхове за две седмици води до повишени серумна концентрация и екскреция с урината на метаболитни продукти на NO – NO^-_2 и NO^-_3, докато в други изследвания се наблюдава повишена продукция на NO след еднодневен солеви режим (Mount и Power 2006).

Твърде противоречиви са резултатите целящи да представят изменението в експресията на nNOS в клетките на macula densa (Mount и Power 2006). В част от изследванията се установява, че прилагането на бедна на сол диета води до повишена експресия на nNOS в клетките на macula densa (Tojo и съавт. 2000; Singh и съавт. 1996), докато повишеният солеви прием е свързан с намалена експресия на nNOS (Mount и Power 2006). Според други автори се установява обратна зависимост между солевия прием и промените в експресията на nNOS (Mount и Power 2006).

Повишената продукция на NO може да бъде в резултат на промени на транскрипционно и/или транслационно ниво. Посттранслационните механизми са водещи при въздействието на остри стимули, изискващи бързи промени в синтезата на NO за секунди или минути. При условия, изискващи по-дълготрайни промени в продукцията на NO водещо значение имат измененията в активността на NOS (Mount и Power 2006).

Други механизми, които могат да регулират действието на NO в бъбреците включват повишена чувствителност в сигнализацията на NO,

както и промени водещи до оксидативен стрес в бъбреците (Mount и Power 2006).

Уместно е да се отбележи, че някои автори описват положителна корелация между експресията на NOS и образуването на ренин в грануларните клетки на ЮГА (Singh и съавт. 1996; Kihara и съавт. 1998).

В бъбречната медула активността на NOS се стимулира от вазоконстриктори като ангионтезин II, норадреналин и вазопресин. Прилагането на ангиотензин II и норадреналин в субпресорни дози води до нарастване на медуларната продукция на NO съответно с 150% и 43 %. Въвеждането на високи дози от гореописаните вазоконстриктори при животни третирани с L-NAME води до хипертония.

Образуването на NO от nNOS е pH – зависим процес като повишението в pH води до нарастване активността на NOS(Wilcox 2000; Gorren и съавт. 1998; Yaqoob и съавт. 1996), която е най-изразена при pH 8 (Wilcox 2000).

III. 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.

IV. Материали 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 неколкократно 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 ^{o}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^{o}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 (ъгъла 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 (Перйодна 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 ^{o}C и се филтрира. Добавят се 20мл 1N разтвор на NaCl и се охлажда до 25 ^{o}C , след което се добавя 1г натриев метабисулфит или калиев метабисулфит и се оставя на тъмно и хладно място. На 18-24 час се прибаввят 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 ^{o}C. Готовият реактив на Шиф е безцветен или има светложълт цвят. Почервеняването 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. Перйодатен разтвор – 1г калиев перйодат или 2,5г натриев перйодат 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 срезовете да не са по-дебели от 5-7 μm.

1. Срезовете се депарафинират и довеждат до вода.
2. Пренасят се в разтвор на йодна киселина за 5-10 мин. или в перйодазен 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 сериста 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.6; 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.
- Приготвените слайдове бяха инкубирани за 2 часа на 50^{o}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:

- Пермеабилизиране 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.
- Пермеабилизиране 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 pH 7,4-7,6;
3. Фиксация с 1% OsO_4 за 60 минути;
4. Промиване с 0,1 М фосфатен буфер с pH 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 за20 минути при 56^{o}C;
9. Включване в Durcupan;
10. Полимеризация за 48 часа при 56^{o}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 Nicon 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 подбирани 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 спази 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.

- Анализираните морфометрични показатели на кортикални и юкстамедуларни нефрони през различни периоди от постналталното 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.

V. Собствени резултати

1. Обосновка за използваните хистологични, хистохимични и имунохистохимични техники при изготвяне на препарати от бъбрек на плъх

Използването на рутинното оцветяване с хематоксилин и еозин (ХЕ) демонстрира ясно морфологията на бъбречната структура. При надлъжни и напречни срези преминаващи през хилуса на бъбрека ясно се разграничават двете части на бъбречния паренхим – кора и сърцевина. Отчетливо се наблюдават разположените в кората бъбречни телца, които в зависимост от разположението си могат да определят съответните нефрони като кортикални – в близост до фиброзната капсула на бъбрека, междинни и юкстамедуларни – локализирани дълбоко в бъбречната кора. Поради видово специфичната особеност, че бъбрекът на плъха е унипапиларен, сърцевината е представена само от една бъбречна пирамида. Наблюдават се напречни сечения на проксимални, дистални, събирателни тубулни сегменти, които са разположени в съответни части на кората, външната и вътрешна сърцевина.

Оцветяването с ХЕ отразява демонстративно морфологичната организация на нефроните. Ясно се разграничават основните структурни елементи на бъбречните телца – съдовия и тубулния им полюси, лумените на гломерулното капилярно клъбце. Баумановата капсула се характеризира с париетален лист, изграден от еднослоен плосък епител, но използваното максимално увеличение при светлинномикроскопския анализ на хистологичните препарати не позволява ясното разграничаването на подоцитите, изграждащи висцералния й лист. Ясно се демонстрира заграждащото се между двата листа Бауманово пространство. Трудно могат да се разграничат мезангиалните клетки представляващи морфологичен субстрат на бъбречния мезангиум, както и ендотелните клетки на гломерулните капиляри. По протежение на бъбречния паренхим могат да бъдат наблюдавани най-често напречни сечения на тубули

принадлежащи към различни части на нефроните: проксимални тубули, чиито лумени не се виждат ясно поради изразената микровилозност на кубичния епител, който ги тапицира; дистални тубули с кубичен епител с къси апикални мембранни микропроекции, което позволява отчетливото наблюдение на лумените им. Тубулните епителни клетки се характеризират с хомогенна еозинофилна цитоплазма и централно разположено базофилно сферично ядро. В зависимост от мястото на преминаване на срезите през бъбречния паренхим, на някои хистологични препарати ясно се демонстрира т.нар. ЮГА. Тази структура е разположена в съседство с гломерула на съответния нефрон и е представена от аферентната и еферентната артериоли, macula densa на дисталното извито каналче и екстрагломеруларни мезангиални клетки. Освен това може да бъде наблюдавана и оценена морфологията на различни по калибър интраренални кръвоносни съдове, което да послужи за изготвянето на качествен сравнителен анализ на съдовите изменения при различните възрастови групи нормотензивни и спонтанно хипертензивни животни.

Трихромното оцветяване по Малори е метод, който позволява да се направи детайлна оценка на съединително-тъканните изменения в бъбречната структура. Чрез това специфично оцветяване ясно се демонстрират колагенните и ретикуларни влакна, които се оцветяват в тъмносин цвят по протежение на бъбречния интерстициум, обграждайки бъбречните телца и тубулите, докато епителните клетки се оцветяват в светло до тъмнокафяв цвят с оранжев оттенък. Освен това този метод позволява да се направи още по-детайлен анализ на съдовите изменения в бъбрека. Това включва, както настъпващите структурни промени в съдовата стена и гломерулните капилярни клъбца, така и оценка на развитието на перигломеруларна и периваскуларна фиброза по хода на различни по калибър кръвоносни съдове. Това е предпоставка оцветяването по Малори да послужи за изготвянето на задълбочена сравнителна оценка и анализ на промените в структурата на бъбреците при

отделните възрастови групи плъхове, като се съпоставят възрастовите изменения с тези предизвикани от артериална хипертония.

За разлика от рутинното оцветяване с ХЕ, използването PAS (перйодна киселина, реактив на Шиф) реакция позволява да се направи още по-детайлна оценка на настъпващите морфологични промени по хода на нефроните. Този хистохимичен метод дава възможност да се направи качествена светлинномикроскопска характеристика на базалните мембрани на бъбречните телца и тубули, както и да установи патологичното натруване на PAS-позитивен материал в гломерулите, който се демонстрира с пурпурно оцветяване. Това позволява PAS-реакция да представи детайлен сравнителен анализ и оценка на промените в структурата на бъбреците при отделните възрастови групи плъхове, като се съпоставят възрастовите изменения с тези предизвикани от артериална хипертония.

Експресията на nNOS в отделни сегменти на нефрона – macula densa, капсула на Бауман, епителни клетки на тубулни сегменти по хода на кората и сърцевината, е демонстрирана чрез имунохистохимичен метод с първично моноклонално анти-nNOS антитяло и авидин-биотин комплекс. Проведеното изследване показва изразена хетерогенност в активността на ензима в различни части на бъбречния паренхим- липса на оцветяване, едва доловимо оцветяване, умерено положително оцветяване до силно положително оцветяване. Достоверността на проведеното имунохистохимично изследване е потвърдена чрез направените положителни и отрицателни контроли. Различията в експресията на nNOS може да послужи за задълбочен сравнителен качествен анализ на промяната в активността на ензима в отделните възрастови периоди и групи плъхове.

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

Настъпващите през постналталното развитие морфологични промени в структурата на бъбрек бяха проследени при нормотензивни Wistar плъхове и SHR. По литературни данни нефрогенезата у плъх завършва едва към средата на първия месец след раждането (Seely, 2017), което свидетелства за по-късното достигане на хистологична зрялост на бъбречния паренхим при тези животни. Поради тази причина в настоящия труд не са включени плъхове в предпубертетен и ранен следпубертетен период. За описанието на бъбречната морфология при млади и зрели животни бяха изследвани съответно четири и шестмесечни плъхове. Това позволи да се проследят в динамика настъпващите изменения по хода на нефроните, както и да се оценят промените в бъбречния интерстициум и съдове в тези два възрастови периода.

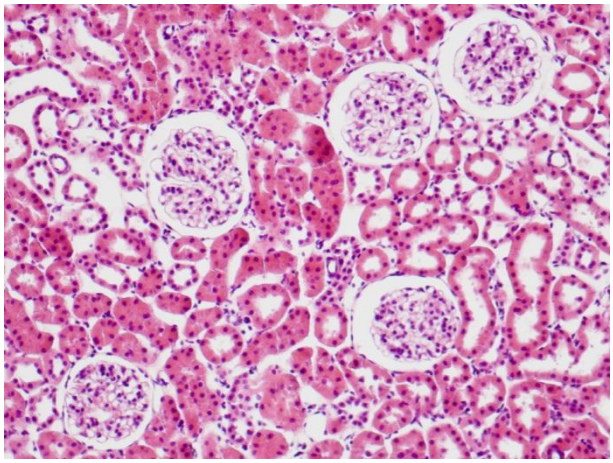
Изследваната група възрастни животни бе представена от дванадесетмесечни плъхове. Макар,че средната продължителност на живот у плъхове е около три години, изборът на едногодишни животни бе продиктуван от обстоятелството, че с напредването на възрастта нараства риска от инфекциозни и неоплазмени заболявания, които биха били опорочили достоверността на получените резултатите в настоящата работа. Селектираните плъхове бяха обективно в добро общо състояние, без данни за придружаваща патология.

Породата SHR се характеризира с развитието на хипертония, която започва около четвъртата седмица от постналталното развитие (Dickhout и Lee, 1998) като кръвното налягане достига трайно повишена стойност от 180-220 mmHg в зряла възраст. Тези животни бяха разпределени в същите възрастови групи, както при нормотензивните Wistar плъхове: млади – 4 месечни, зрели – 6 месечни и възрастни – 12 месечни. Използването на сравними по възраст Wistar плъхове и SHR позволи да се направи

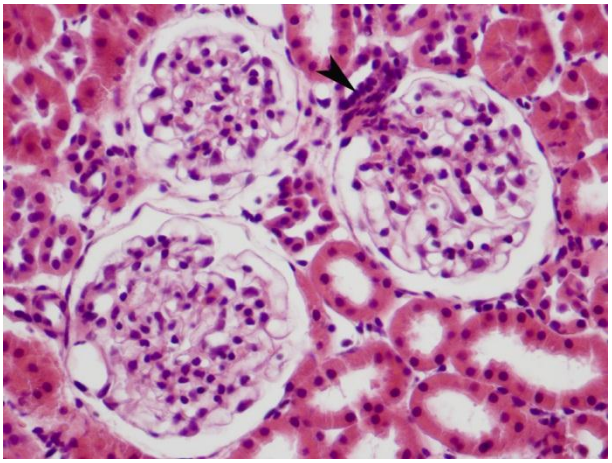
комплексна оценка и анализ, както на възрастово-зависимите, така и на обусловените от артериалната хипертония морфологичните промени в бъбречните телца, тубулните сегменти, бъбречния интерстициум и съдове. По литературни данни повечето от бъбречните структурни изменения при SHR могат да бъдат демонстрирани след продължителен период на артериална хипертония – около 30 седмица от постналталното развитие (Feld и съавт. 1977). Включването на по-млади възрастови групи плъхове (4 месечни) позволява да се проследят началните промени в бъбречната морфология. Тъй като артериалната хипертония не е повлиявана терапевтично при изследваните плъхове, използването на по-възрастни от едногодишни животни не е подходящо за настоящето изследване, поради нарастващия риск от мозъчно-съдови инциденти. Артериалната хипертония на SHR е инструментално установена посредством ’’tail-cuff’’ неинвазивен метод чрез поставяне маншета на апарата на опашката на плъха.

При четиримесечните Wistar плъхове при оцветяването с ХЕ не се установяват отчетливи промени в бъбречния паренхим. Сравнителният анализ на морфологията на бъбречните телца на кортикалните, междинните и юкстамедуларни нефрони не показа съществени различия. 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; основните клетъчни типове – подоцити, мезангиални и ендотелни клетки трудно могат да бъдат разграничени със светлинна микроскопия, но ясно личат базофилно оцветените им ядра (фиг. 1). В зависимост от мястото на преминаване на среза, в някои препарати може да се демонстрира съдовия и тубулен полюси на бъбречните телца, както и ЮГА (фиг. 2). Освен това се наблюдава хетерогенна популация от проксимални и дистални тубулни сегменти, събирателни каналчета. Отчетливо се вижда еднороднния кубичен

епител, тапициращ проксималните и дисталните тубули като клетките са с централно разположено базофилно ядро. Поради наличието на апикални микропроекции не се разграничават ясно лумените на проксималните каналчета. Виждат се и сечения на различни по калибър интрареналнн кръвоносни съдове.



Фиг. 1. Препарат от бъбрек, WR, възраст – 4 месеца, ХЕ. Увеличение – х200.



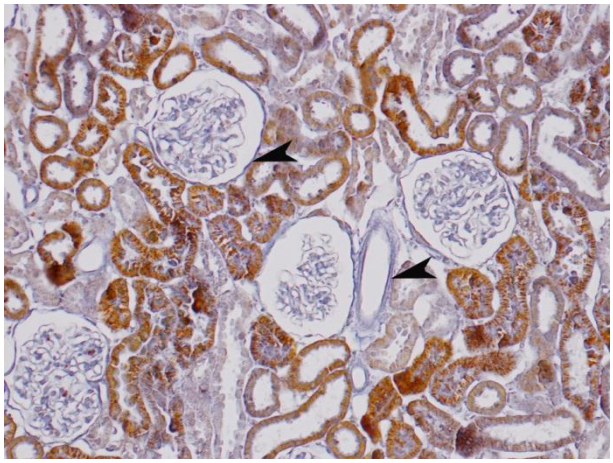
Фиг. 2. ЮГА, macula densa (стрелка), WR, възраст – 4 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.

При трихромното оцветяване по Малори, при четиримесечни Wistar плъхове се демонстрира оскъдно количество фини колагенни влакна разположени в съседство с бъбречните телца, перигломерулярно и перитубулярно, както и около по-големите по калибър кръвоносни съдове (фиг. 3). Не се откри зависимост фиброзните изменения да засягат в по-голяма степен определен вид нефрони.

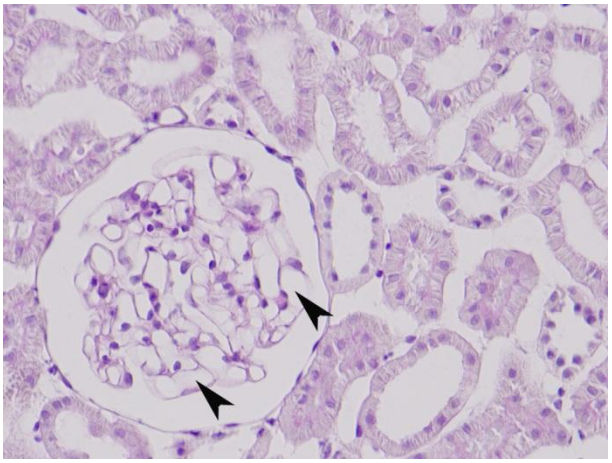
Използването на хистохимичната PAS – реакция при четиримесечни Wistar плъхове способства за по-ясното светлинномикроскопско представяне на базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули. Не се установи отлагането на PAS-позитивен материал по хода на гломерулните клъбца и интрареналните кръвоносни съдове (фиг. 4).

Имунохистохимичното оцветяване за nNOS при четиримесечни Wistar плъхове показа хетерогенно разпределение на ензима. В бъбречния кортекс се установява положителна активност на ензима в областта на париеталния лист на Баумановата капсула, интрагломерулярно и macula

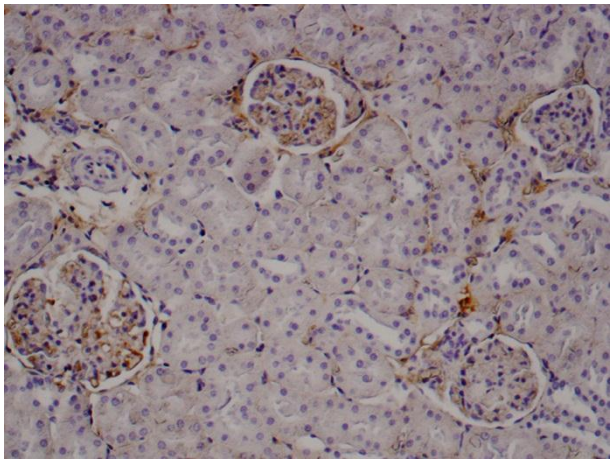
densa (фиг. 5). Умерено изразена положителна реакция се наблюдава и по хода на събирателните каналчета във вътрешната медула (фиг. 6).



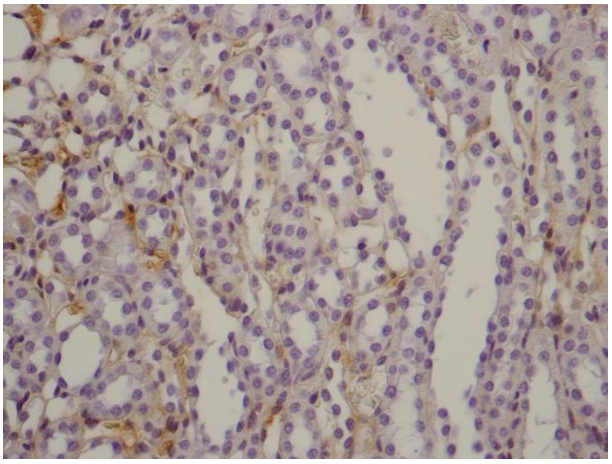
Фиг. 3. Периартериално и перигломеруларно разположени фини колагенни влакна (стрелки), WR, възраст – 4 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x200.



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



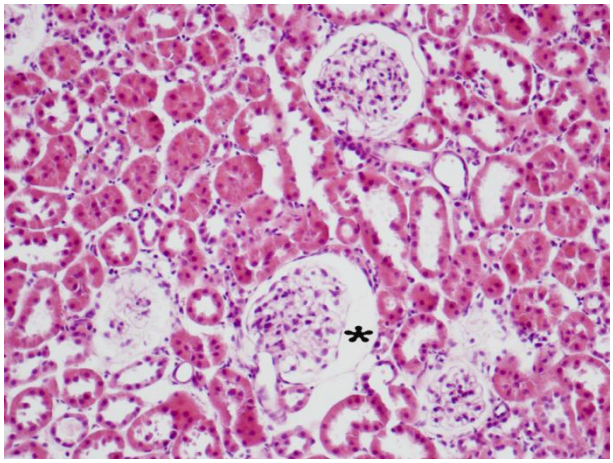
Фиг. 5. Имунохистохимично изследване за nNOS, WR, възраст – 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.



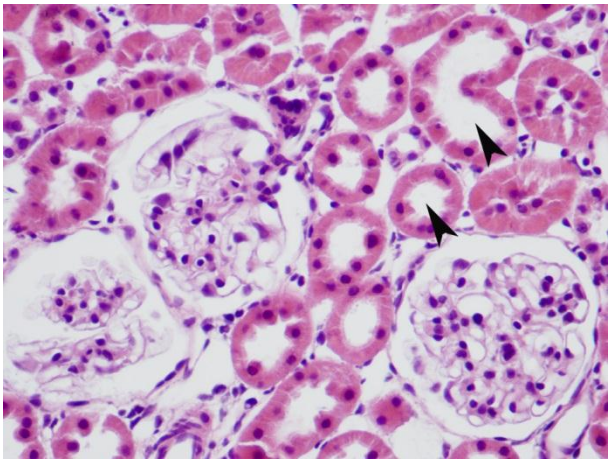
Фиг. 6. Имунохистохимично изследване за nNOS, WR, възраст – 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x400.

При зрелите шестмесечни Wistar плъхове използването на ХЕ позволява да се демонстрират развиващите се възрастово обусловени промени в структурата на бъбрека. В част от бъбречните телца на нефроните се наблюдава сбръчкване на гломерулните клъбца, което е съпроводено с увеличаване на пространството между двата листа на Баумановата капсула (фиг. 7). Установява се нарастваща честота на проксимални и дистални тубули, при които се описва разширение на

лумените им, вследствие на настъпваща промяна в тапициращия ги епител, който преминава в нискокубичен (фиг. 8).

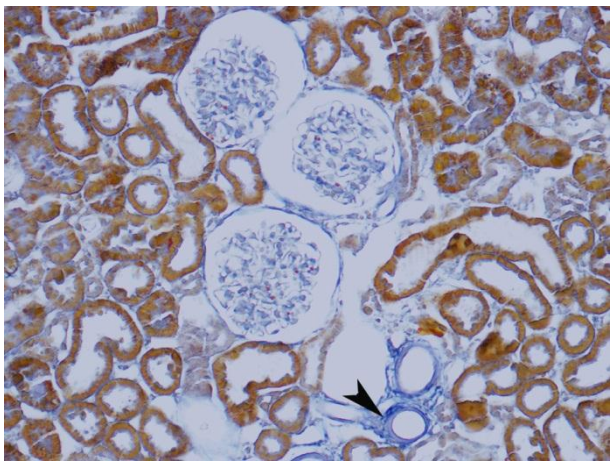


Фиг. 7. Увеличено пространство на Бауманова капсула (звезда), WR, възраст – 6 месеца, ХЕ. Увеличение – х200.

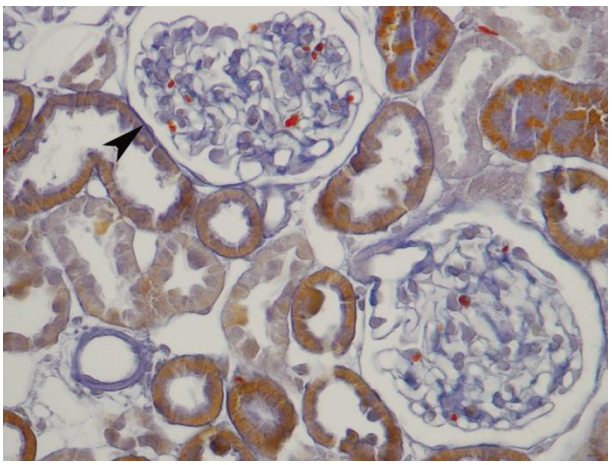


Фиг. 8. Дилатирани тубулни лумени (стрелки), WR, възраст – 6 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.

При шестмесечните Wistar плъхове при трихромното оцветяване по Малори отчетливо се забелязват фиброзните изменения в бъбречната структура. Интензивно оцветени в синьо снопчета колагенни влакна се разполагат в съседство с париеталния лист на Бауманова капсула, перигломерулярно, както и между бъбречните тубули. Увеличение на количеството съединителна тъкан се описва и по хода на по-големите по калибър интраренални кръвоносни съдове (фиг. 9; 10; 11).

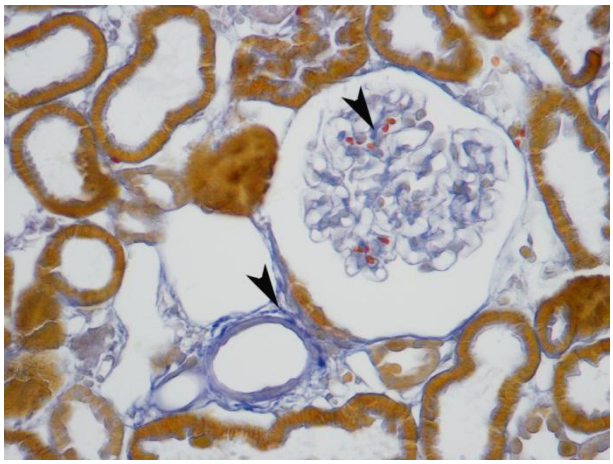


Фиг. 9. Периваскуларна фиброза (стрелка), WR, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х200.

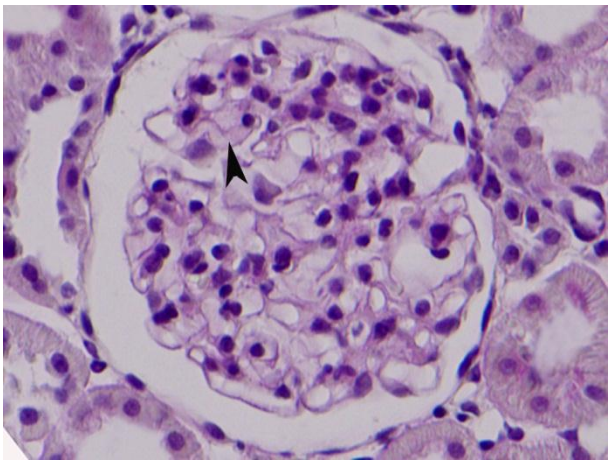


Фиг. 10. Перигломерулярна фиброза (стрелка), WR, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х400.

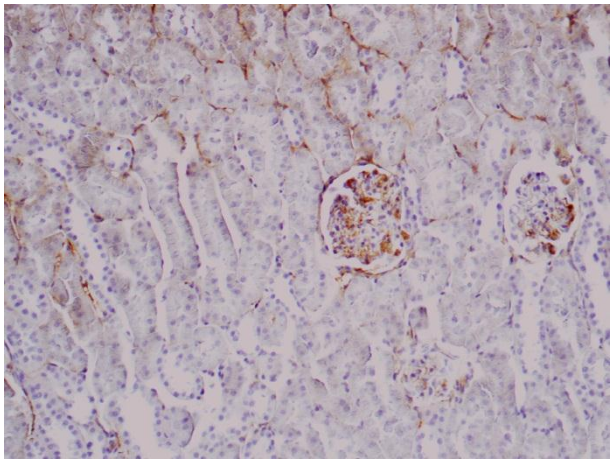
Използването на PAS- реакция при шестмесечните Wistar плъхове демонстрира още по-отчетливо контурите на базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули, в сравнение с младата възрастова група, което дава основание да се предположи развиващ се процес на начално задебеление. В част от препаратите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



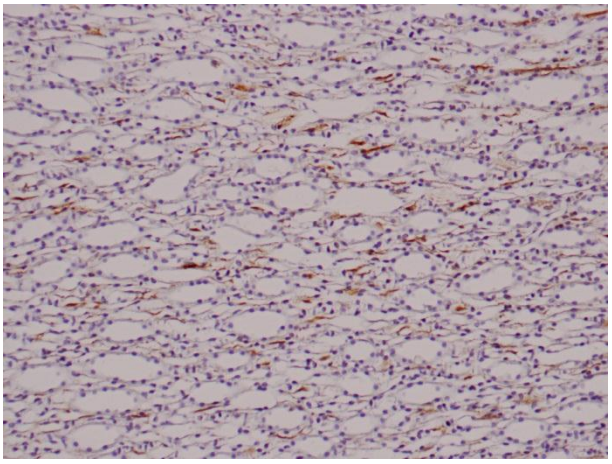
Фиг. 11. Интерстициална и интрагломерулна фиброза (стрелки), WR, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х400.



Фиг. 12. PAS - позитивен материал интрагломерулярно (стрелка), WR, възраст – 6 месеца, PAS–реакция. Увеличение – х1000.



Фиг. 13. Имунохистохимично изследване за nNOS, WR, възраст 6 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – х200.

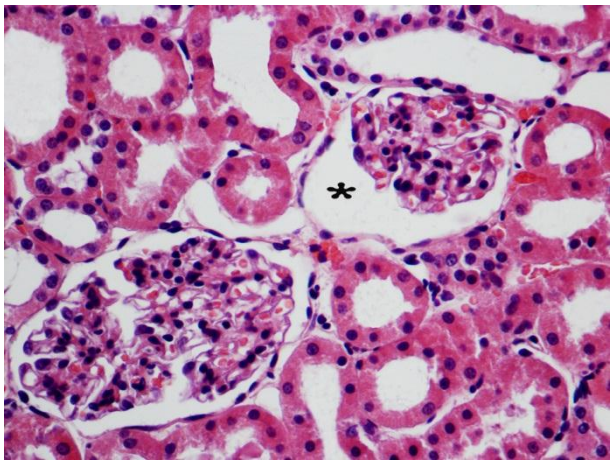


Фиг. 14. Имунохистохимично изследване за nNOS, WR, възраст 6 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – х200.

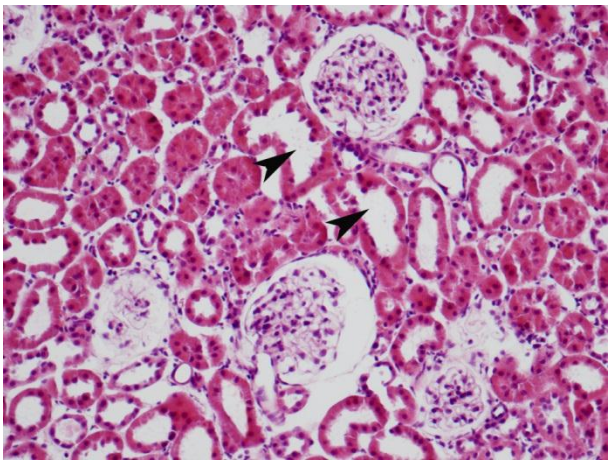
Имунохистохимичното оцветяване за nNOS при шестмесечните плъхове показва хетерогенно разпределение на ензима. Изразено положителна експресия на nNOS се установява интрагломерулярно, в париеталния лист на Баумановата капсула на юкстамедуларните и междинни нефрони. Умерено изразена активност на ензима 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 пространството заграждано от париеталния и висцерален листове на Баумановата капсулата, като при някои бъбречни телца се описват и наличието на патологични контакти между тях (фиг. 15). Голяма част от проксималните и дистални тубулни сегменти се представят с дилатирани лумени, като епителът, който ги тапицира е нискокубичен (фиг. 16).



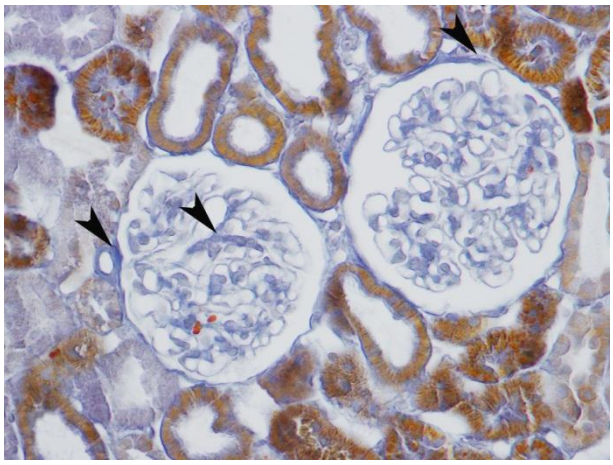
Фиг. 15. Гломерулосклероза и увеличено пространство на Баумановата капсула (звезда), WR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.



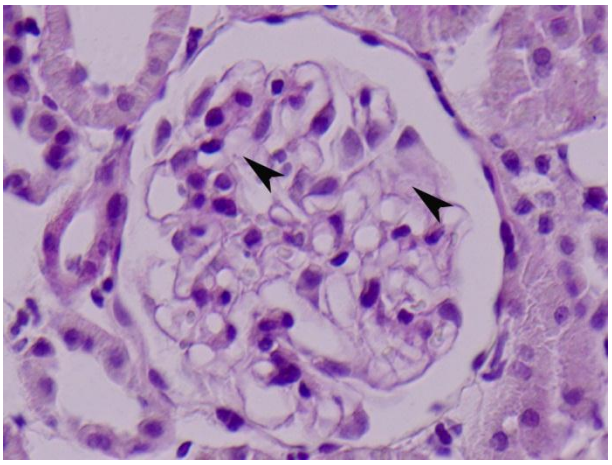
Фиг. 16. Дилатирани тубулни сегменти (стрелки), WR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – х200.

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 колегенни 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 интрареналните кръвоносни съдове (фиг. 17).

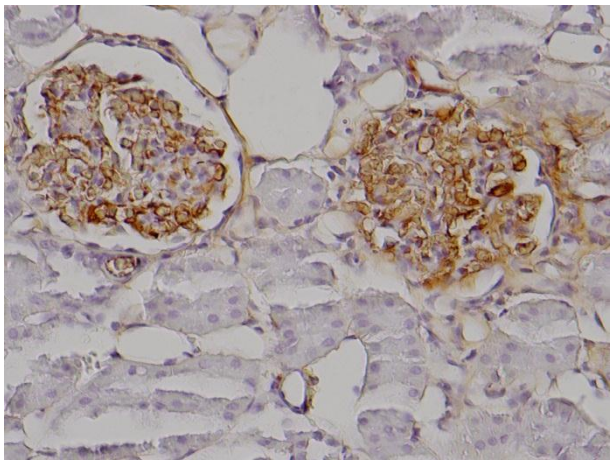


Фиг. 17. Интерстициална и интрагломерулна фиброза (стрелки), WR, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х400.

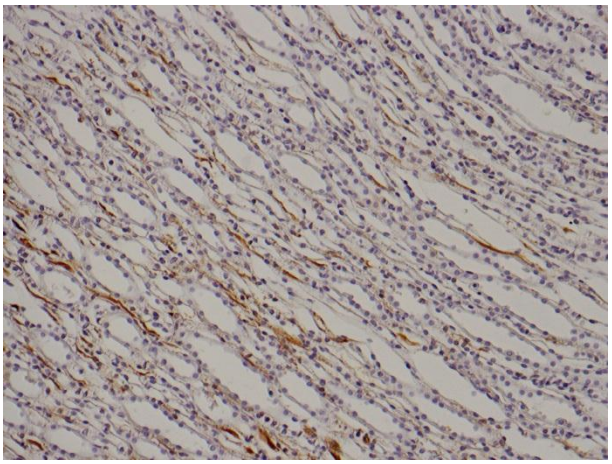


Фиг. 18. PAS - позитивен материал интрагломеруларно (стрелки), WR, възраст – 12 месеца, PAS–реакция. Увеличение – х1000.

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 протеженение 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 nNOS, WR, възраст 12 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – х400.

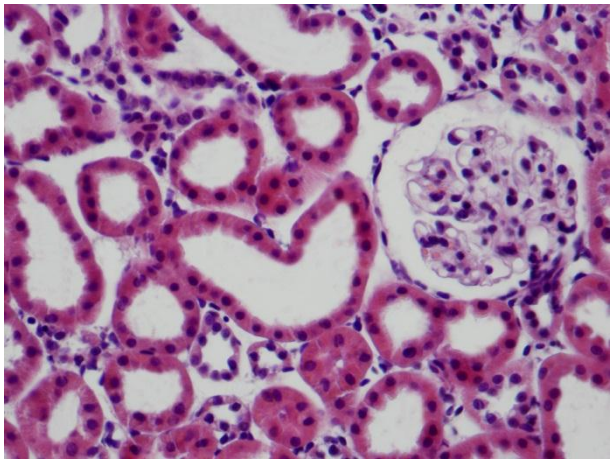


Фиг. 20. Имунохистохимично изследване за nNOS, WR, възраст 12 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – х200.

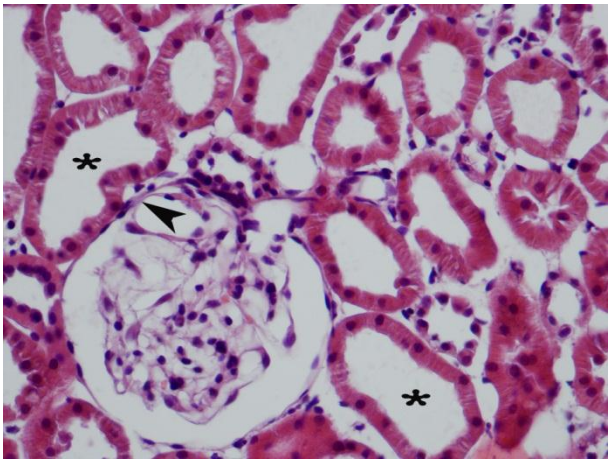
Имунохистохимичното оцветяване за nNOS при възрастната група плъхове показва хетерогенно разпределение на ензима. Силно положителна активност на nNOS се открива в париеталния лист на Баумановата капсула, интрагломеруларно, както и в клетките на macula densa. Слаба до липсваща е експресията на ензима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

При младите (четиримесечни) SHR, при рутинното оцветяване 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 пространството заграждано между париеталния и висцерален листове на Баумановата капсула, като не се установяват патологични контакти между тях. 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 апикална микровилозност. Наблюдават се и различни по калибър интраренални кръвоносни съдове разположени по хода на бъбречния кортекс и медула (фиг.21).

При зрелите (шестмесечни) SHR при оцветяването с ХЕ се установява нарушаване на нормалната бъбречна морфология. Налице е увеличен брой на склеротично изменени гломерули, които видимо са сбръчкани, съдържащи еозинофилен материал и разширено пространство на Баумановите капсули. Описаните промени са подчертано по-добре изразени по хода на вътрешния кортекс, където се описват и бъбречни телца с 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).



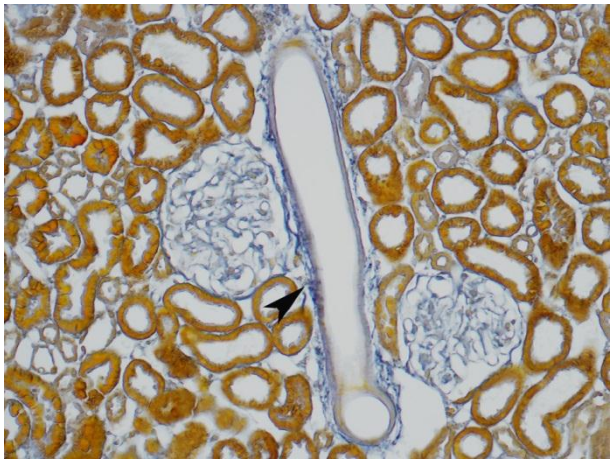
Фиг. 21. Препарат от бъбрек, SHR, възраст – 4 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.



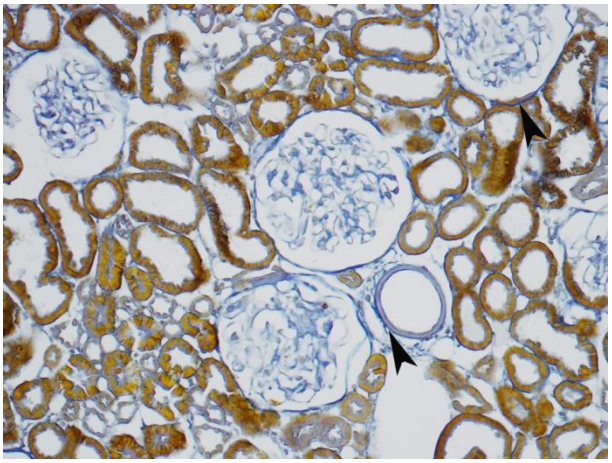
Фиг. 22. Контакт между париетален и висцерален листове на Бауманова капсула (стрелка) и дилатирани тубулни сегменти (звезди), SHR, възраст 6 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.

При трихромното оцветяване по Малори при младите (четиримесечни) SHR се виждат фини колагенни влакна оцветени в интензивно син цвят около бъбречните телца, перигломеруларно като този процес е по-силно изразен във вътрешните две трети на кората. Фиброзни изменения се наблюдават и по хода на тубулите, които са обкръжени от нежни колагенни влакна. Освен това се демонстрират концентрично подредени съединителнотъканни влакна около интрареналните кръвоносни съдове, израз на развиваща се периваскуларна фиброза (фиг. 23).

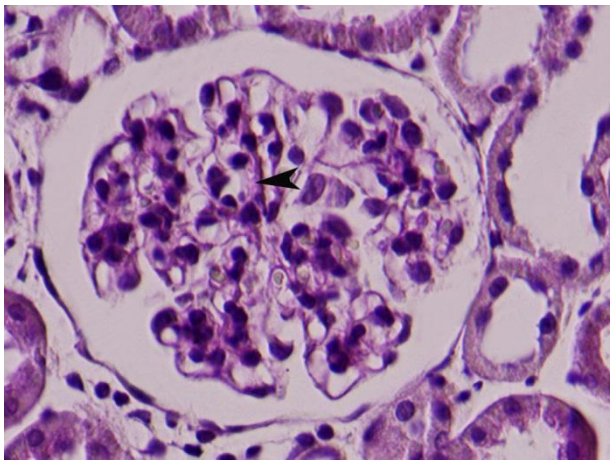
При зрелите (шестмесечни) SHR при трихромното оцветяване по Малори се наблюдава повсеместно развиваща се фиброза по хода на бъбречния кортекс и медула. Оцветени в син цвят снопчета от колагенни влакна обграждат бъбречните телца на трите основни вида нефрони, като тези промени са най-изразени при юкстамедуларните и междинни нефрони. В областта на съдовия полюс ясно личат фиброзното задебеление около аферентната и еферентни артериоли, отчетлива е и периваскуларната фиброза в по-големите по калибър интраренални кръвоносни съдове. Наблюдава се нарастваща експанзия на съединителнотъканни повлекла между тубулните сегменти (фиг. 24).



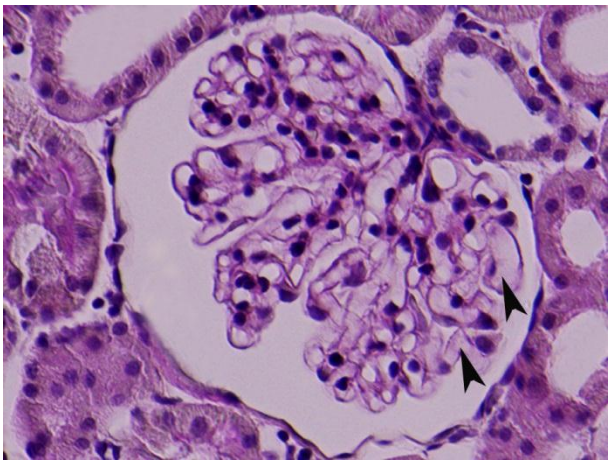
Фиг. 23. Периваскуларна фиброза(стрелка), SHR, възраст 4 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – х200.



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



Фиг. 25. PAS - позитивен материал интрагломерулярно (стрелка), SHR, възраст – 4 месеца, PAS–реакция. Увеличение – х1000.

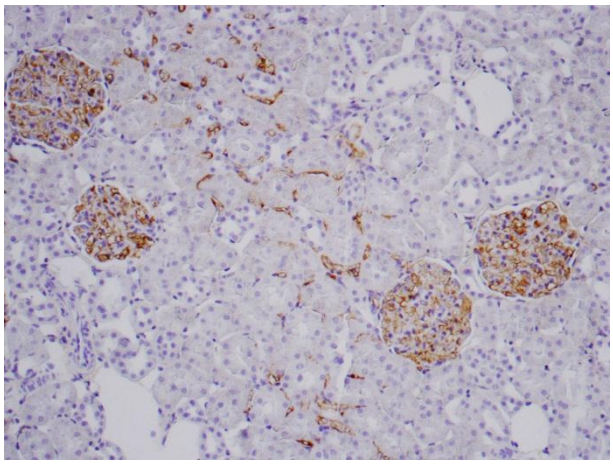


Фиг. 26. PAS - позитивен материал интрагломерулярно (стрелка), SHR, възраст – 6 месеца, PAS–реакция. Увеличение – х1000.

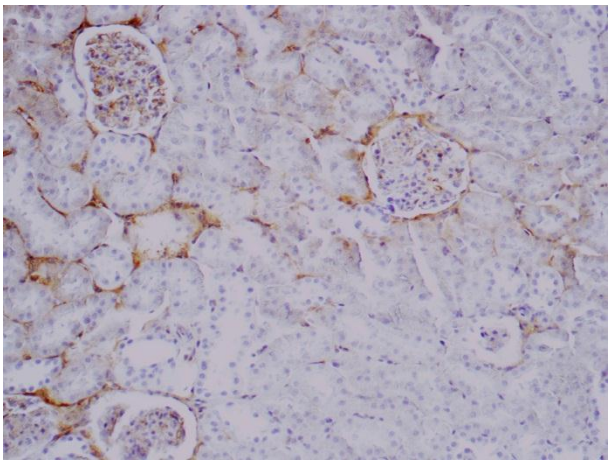
Използването на PAS-реакция при младите и зрели SHR позволява да се наблюдава по-детайлно светлинномикроскопската характеристика на базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули. Гломерулната хиалиноза е демонстрирана в пурпурновиолетов цвят чрез използвания хистохимичен метод, като този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

Имунохистохимичното оцветяване за nNOS при четири- и шестмесечни SHR показва хетерогенно разпределение на ензима в бъбречната структура. И в двете възрастови групи се установява силно положителна активност на nNOS интрагломерулярно (фиг. 27; 28).

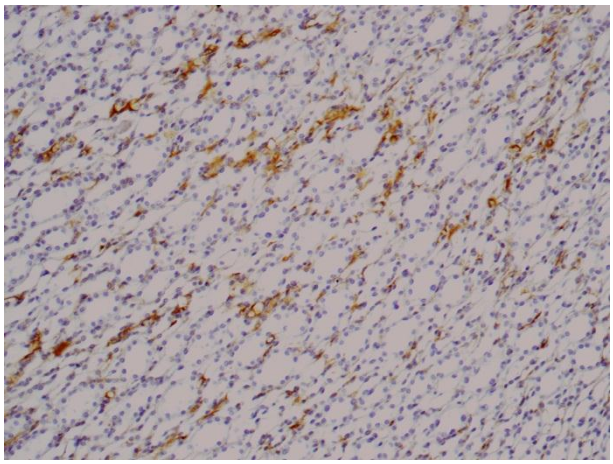
Умерено положителна е реакцията при междинните и кортикални нефрони. При шестмесечните плъхове се установява по-силна експресия на ензима в париеталния лист на Баумановата капсула, както и по хода на проксималните тубулни сегменти. По отношение на дисталните тубули и в двете възрастови групи се наблюдава хетерогенно разпределение на ензима от липсващо до едва доловимо оцветяване. Медуларни събирателни каналчета показват умерена до силна имунореактивност (фиг. 29; 30).



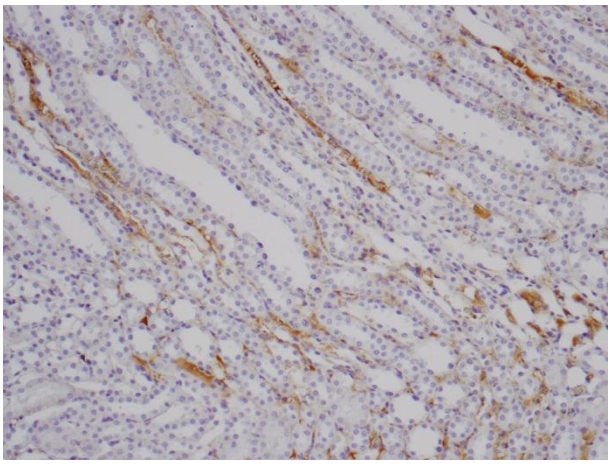
Фиг. 27. Имунохистохимично изследване за nNOS, SHR, възраст 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200



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



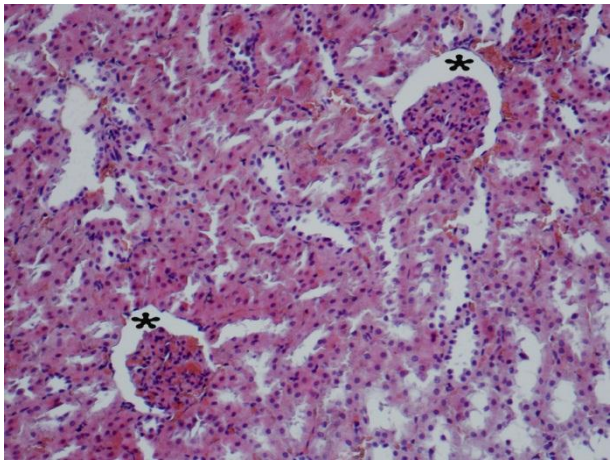
Фиг. 29. Имунохистохимично изследване за nNOS, SHR, възраст 4 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.



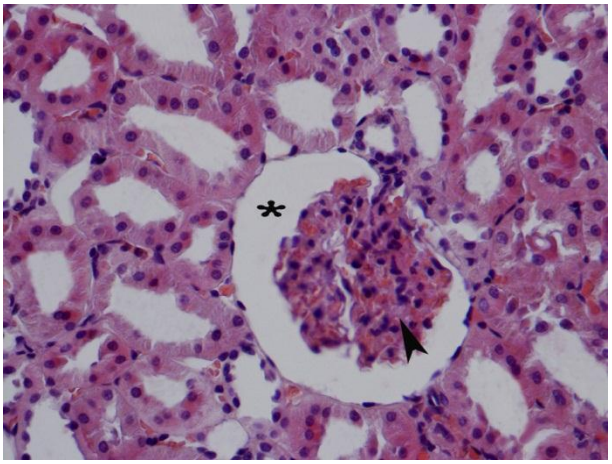
Фиг. 30. Имунохистохимично изследване за nNOS, SHR, възраст 6 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

При възрастните (дванадесетмесечни) 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 увеличено пространство на Баумановата капсула, като при част от нефроните се установяват патологични контакти между париеталния и висцералния й лист. 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).



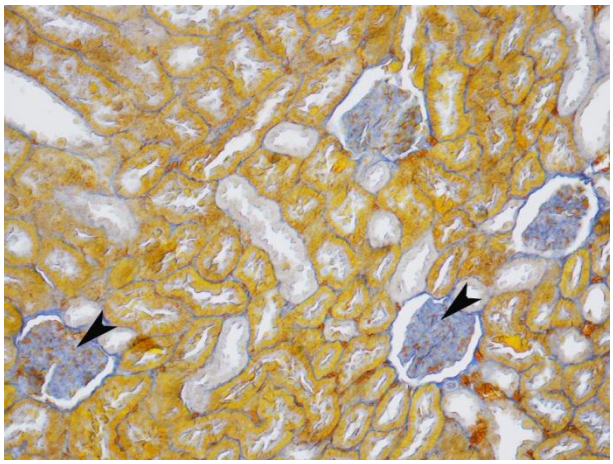
Фиг. 31. Гломерулосклероза. Увеличено пространство на Баумановата капсула (звезди), SHR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – х200.



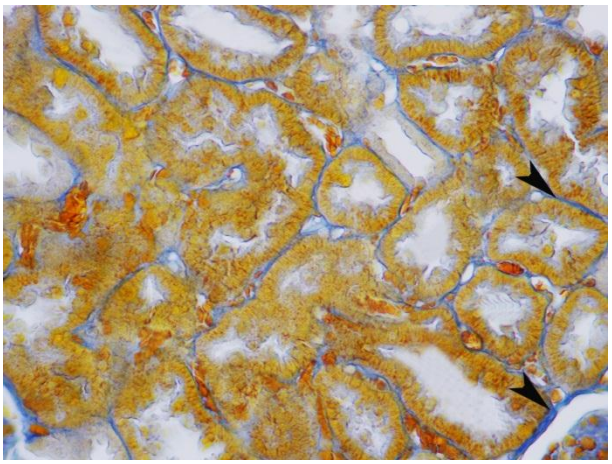
Фиг. 32. Увеличено пространство на Баумановата капсула (звезда) и заличена морфология на капилярните лумени (стрелка), SHR, възраст – 12 месеца, ХЕ. Увеличение – х400.

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 интезивно 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, концентрично подредени снопове колагенни влакна се описват около по-големите по калибър

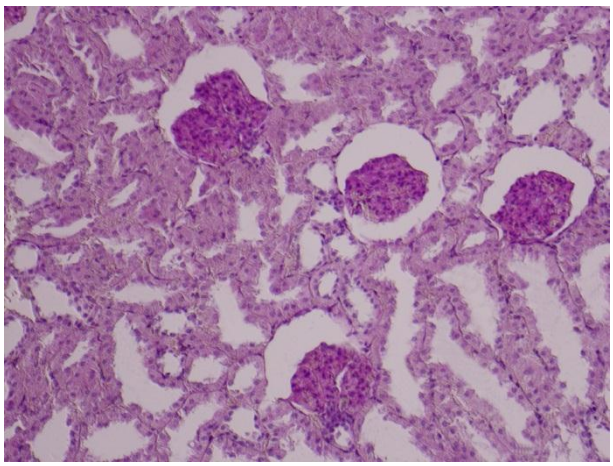
интраренални кръвоносни съдове. Увеличение на интерстициалната съединителна тъкан се установява по протежение на проксималните и дистални тубулни сегменти (фиг. 33; 34).



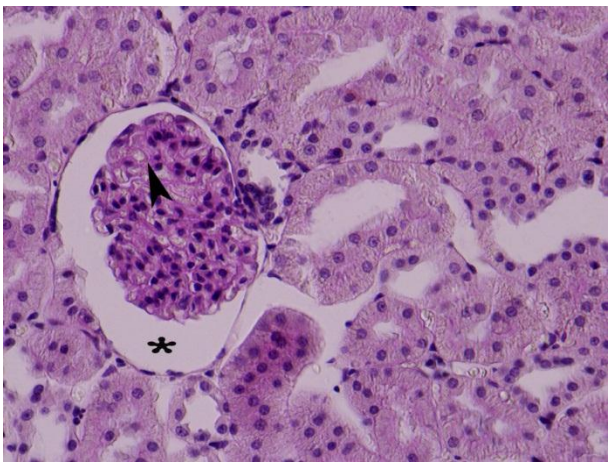
Фиг. 33. Гломерулосклероза (стрелки), SHR, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x200.



Фиг. 34. Тубулоинтерстициална фиброза (стрелки), SHR, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x400.



Фиг. 35. Гломерулна хиалиноза, SHR, възраст – 12 месеца, PAS-реакция. Увеличение – x200.

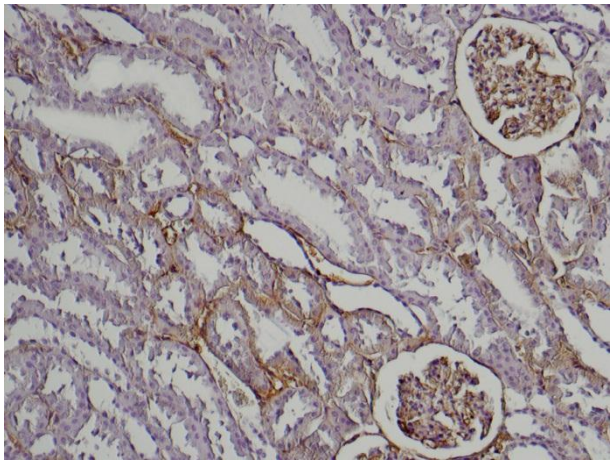


Фиг. 36. Гломерулна хиалиноза (стрелка) и увеличено пространство на Баумановата капсула (звезда), SHR, възраст – 12 месеца, PAS-реакция. Увеличение – x400.

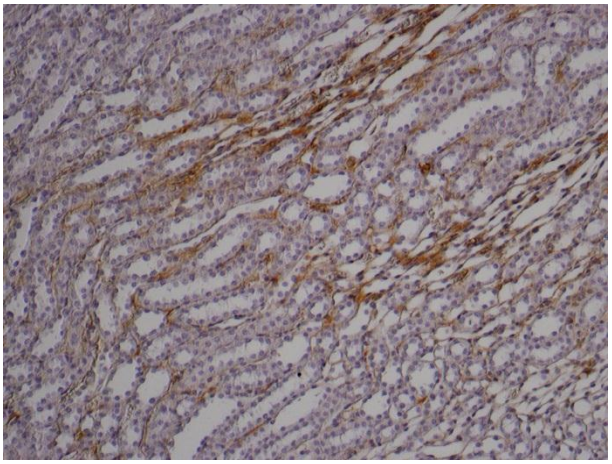
Използването на PAS-реакция при възрастните SHR отразява още по-отчетливо базалните мембрани в структурата на бъбречните телца и тубули на светлинномикрскопско ниво в сравнение с по-младите възрастови групи SHR. Съдовите изменения са представени от удвояване на вътрешната еластична мембрана на аркуатните 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 nNOS при възрастните SHR показва хетерогенно разпределение на ензима в бъбречната структура. Силно положителна активност на ензима се установява интрагломеруларно, в клетките на macula densa и париеталния лист на Баумановата капсула на кортикалните и междинни нефрони, докато при юкстамедуларните нефрони е представена умерено. Положителна имунохистохимична реакция се отчита и по хода на проксималните и дистални тубулни сегменти. Изразено положителна имуноекспресия се наблюдава и по хода на събирателните каналчета (фиг. 37; 38).



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

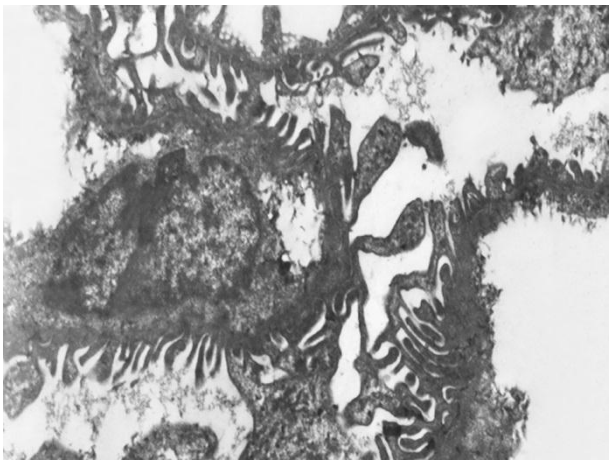


Фиг. 38. Имунохистохимично изследване за nNOS, SHR, възраст 12 месеца. Позитивната реакция се маркира в кафяво. Увеличение – x200.

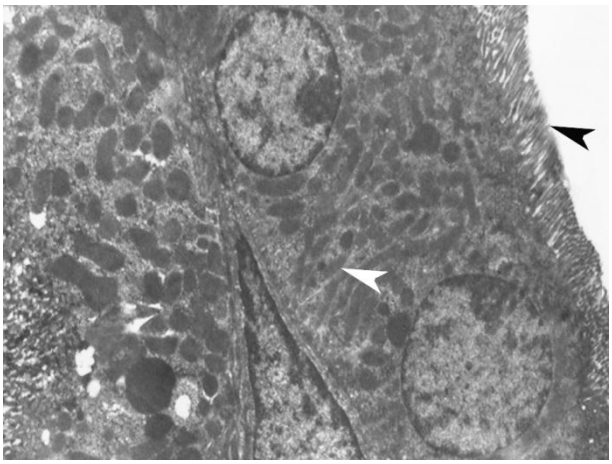
3. Морфологични промени в нефроните от проведеното елетронномикроскопско изследване

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 – базална мембрана, представена от два слоя с ниска електронна плътност – laminae rarae externa et interna и разположен между тях електроннoплътен слой – lamina densa. По вътрешната й повърхност се разграничава фенестрирания ендотел, а от външната й страна подоцитите са със запазена структура като не се установяват процеси на вакуолизация и електроннoплътни включвания в цитоплазмата им. Изхождащите от тях цитоплазмени израстъци – цитотрабекули и цитоподии ясно дефинират границите на загражданите от тях филтрационни цепки (фиг. 39). Отчетливо се наблюдава еднослойния плосък епител, тапициращ париеталния лист на Баумановата капсула като в загражданото от двата й листа пространство не се установяват патологични отлагания. 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 стриирана повърхност и са видово специфични у плъх. Главните и интеркалатни клетки тапициращи събирателните тубули са

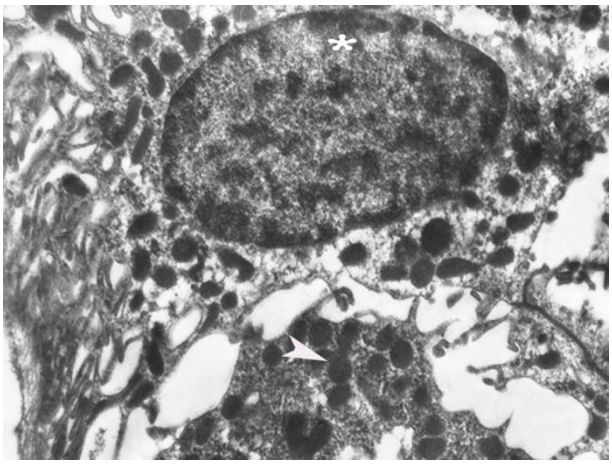
представени с множество базални нагъвания на плазмалемата, но сравнителната оценка между двата клетъчни типа показва,че главните клетки имат по-оскъдно количество клетъчни органели.



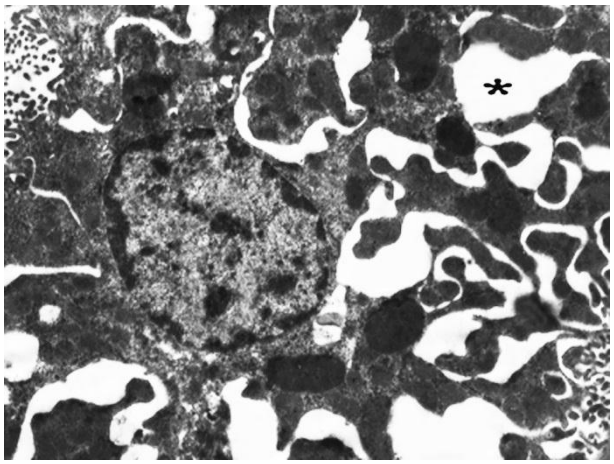
Фиг. 39. Гломерулна филтрационна бариера – ясно личи морфологията на подоцитите и цитоплазмените им израстъци, SHR, възраст – 4 месеца. Увеличение – x11700.



Фиг. 40. Тубулни епителни клетки с ясно изразена микровилозност и голямо количество митохондрии (стрелки), SHR, възрааст – 4 месеца. Увеличение – x7400.



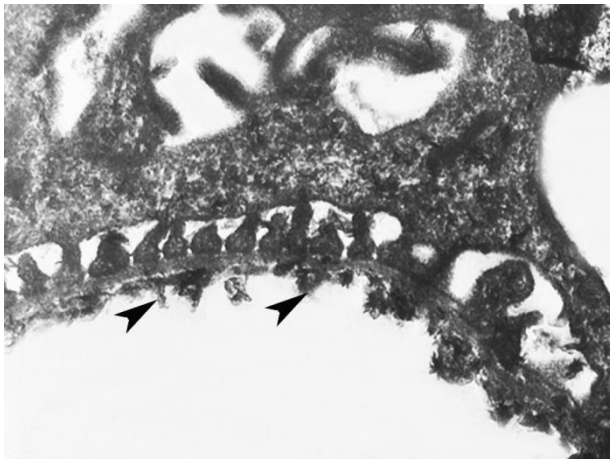
Фиг. 41. Базален компармент на тубулна епителна клетка – клетъчно ядро (звезда) и базални нагъвания с митохондрии (стрелка), WR, възраст – 4 месеца. Увеличение –x13800.



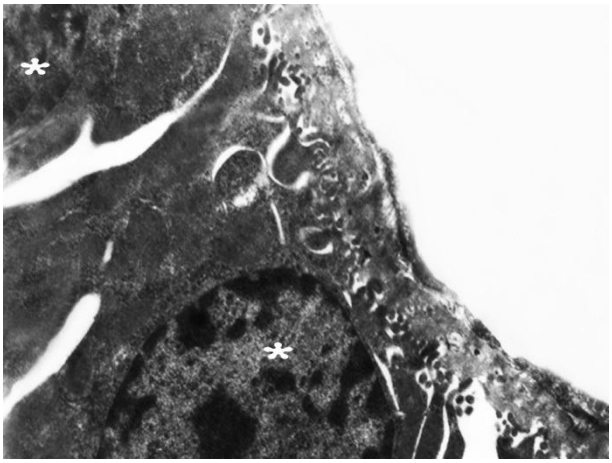
Фиг. 42. Базални нагъвания на тубулна епителна клетка (звезда), WR, възраст – 4 месеца. Увеличение – x8800.

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 елетронноплътни включвания (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 електроннoплътни гранули.



Фиг. 43. Гломерулна филтрационна бариера, фенестриран ендотел (стрелки), WR, възраст – 6 месеца. Увеличение – x32000.



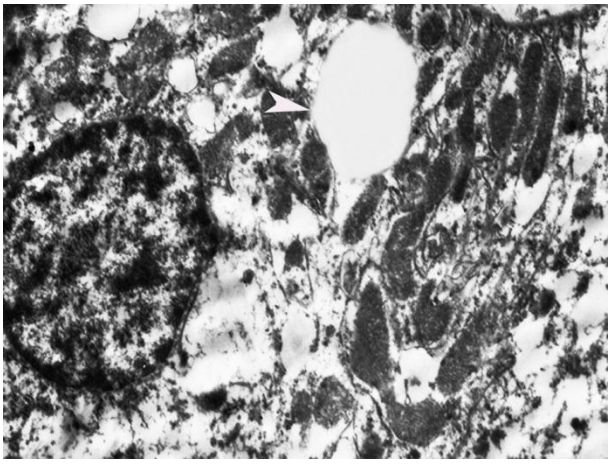
Фиг. 44. Ядра на съседни тубулни епителни клетки (звезди) и разширено междуклетъчно пространство, WR, възраст – 6 месеца. Увеличение – x24000.

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 сравнение 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 електроннoплътни гранули и вакуоли,

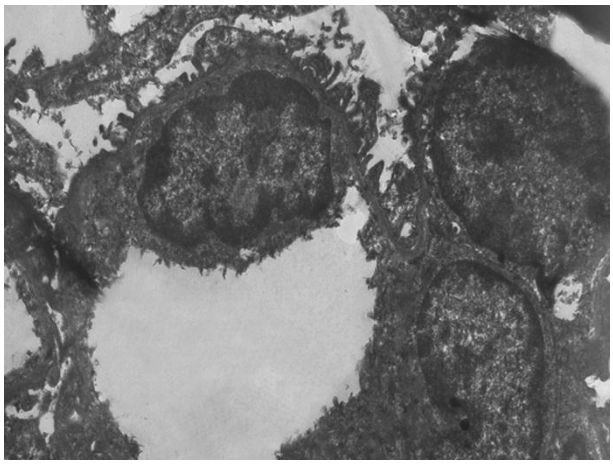
редуциране гъстотата на базалните нагъвания и митоходриите. както и загуба на контакт с подлежащата базалната мембрана (фиг. 46).



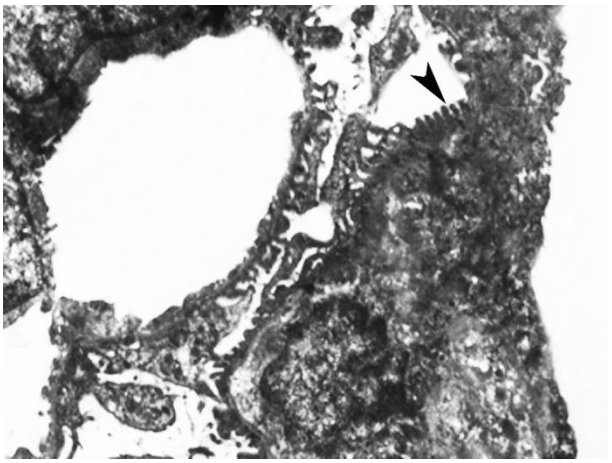
Фиг. 45. Гломерулна филтрационна бариера, WR, възраст – 12 месеца. Увеличение – x10500.



Фиг. 46. Вакуолизация на цитоплазмата на тубулна епителна клетка (стрелка), WR, възраст – 12 месеца. Увеличение – x10900.



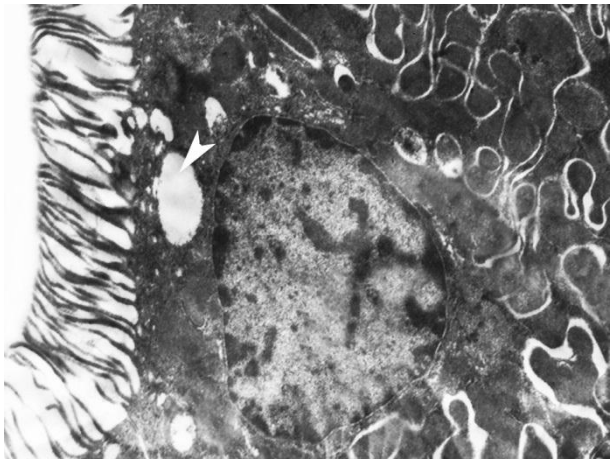
Фиг. 47. Гломерулна филтрационна бариера, SHR, възраст – 6 месеца. Увеличение – x11500.



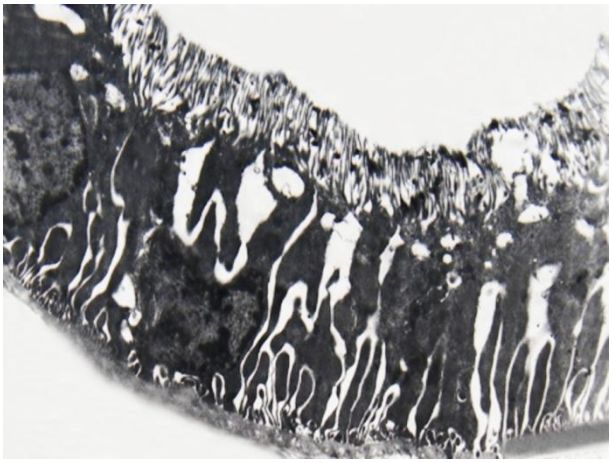
Фиг. 48. Гломерулна филтрационна бариера, подоцитна увреда (стрелка), SHR, възраст – 12 месеца. Увеличение – x11900.

При шестмесечните и дванадесетмесечни SHR най-съществени структурни изменения се установяват по хода на 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 – x21000.



Фиг. 50. Цепковидни пространства между тубулни епителни клетки и кондензация на клетъчните ядра, SHR, възраст – 12 месеца. Увеличение – x5600.

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. В част от клетките се наблюдава вакуолизация на цитоплазмата, редуцирана апикална микровилозност, намален брой митоходрии в областта на базалните нагъвания на плазмалемата, израз на развиващ се процес на тубулна атрофия. При някои клетки се установява кондензация на хроматина в клетъчните ядра, както нарушен контакт с подлежащата им базална мембрана (фиг. 49; 50).

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

Количествените данни върху бъбречните телца и гломерулите на кортикални и юкстамедуларни нефрони при нормотензивни Wistar плъхове и SHR са изготвени при анализ на подбрани области, без значителни разкъсвания на бъбречния паренхим, вследствие от лабораторната обработка на препаратите. С оглед получаването на достоверни резултати строго бяха спазвани въведените критерии стандартизиращи измерванията на областите на интерес.

Проследени бяха в динамика настъпващите изменения на следните морфометрични показатели на кортикалните и юкастамедуларни нефрони през различни етапи от постналталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR:

- 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)

Получените стойности на изследваните показатели са представени в таблици, в които са отразени средните им стойности, стандартното отклонение и TTEST. За визуализация на експерименталните данни са използвани колонни диаграми – Bar Chart/Bar Plot с правоъгълници, както и диаграми от типа Box-whisker plot – “кутия с мустачки”, чрез които е изготвен сравнителен анализ на настъпващите промени на проследяваните показатели при различните възрастови групи нормотензивни Wistar плъхове и SHR.

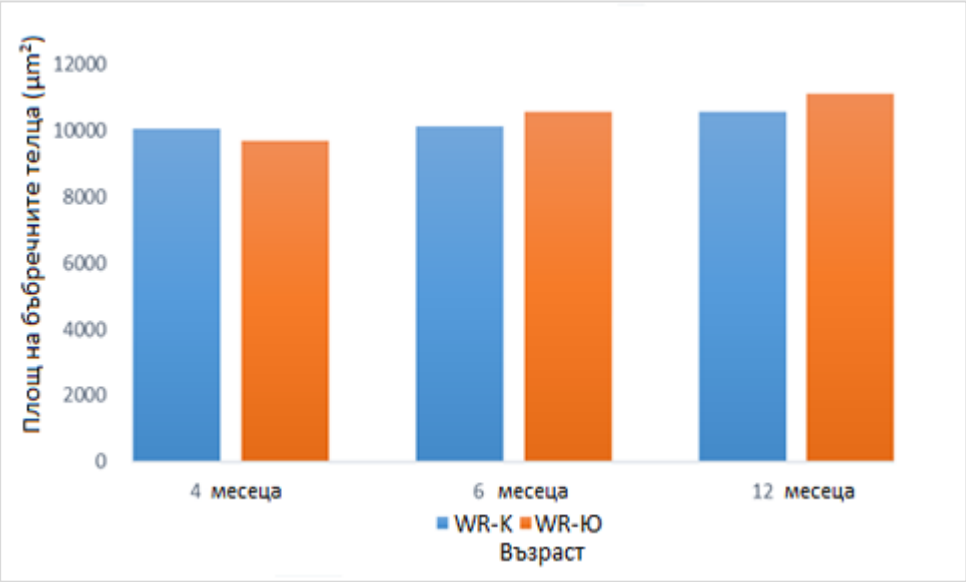
4.1. Сравнителен количествен анализ между кортикални и юкстамедуларни нефрони през различни възрастови периоди от постналталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове

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).

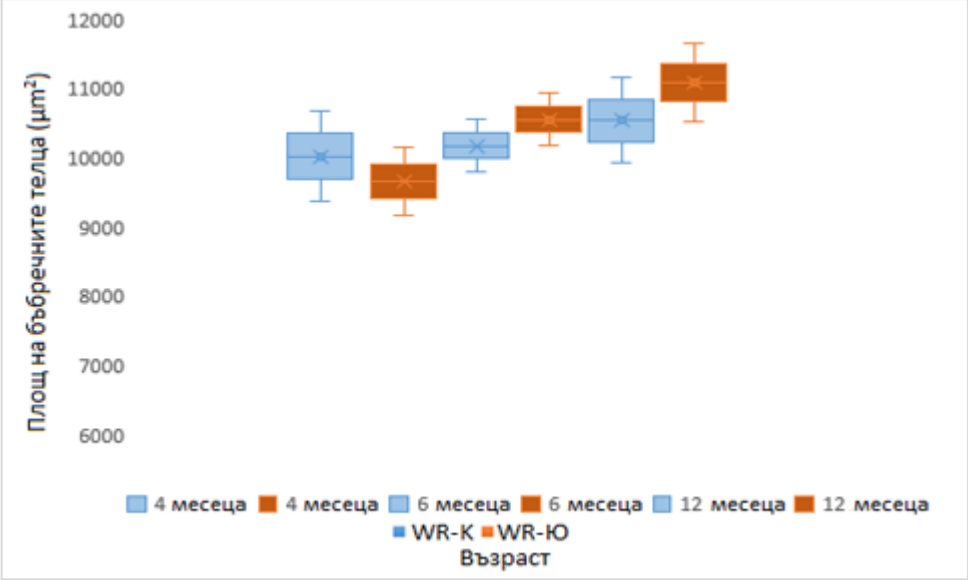
Визуалният анализ на диаграмата Box Plot показва при сравнение на площта на бъбречните телца на кортикалните с тези на юкстамедуларни нефрони при отделните групи Wistar плъхове следните различия: при четиримесечните плъхове се наблюдават средни стойности на площта на бъбречните телца на кортикални нефрони 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).

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.



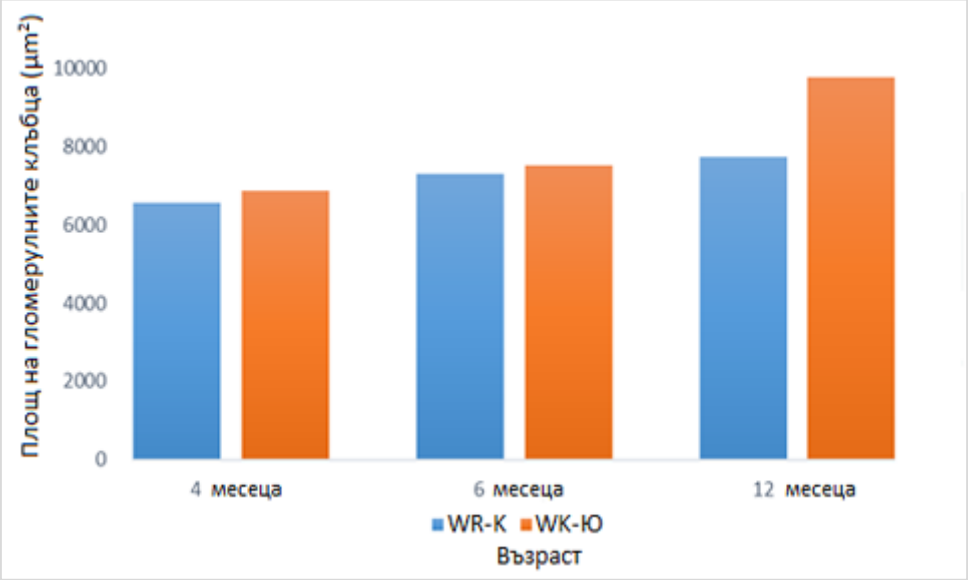
Фиг. 51. Средни стойности на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.



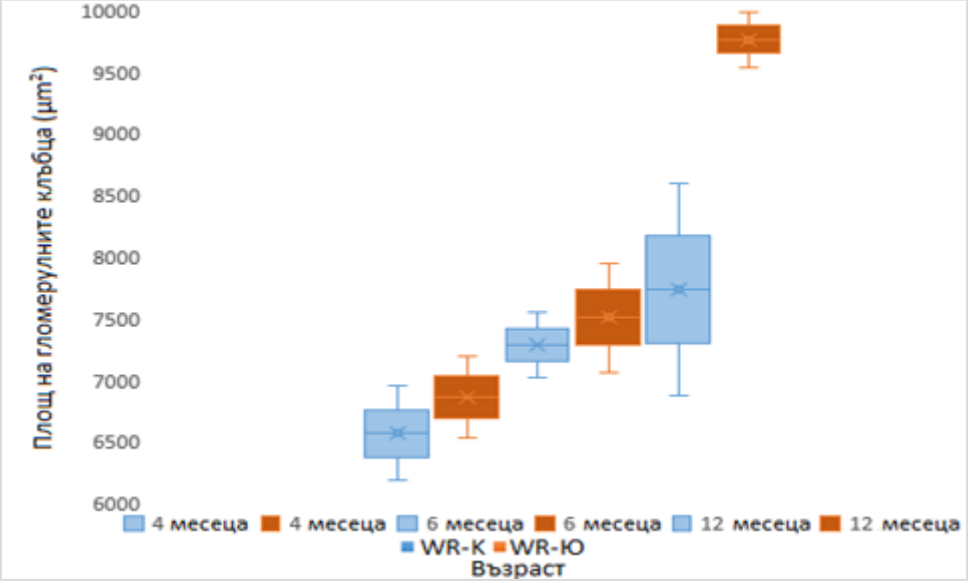
Фиг. 52. Сравнителен анализ на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.

Сравнителният анализ 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, докато при кортикалните нефрони нарастналата площ на гломерулните клъбца е приблизително съпоставима с тази на юкстамедуларните нефрони при шестмесечната група животни (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

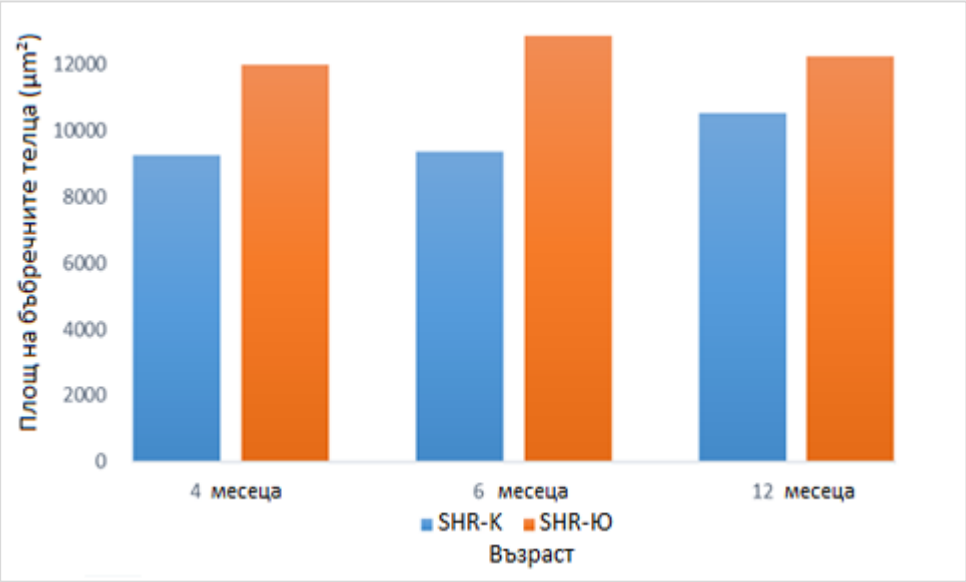
Таблица 2. Количествена характеристика на площта на гломерулните клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при Wistar плъхове.

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

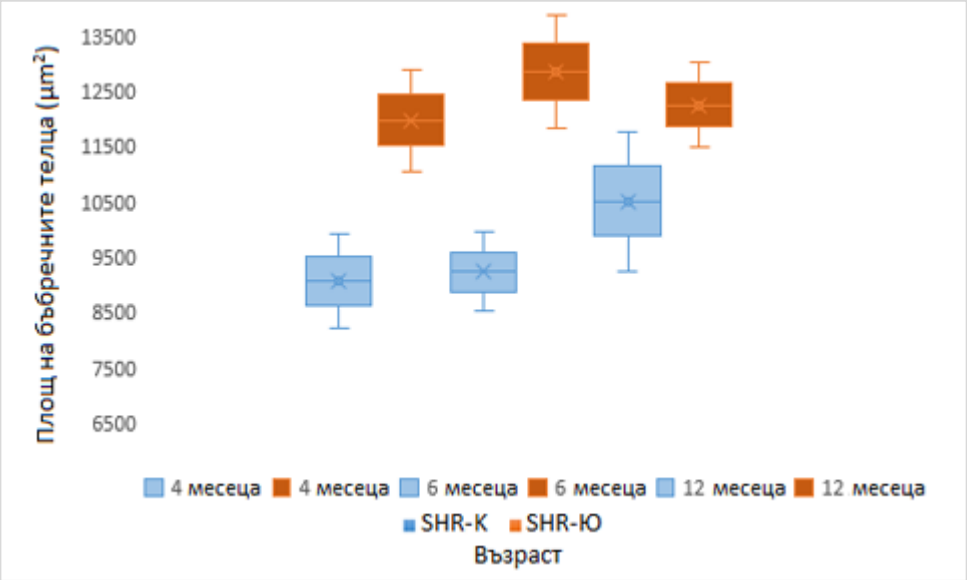
Сравнителният анализ при четиримесечните SHR показва значително по-голяма площ на бъбречните телца на юкстамедуларните в сравнение с кортикалните нефрони. При шестмесечните SHR тази разлика е още по-демонстративна, като изследвания морфометричен показател при юкстамедуларните нефрони достига най-висока 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).

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



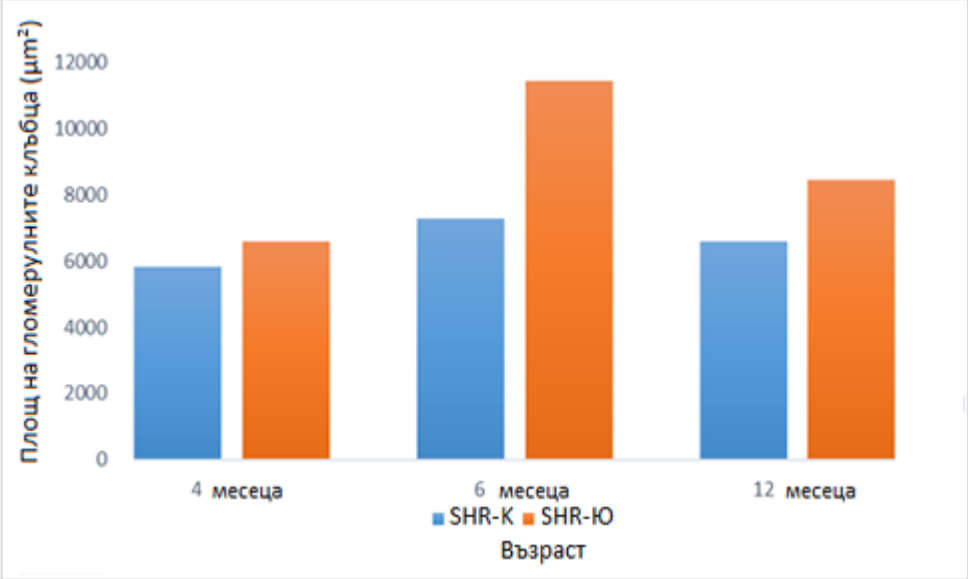
Фиг. 55. Средни стойности на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.



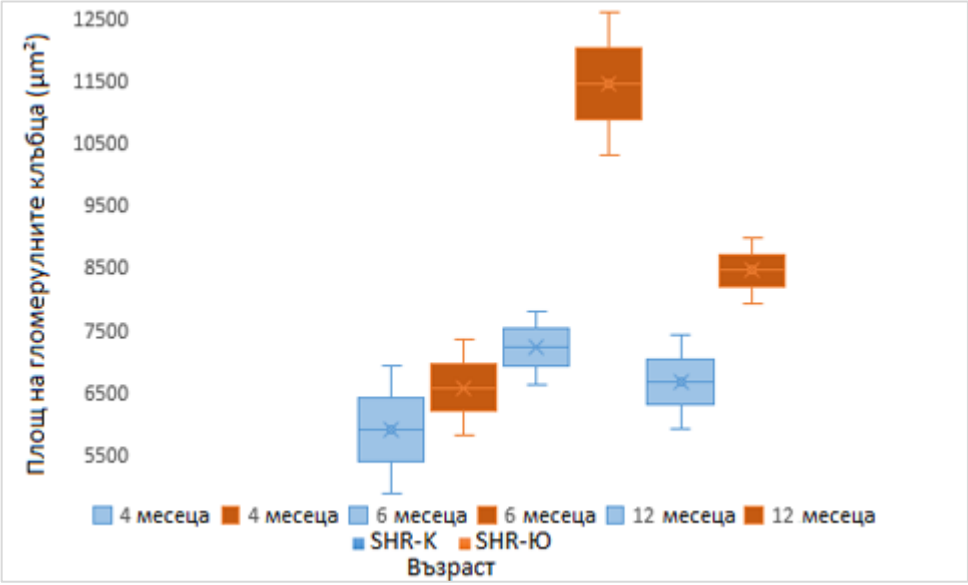
Фиг. 56. Сравнителен анализ на площта на бъбречните телца на кортикални и юкстамедуларни нефрони при SHR.

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.

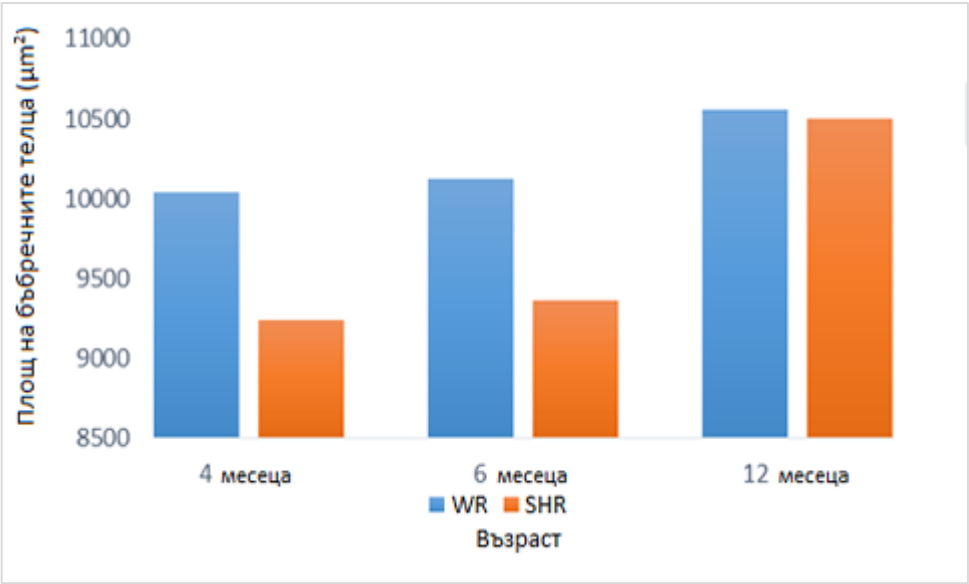
SHR	Кортикални нефрони		Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на гломерулни клъбца (µm²)		Площ на гломерулни клъбца (µm²)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	5822,6	1013,9	6579,4	759,8	P<0,00001
6 месеца	7278,5	588	11446,4	1152,9	P<0,0000001
12 месеца	6595,8	742,5	8453,6	517,3	P<0,000001

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

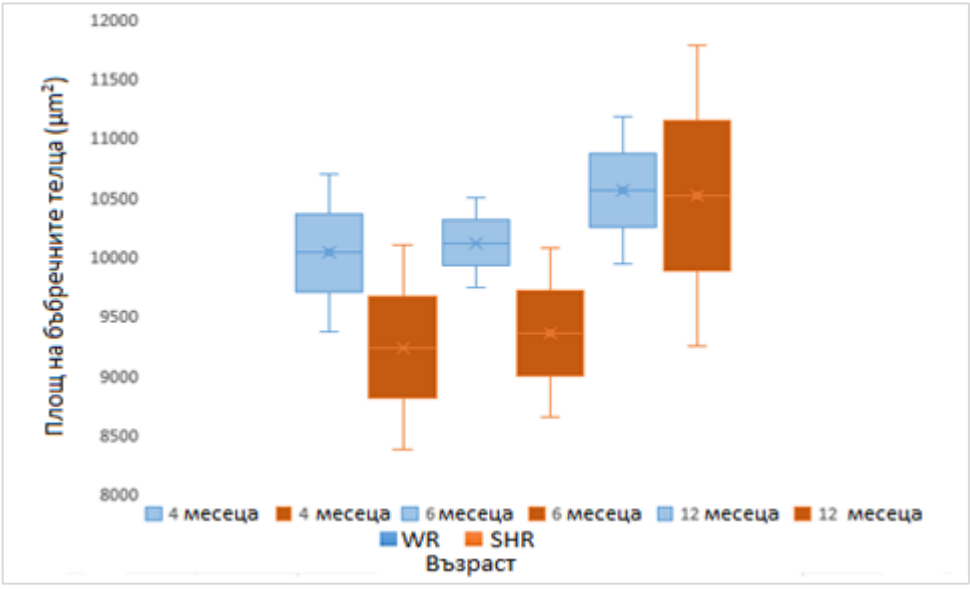
4.3. Сравнителна количествена характеристика на площта на бъбречните телца и гломерулите на кортикални нефрони през различни етапи от постналталното развитие при нормотензивни Wistar и SHR

Сравнителният анализ при четиримесечните Wistar плъхове и SHR показва, че площта на бъбречните телца на кортикалните нефрони е по-голяма при нормотензивната група животни. 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 Площ на бъбречни телца (µm²)		SHR	Кортикални нефрони Площ на бъбречни телца (µm²)		TTEST
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	10035,7	660,5	4 месеца	9238,8	861,2	P<0,00001
6 месеца	10120,3	375,3	6 месеца	9359	713,2	P<0,00001
12 месеца	10560,8	617,4	12 месеца	10504,2	1265,8	P>0,05

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

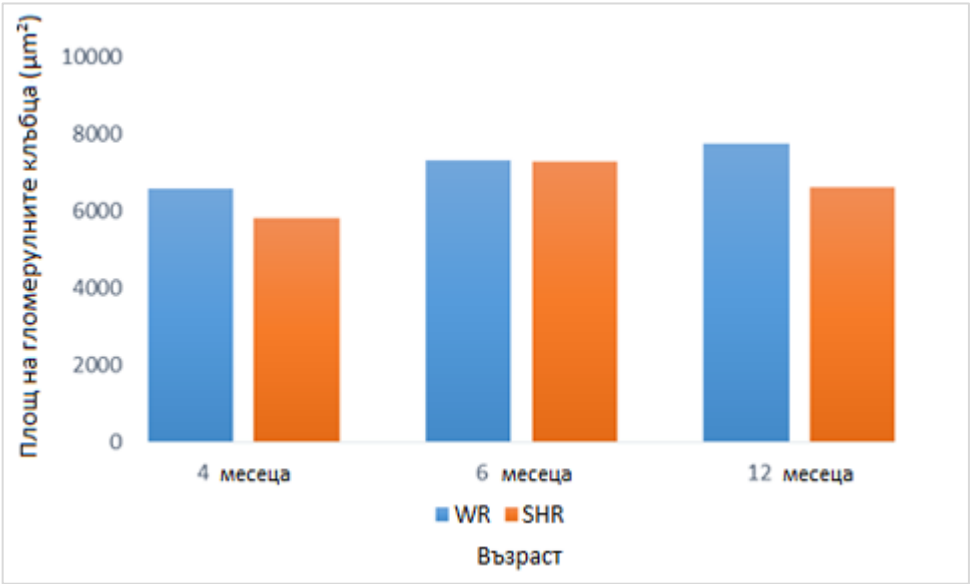
Сравнителният анализ при четиримесечните Wistar плъхове и SHR показва, че площта на гломерулните клъбца е по-голяма при нормотензивната група. С напредване на възрастта при шестмесечните плъхове се наблюдава увеличение на площта като се установява сходство в стойностите на изследвания морфометричен показател 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).

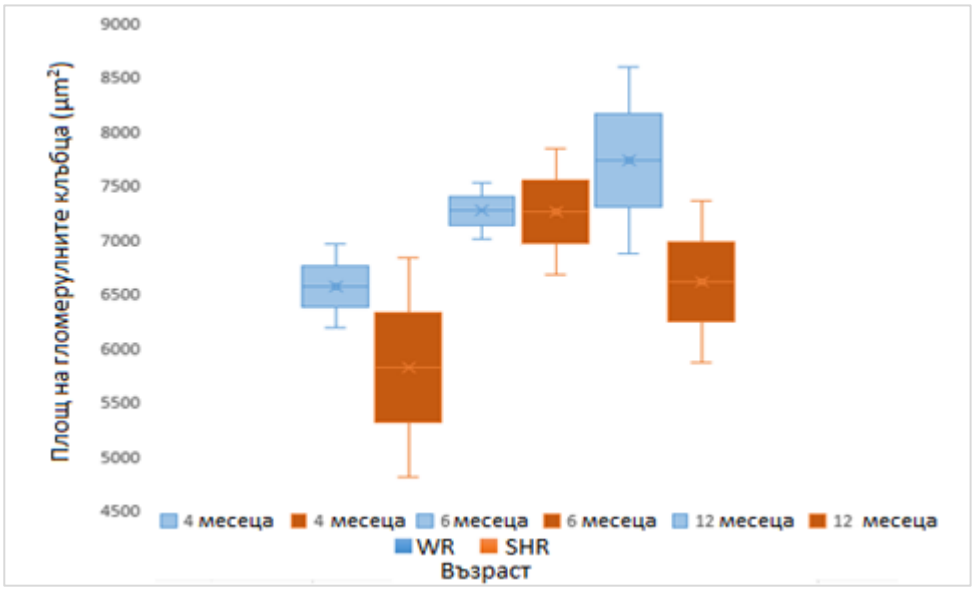
Визуалният анализ на диаграмата Box Plot показва, че при дванадесетмесечните Wistar плъхове и SHR има явно изразени различия – контролната група е със средно доста по-малко от експерименталната. При четиримесечните плъхове средните показатели и съответните довеерителни интервали в контролната група са леко занижени. При шестмесечните плъхове няма значими различия между средните, но има при доверителния интервал за средното (фиг. 62).

WR	Кортикални нефрони		SHR	Кортикални 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	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.



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

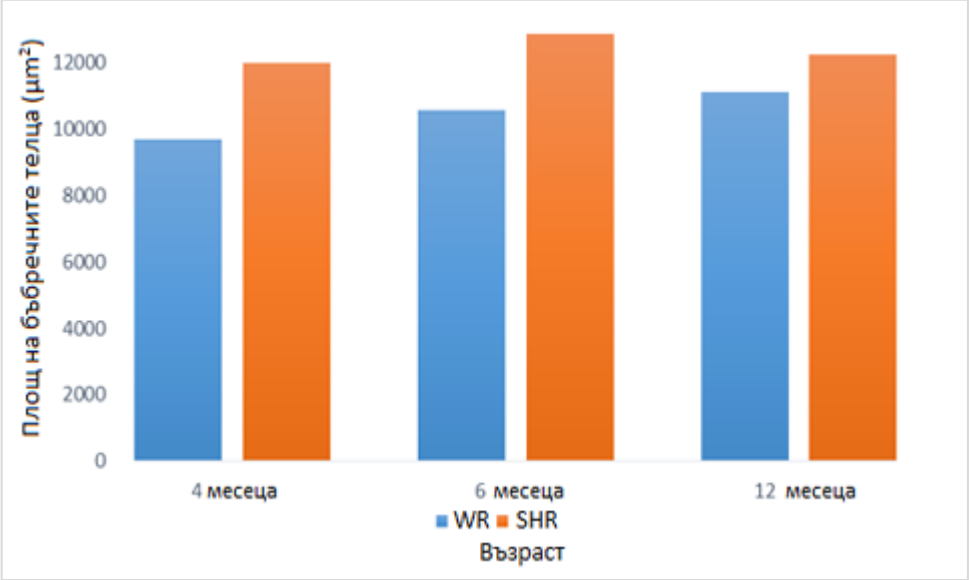


Фиг. 62. Сравнителен анализ на площта на гломерулните клъбца на кортикални нефрони при Wistar плъхове и SHR.

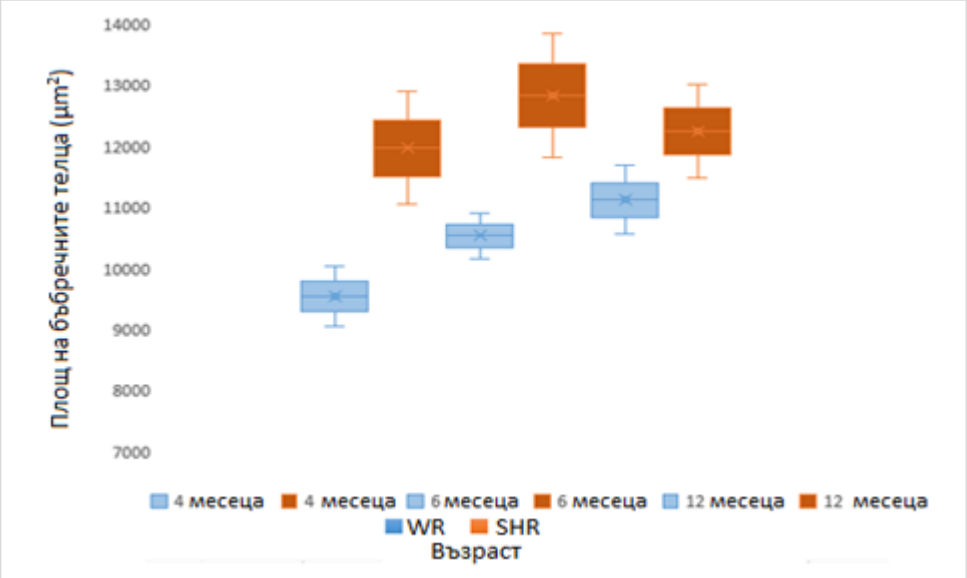
4.4. Сравнителна количествена характеристика на площта на бъбречните телца и гломерулите на юкстамедуларни нефрони презразлични етапи от постналното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR

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 съществено 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. При нормотензивните групи плъхове се наблюдава плавно нарастване на площта, докато при SHR началното нарастване на площта, достигаща най-висока стойност при шестмесечните плъхове, израз на развита хипертрофия, се последва от понижение в стойностите при старата група плъхове, което обясняваме с развиващия се процес на хипертензивна гломерулосклероза (фиг. 63; таблица 7).

Визуалният анализ на диаграмата Box Plot показва явно 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.

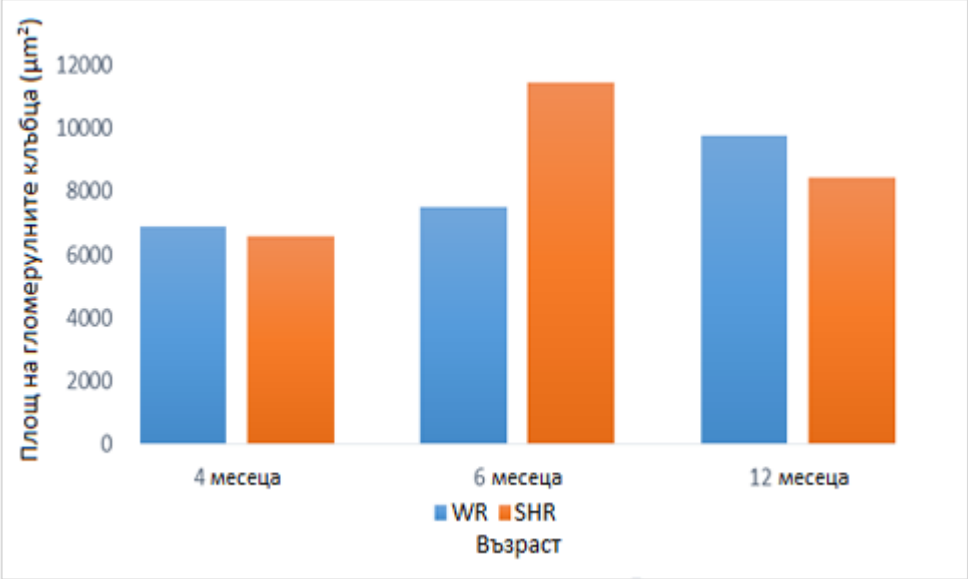
WR	Юкстамедуларни нефрони		SHR	Юкстамедуларни нефрони		TTEST
	Площ на бъбречни телца (μm^2)			Площ на бъбречни телца (μm^2)		
Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	Възраст	Ср. стойност	Ст. отклонение	
4 месеца	9664,4	487,9	4 месеца	11975,1	921,9	P<0,00001
6 месеца	10561,1	377,1	6 месеца	12834,3	1020	P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

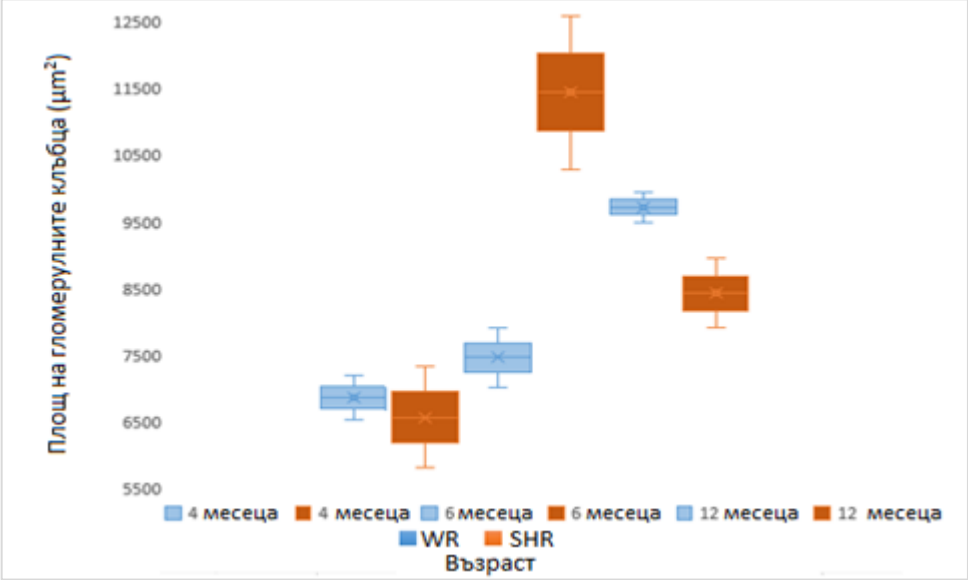
Сравнителният анализ при четиримесечните групи плъхове не показва съществени различия на площта на гломерулните клъбца на юкстамедуларните нефрони, като нормотензивната група се характеризира с незначително по-голяма стойност на изследвания морфометричен показател. При шестмесечните групи се наблюдава 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).

Визуалният анализ на диаграмата Box Plot показва, че при четиримесечните групи животни 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 (µm²)			Площ на гломерулни клъбца (µm²)		
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.

VI. Обсъждане

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

Както според налични данни в литературата (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 органни 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). Чрез детайлни хистологични анализи, Tracy и съавтори (1988) предлагат модел за разграничаване на два вида нефросклероза – в резултат на нормалния процес на стареене и артериална хипертония. Въпреки това, трудно би било да се определи с точност механизма на развитие на нефросклерозата – вследствие на стареене, дълготрайна хипертония или друг подлежащ патологичен процес. 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 оттдава 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). При изследвания на пациенти от черната раса, при които артериалната хипертония настъпва в сравнително млада възраст и има по-агресивен ход се установява, че бъбречните съдови изменения характерни за нефросклерозата могат да бъдат наблюдавани преди съществено повишаване на кръвното налягане (Tracy 1996). 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 експериметални животни (Zhou и съавт. 2003; Gonzalez и съавт. 2002; Navar 2004). При модифицирани модели с липсващ ген за ангиотензин II са налице значителни хистологични промени в бъбречната структура, което демонстрира, че ренинът има увреждащ съдовите структури ефект (Kim и съавт. 1995).

Според Feld и съавтори (1977) не се установяват морфологични различия в структурата на бъбрек при SHR и Wistar плъхове до 30 седмица от постналталното 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 й 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 40×10^6 μm^3 епителна тъкан в бъбречната структура у плъх, като този обем се заема от съединителнотъканни повлекла (Venkatachalam и съавт. 2010).

Към описаните в литературата 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 тендеция 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, защото 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; Eknoyan и съавт. 1990). Причината за това, е че не всички гломерулни клъбца, които са представени с ясно разграничими капилярни лумени са функционално годни. През далечната 1935 година Oliver описва т.нар. атубулни гломерули, които се характеризират с липса на връзка с проксималните тубулни сегменти (Oliver 1935). Още повече при оценяване на бъбречни биопсии почти винаги се установява стеноза на гломеруло-

тубулната връзка и атрофия на проксималния тубулен сегмент при гломерули с перигломеруларна фиброза (Gibson и съавт. 1996; Lindop и съавт. 2002).

В противовес на изложената по-горе информация, редица 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). Това би довело до погрешни заключения за по-тежки структурни изменения по хода на тубулоинтерстициума, както и подценяване степента на гломерулната увреда във връзка с изчезването на склерозиралите гломерули. Нови изследвания показват, че най-добра корелация с бъбречната функция има броя на фукнциониращите нефрони (Bajema 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 дегенерирали тубули. Част от резултатите ни потвърждадат това становище, тъй като 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 (Hoy 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 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. В действителност чрез трихромното оцветяване по Малори ние демонстрираме и наличието не само на описаните в литературата количествени различия, но и на качествени промени между младата група SHR и Wistar плъховете, които се представят с повишено разрастване на съединителнотъканни елементи, в частност отлагането на фини колагенни влакна перигломерулярно и по хода на тубулоинтерстициума при хипертензивните животни.

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 демонстрира 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 1и 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. Изследвания показват, че при намалената им численост, тубулоинтерстициалните промени са по-слабо изразени (Heymann и съавт. 2009). Съществуват предположения, че посочените клетки имат индиректно участие в този процес чрез активиране на Т-лимфоцитите (Snelgrove и съавт. 2012). Bohle и съавтори (1996) отдават значение на намалението в плътността на перитубуларно разположените капиляри в развитието на тубулоинтерстициалната фиброза. 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 интерстицума 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. Освен това тези клетки се характеризират със способност да синтезират актинови филаменти, растежни фактори като хемокини и цитокини, имащи знаение за ремоделирането на тубулоинтерстициума (Johnson 1997). Нови изследвания показват,че в процеса на стареееене 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 левкоклетъчна инфилтрация е важен фактор в

прогресирането на тубулоинтерстициалната фиброза. Остеопонтинът е протеинова молекула имаща съществена роля в агрегацията на левкоцитите и при патологични условия се представя с повишена експресия по хода на проксималните и дистални тубулни сегменти (Pichler и съавт. 1994).

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. Израз на нарушената бъбречна функция са и наблюдаваните протеинови отлагания по хода на тубулните сегменти, които редица автори описват като т.нар. псевдотироидни области (Meyrier 1999). Посочените морфологични промени при нормотензивните контроли са представени в много по-малка степен и не се наблюдават съществени различия между двете части на кората. По литературни данни оценяването на тубулната увреда може да се осъществи и чрез имунохистохимичната експресия на тубулен виментин. Така например през постналното развитие на SHR и Wistar плъховете е налице засилваща се имуноекспресия на виментин във вътрешния кортекс съчетана с относително положителна реакция във външния кортекс.

Авторите потвърждават нашето становище за по-изразена тубулна увреда при SHR, но уточняват, че засегнати са предимно проксималните тубулни сегменти, като тези находки имат фокално разпределение и се развиват паралелно с гломерулосклерозата на юкстамедуларните нефрони (Ofstad и Iversen 2005). Ние също подкрепяме установената положителна зависимост между гломерулосклерозата и настъпващите тубулоинтерстициални промени. Това фокално разпределение на тубулната атрофия може да бъде обяснена с факта, че разположените във вътрешните две трети на кората нефрони са най-уязвими към увреда в условията на артериална хипертония.

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).

В заключение артериалната хипертония несъмнено способства за по-ранния и агресивен ход на морфологичните промени в бъбречните телца и тубулоинтерстициума. Резултатите ни потвърждават, че в по-голямата си част тези изменения са неспецифични и могат да бъдат демонстрирани дори и в процеса на нормалното стареене на бъбрека.

2. Ултраструктурни промени в нефроните и интерстицума 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 възрастни 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 постналното 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 интрагломерулярно 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 електронноплътни 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 елетронномикроскопско 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 интрагломерулярно 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, стимулиращи 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 трансмембранния протеин подокаликсин (Li и съавт. 2013). Интересно е да се отбележи, че се обсъжда ролята на този протеин в развитието 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. Функционално тези клетки са свързани с продукцията на вазодилатиращи субстанции и електронномикроскопски в цитоплазмата им се описват три основни вида гранули – хомогенно тъмни, сиви и със слоист строеж, като последните са представени с по-ниска електронна плътност в периферната си част. По хода на интерстициума се установява наличието на свободни гранули, които показват сходна морфология с тези наблюдавани в интерстициалните клетки. Относно произхода им се приема, че произлизат

от интерстициалните клетки чрез секреция, което е демонстрирано у плъх (Mandal и съавт. 1975). Изследвания върху съдържанието на гранулите показват, че при плъхове основен компонент са липидните капки и гликопротеини (Bulgar и съавт. 1967). Интерстициалните клетки имат съществено значение за контрола на нормалното кръвно налягане, което се подкрепя от факта, че при малигнена ренална хипертония те се характеризират с понижена грануларна плътност (Muehrecke и съавт. 1970).

Sunaga и съавтори (1979) в своето елетронномикроскопско сравнително изследване за съдържанието на осмофилни гранули в интерстициалните клетки на бъбречната медула и папила при SHR и Wistar плъхове, описват два клетъчни типа. В цитоплазмата на първия тип клетки се намират голям брой осмофилни гранули и разширения на ендоплазмения ретикулум, както и цитоплазмени израстъци влизащи в контакт със стени на капиляри, събирателни каналчета и примката на Хенле. Вторият тип клетки се представят с по-малко съдържание на гранули, като влизат в контакт с капиляри и различни тубулни сегменти. Авторите 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 елетронномикроскопски 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 митоходриите и ендоплазмения ретикулум (He и съавт. 2014). Налице са данни, според които функционалния 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 митохондриите, което е признак за тяхната увреда, както и разширяване на ендоплазмения ретикулум (Garcia-Pinto и съавт. 2011). Дискутабилен е въпроса относно генезата на развиващите се структурни изменения на ендоплазмения ретикулум като значение се отдава на ролята на оксидативния стрес, развиващ се в резултат на митохондриалния дефицит (Tian и съавт. 2009). Налице са и сравнителни елетронномикроскопски морфометрични изследвания на обема на митоходриите и площта на кристите на вътрешната митохондриална мембрана на клетките тапициращи проксималните извити каналчета, както и на правите дистални и медуларни събирателни тубулни сегменти при хипертензивни и нормотензини плъхове. Резултатите показват, че в условия на артериална хипертония не се установяват съществени различия на изследваните показатели по хода на проксималните каналчета, в сравнение с контролната група животни. Съществени количествени промени в структурата на митохондриите се установяват при хипертензивните плъхове в дисталните тубулни сегменти, които се характеризират с по-голям обем, както и с нарастване на площта на кристите (Postnov и Perov 1977).

Налице са изследвания, които описват настъпващите ултраструктурните промени в гломерулните капилярни клъбца и ЮГА в условия на бенигнена и малигнена артериална хипертония у човек. При бенигнената хипертония, която е с по-доброкачествен ход, основните гломерулни изменения са представени от разрастване на мезангиалния матрикс, както и развитие на мезангиална хиперплазия като клетките са с

добре развит апарат на Голджи и интрацелуларно се установяват микровезикули и отлагания от липофусцин (McLaren и MacDonald 1983).

От друга страна, артериоларният клетъчен компонент на ЮГА в условия на хипертония се характеризира с хиперцелуларитет и цитоплазмена грануларна хетерогенност, като се описват кръгли, овални и незрели гранули, като последните са с приблизително ромбовидна форма. Клетките на macula densa се представят с множество периферно разположени микровезикули (McLaren и MacDonald 1983).

При малигнената артериална хипертония гломерулните капиляри са с нагънати контури и стеснени лумени, както и с плътно оксифилни базални мембрани, поради инсудация на плазмени протеини и фибрин (McLaren и MacDonald 1983). В настоящата работа описаните по-горе изменения бяха най-демонстративни при дванадесетмесечната хипертензивна група. Разрастването на гломерулярния матрикс е съпроводено и от промени в мезангиалните клетки, в които се установяват множество микровезикули, неспецифични осмофилни агрегати и по-малък брой секреторни гранули. По отношение на артериоларния компонент на ЮГА основните ултраструктурни промени включват дегенерация на ендотелни клетки, както и увеличен брой секреторни клетки, които са с добре развити апарат на Голджи, митохондрии и ядра с неправилна форма и разширения по протежение на външната ядрена мембрана. Морфологични признаци за повишена функционална активност на тези клетки са интрацелуларно разположени мембранно ограничени сакове, по чиито контури се наблюдават пространства с кристалоидни включвания. Към ултраструктурните изменения по хода на артериолите се отнасят и наличието на оксифилен грануларен материал в медията, както и фокално отлагане на фибрилерен фибрин. В областта между macula densa и юкстагломерулярните клетки, в перитубуларните цитоплазмени израстъци се наблюдава голям брой покрити везикули. Клетките на macula densa са по-ниски, със слабо изразена микровилозност и редуциран брой клетъчни

органели, като се наблюдава раздуване на митохондриите и фрагментиране на кристи (McLaren и MacDonald 1983). В настоящата работа наблюдаваните ултрастуктурни промени в SHR показват по-голямо сходство с тези описани при малигнената хипертония в човешката популация, което свидетелства за агресивния ход на бъбречната увреда.

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. Освен това, факта, че метаплазията се наблюдава в отсъствие патологичен процес подсказва, че този процес може да няма пряка връзка с развитието на повишено кръвно налягане.

В заключение най-съществените ултраструктурни промени при SHR включват повсеместно задебеляване на гломерулните и тубулни базални

мембрани, като този процес е най-ясно изразен по хода на вътрешните две трети на кортекса. Съществена находка по хода на проксималните и дистални тубулни сегменти е увеличаване пространството между клетките на тапициращия ги епител, като тези промени са в тясна корелация с давността на артериалната хипертония.

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

В представения труд са изследвани и анализирани детайлно морфометричните показатели площ на бъбречните телца и гломерулни клъбца на кортикални и юкстамедуларни нефрони на нормотензивни Wistar плъхове и SHR, проследени в три възрастови групи (млади – четиримесечни, зрели – шестмесечни и възрастни – дванадесетмесечни). Това дава възможност да се оценят в динамика настъпващите промени в посочените параметри в резултат на процеса на стареене и в условия на повишено кръвно налягане.

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 асоцирани 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 гломерулярен 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 постналталното 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 постналталното 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 юксамедуларни 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 μм (Banik и Aktar 2014).

Според Hughson и съавтори (2003) средния гломерулярен обем е в пряка зависимост от броя на нефроните в бъбрека, като по-малкия брой нефрони обуславя по-голям гломерулярен обем. В своето изследване Haruhara и съавтори (2015) не откриват съществени различия в средната гломерулярна плътност при нормотензивни и хипертензивни донори. Всъщност ниската гломерулярна 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 гломерулярен 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 афроамерикаци 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 филогететично 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 постналталното 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 конролната група животни. Въпреки това, в литературата стойностите на гломерулните размери при плъхове без налична патология варират в широки граници. Някои автори обясняват този факт с различните техники при изготвянето на препарати от бъбрек (Miller и Meyer 1990), както и използването на различни стереологични методи (Lane и съавт. 1992).

4. Роля на азотния оксид и експресия на невроналната азотен оксид синтаза през постналталното 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 й активност на съдовия тонус (Ichihara и съавт. 1998). Прилагането на селективен инхибитор на nNOS предизвиква артериална хипертония, която някои атвори обясняват с повишена активност на ТГОБ, 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 (Hayakawa и Raij 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.

Активността на nNOS се контролира посредством механизма на обратна връзка, фосфорилиране и свързването на Ca^{2+} с калмодулин (Kone

и Baylis 1997). Освен това, Jaffrey и Snyder (1996) изолират от плъши хипокамп т.нар. протеинен инхибитор на nNOS, който свързвайки се с нея води до дестабилизиране на димерната й структура. Счита се, че тази молекула има регулаторна функция, която е строго специфична само по отношение на nNOS, защото липсват домени за свързването й с другите две изоформи на ензима (Fan и съавт. 1998). 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, тъй като от направения литературен обзор превалираща 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 й 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 Бауманова 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. Освен това се описват голям брой имунореактивни тубулни клетки по хода на медулата, които са с кубична форма, интензивно оцветена цитоплазма и морфологично се отнасят към интеркалатните клетки на събирателните каналчета. Към структурите на бъбречния кортекс, в които се наблюдава експресия на nNOS са клетките на macula densa, както и в клетките на париеталния и висцералния лист на Баумановата капсула. Нашите резултати също потвърждават тенденцията за нарастваща имуноекспресия на nNOS при SHR по протежение на бъбречната медула и структурните елементи на бъбречните телца. При Wistar плъховете в младата възрастова група се наблюдава положителна имуноекспресия в клетките на париеталния и висцерален лист на Баумановата капсула, докато в сравнимите по възраст SHR се установява силно положителна реакция в областта на гломерулните клъбца, включително и по хода на събирателните тубулни сегменти.

Важното регулаторно значение на продуцирания от nNOS NO се демонстрира не само в патологични условия, но и при редица физиологични състояния на организма. По време на бременност наблюдаваните повишения на бъбречния кръвоток и гломерулната филтрационна честота, както и понижението на средното артериално налягане се асоциират с увеличена продукция на NO. От направената литературна справка се установяват преки и косвени данни относно промените в активността на изоформите на NOS. Редица автори отдават значение на повишена активност на nNOS за описваните хемодинамични промени в условия на бременност (Alexander и съавт. 1999; Santmyire и Baylis 1998). Въпреки важната роля на nNOS за протичането на нормална бременност, несигурни са данните относно механизмите, посредством които тази изоформа повлиява на бъбречната хемодинамика (Kone и Baylis 1997). Във връзка с това са проведени множество изследвания използващи

селективен инхибитор на nNOS. Резултатите показват, че краткотрайното прилагане на инхибитора извън бременност не предизвиква съществени промени в бъбречната хемодинамика, докато у бременни плъхове се наблюдава 25% понижение на гломерулната филтрационна честота и 60% увеличение на интрареналната съдова резистентност (Abram и съавт. 2001). Тези данни дават основание да се предположи, че по време на бременност nNOS се характеризира с повишена активност и има ключова роля в настъпващите хемодинамични промени. Трябва да се отбележи, че краткотрайното селективно инхибиране на nNOS не води до промяна в средното артериално налягане, докато хроничното инхибиране на изоформата има за резултат развитие на артериална хипертония (Braam 1999).

В хода на хроничната бъбречна увреда и терминална бъбречна недостатъчност много автори установяват развитието на дефицит по отношение на продуцирания в бъбрека NO в различни експериментални модели животни, включително и у човек (Schmidt и Baylis 2000; Wagner и съавт. 2002). В действителност nNOS се характеризира с широк спектър от регулаторни функции, които варират в зависимост от локализацията й в бъбречната структура. Така например експресираната nNOS във вътрешната медула е включена в дълготрайната регулация на кръвното налягане. Това се потвърждава от факта, че селективното инхибиране на изоформата у плъхове подложени на повишен солеви прием има за резултат развитие на артериална хипертония (Mattson и Bellehumeur 1996). От друга страна експресията на nNOS в клетките на macula densa се асоциира с контрола на ТГОВ и продукцията на ренин (Kone и Baylis 1997).

Редица изследвания подчертават изразения ренопротективен ефект на продуцирания от NOS NO в различни експериментални модели животни. Прилагането на инхибитори на NOS у здрави плъхове води до развитие на артериална хипертония и хронична бъбречна увреда (Baylis и

съавт. 1992). Въпреки това налице са и данни за намалена активност на NOS в условия на частична нефректомия, което се асоциира с редуциране предимно на две от изоформите на ензима - eNOS и iNOS (Aiello и съавт. 1997). Противоречиви са резултатите относно експресията на nNOS, тъй като изследванията демонстрират случаи, както на намалена, така и на повишена активност на изоформата (Roczniak и съавт. 1999; Vaziri и съавт. 2002).

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 дава основание да предположим, че повишената експресия на изоформата има изразен нефропротективен ефект в условия на артериална хипертония. 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.

VII. 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 плъхове.

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

3. През постналното 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 показа 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.

VIII. Приноси

<u>Научни приноси с оригинален характер:</u>

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.

<u>Научни приноси с потвърдителен характер:</u>

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.

IX. Публикации по дисертационния труд

1. **Stanchev S**, Iliev A, Malinova L, Landzhov B, Ovtscharoff 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.

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, Sofia, Program, p. 5.

XI. Библиография

Витанова Л, Гърчев Р (2008) Физиология на човека. 1-во издание, Арсо. стр.278.

Abbate M, Zoja C, Remuzzi G (2006) How does proteinuria cause progressive renal damage? J Am Soc Nephrol. 17(11):2974-2984.

Abram SR, Alexander BT, Bennett WA, Granger JP (2001) Role of neuronal nitric oxide synthase in mediating renal hemodynamic changes during pregnancy. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 281(5):R1390-R1393.

Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1993) Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. Proc Natl Acad Sci USA. 90(22):10769–10772.

Agre P, Brown D, Nielscn S (1995) Aquaporin water channels: Unanswered questions and unresolved controvcrsics. Curr Opin Cell Biol. 7(4):472-483.

Ahn KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC (1994) In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in the rat kidney. Am J Physiol. 267:F748–F757.

Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, Benigni A, Corna D, Zoja C, Cavallotti D, Remuzzi G (1997) Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. Kidney Int. 52(1):171-181.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 357(3):593–615.

Alexander BT, Miller MT, Kassab S, Novak J, Reckelhoff JF, Kruckeberg WC, Granger JP (1999) Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. Hypertension. 33:435–439.

Allen F, Tisher CC (1976) Morphology of the ascending thick limb of Henle. Kidney Int. 9(1):8-22.

Alper SL, Natale J, Gluck S, Lodish HE, Brown D (1989) Subtypes of intercalated cells in rat kidney cbllecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H+-ATPase. Proc Natl Acad Sci USA. 86(14):5429-5433.

Alpers CE, Hudkins KL, Floege J, Johnson RJ (1994) Human renal cortical interstitial cells with some features of smooth muscle cells participate in tubulointerstitial and crescentic glomerular injury. J Am Soc Nephrol. 5(2):201-209.

Arataki M (1926) On the postnatal growth of the kidney, with special reference to the number and size of the glomeruli (albino rat). Am J Anat. 36(3)399-436.

Artacho-Perula E, Roldan-Villalobos R, Salcedo-Leal I, Vaamonde-Lemos R (1993) Stereological estimates of volume-weighted mean glomerular volume in streptozotocin-diabetic rats. Lab Invest. 68(1):56-61.

Bachmann S, Bosse HM, Mundel P (1995) Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. Am J Physiol. 268: F885–F898.

Bachmann S, Bosse HM, Mundel P (1995) Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. Am J Physiol. 268: F885–F898.

Bajema IM, Hagen EC, Hermans J, Noël LH, Waldherr R, Ferrario F, Van Der Woude FJ, Bruijn JA (1999) Kidney biopsy as a predictor for renal outcome in ANCA-associated necrotizing glomerulonephritis. Kidney Int. 56(5):1751-1758.

Banik S, Aktar F (2014) Diameter of renal corpuscles of Bangladeshi people in different age groups. J Enam Med Col. 4(1):36-38.

Baylis C, Corman B (1998) The aging kidney: insights from experimental studies. J Am Soc Nephrol. 9(4):699-709.

Baylis C, Mitruka B, Deng A (1992) Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. J Clin Invest. 90(1):278–281.

Beierwaltes WH (1994) Macula densa derived neuronal nitric oxide synthesis revisited: a systematic review. Ageing Res Rev. 14:65-80.

Berkelmans HS, Burton GA, Schipper J, De Vente J (1991) Effects of atrial natriuretic factor, nitroprusside and acetylcholine on cGMP immunostaining in the isolated perfused rat kidney. Histochemistry. 96(1):13–19.

Biondi ML, Romero JC (1990) Nitric oxide-mediated reactions stimulate cGMP in the dog kidney. J Vasc Med Biol. 2:294–298.

Black MJ, Wang Y, Bertram JF (2002) Nephron endowment and renal filtration surface area in young spontaneously hypertensive rats. Kidney Blood Press Res. 25(1):20-26.

Boberg U, Persson AEG (1985) Tubuloglomerular feedback during elevated renal venous presure. Am J Physiol. 249:F524–F531.

Boberg U, Persson AEG (1986) Increased tubuloglomerular feedback activity in Milan hypertensive rats. Am J Physiol. 250:F967–F974.

Bocheva G, Landzhov B, Bozhilova-Pastirova A (2012) NOS activity in hypothyroid rat skin. Compt Rend Acad Bulg Sci. 65:1003-1008.

Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H, Grund KE, Wehrmann M, Batz Ch, Bogenschütz O, Schmitt H, Nagy J, Müller C, Müller G (1990) The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies: a morphometric and cytological analysis. Pathol Res Pract. 186(1):135–144.

Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M (1996) Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. Kidney Blood Press Res. 19:191-195.

Bohrer MP, Baylis C, Humes HD, GIassock RJ, Robertson CR, Brenner BM (1978) Permselectivity of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations. J Clin Invest. 61(1):72-78.

Bolignano D, Mattace-Raso F, Sijbrands EJ, Zoccali C (2014) The aging kidney does not mediate renal baroreceptor stimulated renin secretion. J Am Soc Nephrol. 5:573.

Boor P, Ostendorf T, Floege J (2010) Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. Nat Rev Nephrol. 6(11):643-656.

Borke JL, Minami J, Verma A, Penniston JT, Kumar R (1987) Monoclonal antibodies to human erythrocyte membrane Ca++-Mg++ adenosine triphosphatase pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells. J Clin Invest. 80(5):1225-1231.

Bouriquet N, Casellas D (1995) Chronic L-NAME hypertension in rats and autoregulation of juxtamedullary preglomerular vessels. Am J Physiol. 269:F190–F197.

Braam B (1999) Renal endothelial and macula densa NOS: integrated response to changes in extracellular fluid volume. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol. 276: R1551–R1561.

Brenner BM, Bohrer MP, Baylis Ch, Deen WM (1977) Determinants of glomerular permselectivity: Insights derived from observations in vivo. Kidney Int. 12(4):229-237.

Brenner BM, Garcia DL, Anderson S (1988) Glomeruli and blood pressure. Less of one, more of the other? Am J Hypertens. 1:335-347.

Briggs JP, Schnermann JB (1996) Whys and wherefores of juxtaglomerular apparatus function. Kidney Int. 49(6):1724-1726.

Bright R (1836) Cases and observations illustrative of renal disease accompanied with secretion of albuminous urine. Guy's Hosp Rep. 1:338-350.

Brown D, Hirsch S, Gluck S (1988) An H+-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. Nature. 331(6157):622-624.

Brown R, Ollerstam A, Persson AEG (2003) Neuronal nitric oxide synthase inhibition sensitizes the tubuloglomerular feedback mechanism after volume expansion. Kidney Int. 65(4):1349-1356.

Brunner K, Tortschanoff A, Hemmens B, Andrew PJ, Mayer B, Kungl AJ (1998) Sensitivity of flavin fluorescence dynamics in neuronal nitric oxide synthase to cofactor-induced conformational changes and dimerization. Biochemistry. 37(50):17545–17553.

Buga G, Gold M, Fukuto J, Ignarro L (1991) Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. Hypertension. 17(2):187–193.

Bulgar RE, Tisher CC,Trump BF (1967) Human renal ultrastructure. II. The thin limb of Henle's loop and the interstitium in healthy individuals. Lab Invest. 16(1):124-141.

Caulfield JP, Farquhar MG (1974) The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane as the primary filtration barrier. J Cell Biol. 63(3):883-903.

Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS (2002) Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. Hypertension. 39(2):269–274.

Chan KW, Leung CY, Chan CW (1990) Age-related glomerular sclerosis: baseline values in Hong Kong. Pathology. 22(4):177-180.

Chang RL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM (1975) Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. Kidney Int. 8(4):212-218.

Choi JY, Nam SA, Jin DC, Kim J, Cha JH (2012) Expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat kidneys. J Histochem Cytochem. 60(4):301-315.

Christiansen RE, Tenstad O, Leh S, Iversen BM (2004) Glomerular charge selectivity is impaired in hypertensive nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 19(5):1083-1091.

Clapp WL, Madsen KM, Verlander JW, Tisher CC (1987) Intercalated cells of the rat inner medullary collecting duct. Kidney Int. 31(5):1080-1087.

Clapp WL, Madsen KM, Verlander JW, Tisher CC (1989). Morphologic heterogeneity along the rat inner medullary collecting duct. Lab Invest. 60(2):219-230.

Colvin RB, Chang A, Farris AB (2012) Diagnostic Pathology: Kidney Diseases. Kidney Int. 81:715–717.

Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. Science. 279(5359):2121-2126.

Čukuranović R, Vlajković S (2005) Age related anatomical and functional characteristics of human kidney. Med Biol. 12(2):61-69.

Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ (1996) Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. Circulation. 94(12):3246-50.

Daniels FH, Arendshorst WJ, Roberds RG (1990) Tubuloglomerular feedback and autoregulation in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol. 258:F1479-1489.

Davidson AJ, Talner LB, Downs WM 3rd (1969) A study of the angiographic appearance of the kidney in an aging normotensive population. Radiology. 92(5):975-983.

Dickhout JG, Lee RM (1998) Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol. 274:H794-H800.

Duančić V (1968) Osnovi embriologije čovjeka. Beograd-Zagreb, Hrvatska.

Dzambazova E, Landzhov B, Bocheva A, Bozhilova-Pastirova (2011a) A effects of D-kyotorphin on nociception and NADPH-d neurons in rat's periaqueductal gray after immobilization stress. Amino Acids. 41:937-944.

Dzambazova E, Landzhov B, Bocheva A, Bozhilova-Pastirova (2011б) A effects of kyotorphin on NADPH-d reactive neurons in rat's cerebral cortex after acute immobilization stress. Compt Rend Acad Bulg Sci. 64:1779-1784.

Eknoyan G, McDonald MA, Appel D, Truong LD (1990) Chronic tubulo-interstitial nephritis: correlation between structural and functional findings. Kidney Int. 38(4):736-743.

Eulderink F (1964) Adenomatoid changes in Bowman's capsule in primary carcinoma of the liver. J Pathol Bacteriol. 87:251-254

Evan AP, Luft FC, Gattone V, Connors BA, MaCarron DA, Willis LR (1981) The glomerular filtration barrier in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension. 3:I154-I161.

Fan JS, Zhang Q, Li M, Tochio H, Yamazaki T, Shimizu M, and Zhang M (1998) Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme. J Biol Chem. 273(50):33472–33481.

Farris AB, Colvin RB (2012) Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. Curr Opin Nephrol Hypertens. 21(3):289-300.

Feld LG, Van Liew JB, Brentjens JR, Boylan JW (1981) Renal lesions and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat made normotensive by treatment. Kidney Int. 20:606-614.

Feld LG, Van Liew JB, Galaske RG, Boylan JW (1977) Selectivity of renal injury and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat. Kidney Int. 12(5):332-343.

Feldman DL, Mogelesky TC, Chou M, Jeng AY (2000) Enhanced expression of renal endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-A-receptor mRNA in rats with interstitial fibrosis following ureter ligation. J Cardiovasc Pharmacol. 36:S255-S259.

Fernández AP, Serrano J, Castro S, Salazar FJ, López JC, Rodrigo J, Nava E (2003) Distribution of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in the kidney of spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 21(12):2375-2388.

Fischmann TO, Hruza A, Niu XD, Fossetta JD, Lunn CA, Dolphin E, Prongay AJ, Reichert P, Lundell DJ, Narula SK, Weber PC (1999) Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. Nat Struct Biol. 6(3):233-242.

Flack JM, Ferdinand KC, Nasser SA, Rossi NF (2010) Hypertension in special populations: chronic kidney disease, organ transplant recipients, pregnancy, autonomic dysfunction, racial and ethnic populations. Cardiol Clin. 28(4):623-638.

Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 33(7):829-837.

Franco M, Bell PD, Navar LG (1988) Evaluation of prostaglandins as mediators of tubuloglomerular feedback. Am J Physiol. 254:F642– F649.

Friedman PA, Gesek FA (1995) Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. Physiol Rev. 75(3):429-471.

Furness PN, Taub N (2001) Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures (CERTPAP) Project. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. Kidney Int. 60(5):1998-2012.

Garcia-Pinto AB, de Matos VS, Rocha V, Moraes-Teixeira J, Carvalho JJ (2011) Low-Intensity physical activity beneficially alters the ultrastructural renal morphology of spontaneously hypertensive rats. Clinics. 66(5):855-863.

Gattone VH 2nd, Evan AP, Willis LR, Luft FC (1983) Renal afferent arteriole in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension. 5(1):8-16.

George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. Development. 119(4):1079-1091.

Georgiev GP (2015) Age-related changes in human intervertebral discs. A comperative light-microscopic, electron-microscopic and histohemical study. IJTRA. 3:89-93.

Gibson IW, Downie TT, More IA, Lindop GB (1996) Atubular glomeruli and glomerular cysts--a possible pathway for nephron loss in the

Goldblatt PJ, Gohara AF, Kahn NH, Hampton JA (1989) Benign and malignant nephrosclerosis and renovascular hypertension. JB Lippincott, Philadelphia, USA.

Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Querejeta R, Larman M, Diez J, Fortuno MA (2002) Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension potential role of angiotensin II. Hypertension. 39:75-80.

Gorren AC, Schrammel A, Schmidt K, Mayer B (1998) Effects of pH on the structure and function of neuronal nitric oxide synthase. Biochem J. 331(3):801-807.

Gourtsoyiannis N, Prassopoulos P, Cavouras D, Pantelidis N (1990) The thickness of the renal parenchyma decreases with age: a CT study of 360 patients. Am J Roentgenol. 155(3):541-544.

Griffiths GJ, Robinson KB, Cartwright GO, Mclachlan MS (1976) Loss of renal tissue in the elderly. Br J Radiol. 49(578):111-117.

Haensly WE, Granger HJ, Morris AC, Cioffe C (1982) Proximal-tubule-like epithelium in Bowman's capsule in spontaneously hypertensive rats. Changes with age. Am J Pathol. 107(1):92-97.

Hamm LL, Weiner ID, Vehaskari VM (1991) Structural-functional characteristics of acid-base transport in the rabbit collecting duct. Semin Nephrol. 11(4):453-464.

Hansen GP, Tisher CC, Robinson RR (1980) Response of the collecting duct to disturbances of acid-base and potassium balance. Kidney Int. 17(3):326-337.

Haruhara K, Tsuboi N, Kanzaki G, Koike K, Suyama M, Shimizu A, Miyazaki Y, Kawamura T, Ogura M, Yokoo T (2015) Glomerular density in biopsy-proven hypertensive nephrosclerosis. Am J Hypertens. 28(9):1164-1171.

Hayakawa H, Raij L (1998) Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. Hypertension. 31:266-270.

He X, Liu Y, Usa K, Tian Z, Cowley AW Jr, Liang M (2014) Ultrastructure of mitochondria and the endoplasmic reticulum in renal tubules of Dahl salt-sensitive rats. Am J Physiol Renal Physiol. 306(10):F1190-F1197.

He XR, Greenberg SG, Briggs JP, Schnermann JB (1995) Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus. Am J Physiol. 268:F953-F959.

Hebert SC, Gamba G, Kaplan M (1996) The electroneutral Na(+)-(K+)-CI- cotransport family. Kidney lnt. 49:1638-1641.

Hediger MA, Smith CP, You G, Lee WS, Kanai Y, Shayakul C (1996) Structure, regulation and physiological roles of urea transporters. Kidney Int. 49(6):1615-1623.

Heuzé-Joubert I, Mennecier P, Simonet S, Laubie M, Verbeuren TJ (1992) Effect of vasodilators, including nitric oxide, on the release of cGMP and cAMP in the isolated perfused rat kidney. Eur J Pharmacol. 220(2-3):161-171.

Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Gröne HJ, Kurts C (2009) Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. J Clin Invest. 119(5):1286-1297.

Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D (1991) The effect of intrauterine growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the “disector” method and Cavalieri principle. Lab Invest. 64(6):777–784.

Hinova-Palova DV, Edelstein L, Landzhov B, Minkov M, Malinova L, Hristov S, Denaro FJ, Alexandrov A, Kiriakova T, Brainova I, Paloff A, Ovtscharoff W (2014) Topographical distribution and morphology of NADPH-diaphorase-stained neurons in the human claustrum. Front Syst Neurosci. 27:8-96.

Hollenberg NK, Adams DF, Solomon HS, Rashid A, Abrams HL, Merrill JP (1974) Senescence and the renal vasculature in normal man. Circ Res. 34(3):309-316.

Hoy WE, Douglas-Denton RN, Hughson MD, Cass A, Johnson K, Bertram JF (2003) A stereological study of glomerular number and volume: preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. Kidney Int Suppl. (83):S31-S37.

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. Cell. 75(7):1273-1286.

Hughes MN (2008) Chemistry of nitric oxide and related species. Methods Enzymol. 436:3-19.

Hughson M, Farris AB 3rd, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF (2003) Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. Kidney Int. 63(6):2113-2122.

Hughson MD, Johnson K, Young RJ, Hoy WE, Bertram JF (2002) Glomerular size and glomerulosclerosis: relationships to disease categories, glomerular solidification, and ischemic obsolescence. Am J Kidney Dis. 39(4):679-688.

human kidney? J Pathol. 179(4):421-426.

Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS (2010) Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. Am J Pathol. 176(1):85-97.

Ichihara A, Hayashi M, Hirota N, Saruta T (2001) Superoxide inhibits neuronal nitric oxide synthase influences on afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 37:630-634.

Ichihara A, Inscho EW, Imig JD, Navar LG (1998) Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function. Am J Physiol. 274: F516-F524.

Iliev A, Jelev L, Landzhov B, Kotov G, Hinova-Palova, Ovtscharoff W (2016) Neuronal NOS immunoreactivity in the myocardium of the rat during the postnatal period. Compt Rend Acad Bulg Sci. 69(7):921-926.

Imai M, Yoshitomi K (1990) Heterogeneity of the descending thin limb of Henle's loop. Kidney Int. 38(4):687-694.

Ingelfinger JR, Woods LL (2002) Perinatal programming, renal development, and adult renal function. Am J Hypertens. 15:46S-49S.

Isozaki T, Verlander JW, Sands JM (1993) Low protein diet alters urea transport and cell structure in rat initial inner medullary collecting duct. J Clin Invest. 92(5):2448-2457.

Ito S, Ren Y (1993) Evidence for the role of nitric oxide in macula densa control of glomerular hemodynamics. J Clin Invest. 92(2):1093-1098.

Iversen BM, Amann K, Kvam FI, Wang X, Ofstad J (1998) Increased glomerular capillary pressure and size mediate glomerulosclerosis in SHR juxtamedullary cortex. Am J Physiol. 274:F365-373.

Jaffrey SR, Snyder SH (1996) PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. Science 274(5288):774–777.

Jarad G, Miner JH (2009) Update on the glomerular filtration barrier. Curr Opin Nephrol Hypertens. 18(3):226-232.

Jenkins J, Brodsky SV, Satoskar AA, Nadasdy G, Nadasdy T (2011) The relevance of periglomerular fibrosis in the evaluation of routine needle core renal biopsies. Arch Pathol Lab Med. 135(1):117-122.

Johnson RJ (1997) Cytokines, growth factors and renal injury: where do we go now? Kidney Int Suppl. 63:S2-S6.

Juncos LA, Ren Y, Arima S, Garvin J, Carretero OA, Ito S (1996) Angiotensin II action in isolated microperfused rabbit afferent arterioles is modulated by flow. Kidney Int. 49(2):374-381.

Kaissling B, Le Hir M (2008) The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. Histochem Cell Biol. 130(2):247–262.

Kaissling B, Lehir M, Kriz W (2013) Renal epithelial injury and fibrosis. Biochim Biophys Acta. 1832(7):931-939.

Kanwar YS (1984) Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. Lab Invest. 51(1):7-21.

Kanwar YS, Farquhar MG (1979) Anionic sites in the glomerular basement membrane. I n vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. J Cell Biol. 81(1):137-153.

Kaplan C, Pasternack B, Shah H, Gallo G (1975) Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. Am J Pathol. 80(2):227-234.

Kappel B, Olsen S (1980) Cortical interstitial tissue and sclerosed glomeruli in the normal human kidney, related to age and sex. A quantitative study. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 387(3):271-277.

Kerjaschki D (1994) Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. Kidney Int. 45(2):300-313.

Kihara M, Umemura S, Yabana M, Sumida Y, Nyui N, Tamura K, Kadota T, Kishida R, Murakami K, Fukamizu A, Ishii M (1998) Dietary salt loading decreases the expressions of neuronal-type nitric oxide synthase and renin in the juxtaglomerular apparatus of angiotensinogen gene-knockout mice. J Am Soc Nephrol. 9(3):355-362.

Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgin JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O (1995) Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. Proc Natl Acad Sci USA. 92(7):2735-2739.

Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W (1992). Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. Genomics. 14(3):802-804.

Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bächinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B (1996) Characterization of heme-deficient neuronal nitric oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. J Biol Chem. 271(13):7336-7342.

Knepper MA (1997) Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. Am J Physiol. 272:F3-F12.

Komatsu K, Frohlich ED, Ono H, Ono Y, Numabe A, Willis GW (1995) Glomerular dynamics and morphology of aged spontaneously hypertensive rats. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. Hypertension. 25(2):207-213.

Kone BC, Baylis C (1997) Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. Am J Physiol. 272:F561-F578.

Kostić A (1968) Osnovi embriologije. Beograd-Novi Beograd, Serbia.

Kriz W, Kaissling B (1992) The Kidney: Physiology and Pathophysiology. Structural organization of the mammalian kidney. pp. 479-563.

Kriz W, Kaissling B, Le Hir M (2011) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? J Clin Invest.121(2):468-474.

Kriz W, LeHir M (2005) Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. Kidney Int. 67(2):404-419.

Kumar R, Penniston JT (1991) Widespread distribution of calcium pump in calcium-transporting tissues. Immunohistochemical studies. Contrib Nephrol. 91:21-25.

Lancaster JR Jr (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA. 91(17):8137-8141.

Landzhov B, Malinova L, Ovtscharoff W (2012) Histochemical and magnetic resonance imaging study of degenerative diseases in human intervertebral discs. Compt Rend Acad Bulg Sci. 65:389-392.

Lane PH, Steffes MW, Mauer SM (1992) Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. Kidney Int. 41(4):1085-1089.

Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A; International Society of Hypertension (2008) Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. Lancet. 371(9623):1513-1518.

Lee J (2008) Nitric oxide in the kidney: its physiological role and pathophysiological implications. Electrolyte Blood Press. 6(1):27-34.

LeFurgey A, Tisher CC (1979) Morphology of rabbit collecting duct. Am J Anat. 155(1):111-124.

Lemley KV, Kriz W (1994) Structure and function of the renal vasculature. JB Lippincott, Philadelphia, USA.

Li K, Wang J, Yin X, Zhai X, Li Z (2013) Alteration of podocyte protein expression and localization in the early stage of various hemodynamic conditions. Int J Mol Sci. 14(3):5998 -6011.

Liang M (2011) Hypertension as a mitochondrial and metabolic disease. Kidney Int. 80(1):15-16.

Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS (2008) Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. Am J Pathol. 173(6):1617–1627.

Lindop GB, Gibson IW, Downie TT, Vass D, Cohen EP (2002). The glomerulo-tubular junction: a target in renal diseases. J Pathol.197(1):1-3.

List BM, Klösch B, Völker C, Gorren AC, Sessa WC, Werner ER, Kukovetz WR, Schmidt K, Mayer B (1997) Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. Biochem J. 323(1):159-165.

Liu R, Pittner J, Persson AE (2002) Changes of cell volume and nitric oxide concentration in macula densa cells caused by changes in luminal NaCl concentration. J Am Soc Nephrol. 13(11):2688-2696.

Ljungqvist A, Lagergren C (1962) Normal intrarenal arterial pattern in adult and ageing human kidney. A microangiographical and histological study. J Anat. 96:285-300.

Long DA, Mu W, Price KL, Johnson RJ (2005) Blood vessels and the aging kidney. Nephron Exp Nephrol. 101(3):e95-e99.

Lopes de Faria JB, Zoukhri D, Lorenzi M (1997) Mesangial cell abnormalities in spontaneously hypertensive rats before the onset of hypertension. Kidney Int. 52(2):387-392.

Lu W, Liu S, Zhao Z, Liu Y, Li T (2014) The effect of connective tissue growth factor on renal fibrosis and podocyte injury in hypertensive rats. Ren Fail. 36(9):1420-1427.

Lumbers ER (1995) Development of renal function in the fetus: a review. Reprod Fertil Dev. 7(3):415-426.

Mackenzie HS, Lawler EV, Brenner BM (1996) Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? Kidney Int Suppl. 55:S30-S34.

Madsen KM, Clapp WL, Verlander JW (1988) Structure and function of the inner medullary collecting duct. Kidney Int. 34(4):441-454.

Madsen KM, Tisher CC (1986) Structural-functional relationship along the distal nephron. Am J Physiol. 250:F1-F15.

Madsen KM, Brenner BM (1989) Structure and function of the renal tubule and interstitium. JB Lippincott, Philadelphia, USA.

Mañalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I (2000) Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. Kidney Int. 58(2):770-773.

Mandal AK, Frohlich ED, Chrysant K, Nordquist J, Pfeffer MA, Clifford M (1975) A morphological study of the renal papillary granule: analysis in the interstitial cell and in the interstitium. J Lab Clin Med. 85:131.

Mandal AK, Oleinick SR, James TM, Wise W, Long H, Nordquist JA, Bell RD, Yunice AA, Parker D (1978) Glomerular thrombosis in spontaneously hypertensive rat. II. Immunofluorescence microscopy. III. Effect of heparin. Microvasc Res. 16(3):373-390.

Mannon RB, Matas AJ, Grande J, Leduc R, Connett J, Kasiske B, Cecka JM, Gaston RS, Cosio F, Gourishankar S, Halloran PF, Hunsicker L, Rush D; DeKAF Investigators (2010) Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. Am J Transplant. 10(9):2066-2073.

Martin JE, Sheaff MT (2007) Renal ageing. J Pathol. 211(2):198-205.

Mattson DL, Bellehumeur TG (1996) Neural nitric oxide synthase in the renal medulla and blood pressure regulation. Hypertension. 28(2): 297–303.

Maunsbach AB (1966) Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy. J Ultrastruct Res. 16(3):239-258.

Maunsbach AB (1976) Cellular mechanisms of tubular protein transport. Int Rev Physiol. 11:145-67.

McLachlan MS, Guthrie JC, Anderson CK, Fulker MJ (1977) Vascular and glomerular changes in the ageing kidney. J Pathol. 121(2):65-78.

McLaren KM, MacDonald MK (1983) Histological and ultrastructural studies of the human juxtaglomerular apparatus in benign and malignant hypertension. J Pathol. 139(1):41-55.

Merlet-Bénichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelièvre-Pégorier M, Leroy B (1994) Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. Pediatr Nephrol. 8(2):175-180.

Meyrier A (1999) Hypertensive nephrosclerosis pathogenesis, diagnosis and management. Saudi J Kidney Dis Transpl. 10(3):267-274.

Miller PL, Meyer TW (1990) Effects of tissue preparation on glomerular volume and capillary structure in the rat. Lab Invest. 63(6):862-866.

Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC (1994) Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. Kidney Int. 46(3):653-665.

Mount PF, Power DA (2006) Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. Acta Physiol (Oxf).187(4):433-446.

Mountokalakis TD (1997) The renal consequences of arterial hypertension. Kidney Int. 51(5):1639-1653.

Muehrecke RC, Mandal AK, Volini FI (1970) Renal interstitial cells: prostaglandins and hypertension. A pathophysiological review of the renal medullary interstitial cells and their medullary interstitial cells and their relationship to hypertension. Circ Res. 27:109-119.

Mundel P, Kriz W (1995) Structure and function of podocytes: an update. Anat Embryol (Berl). 192(5):385-397.

Nagasawa T, Mori T, Ohsaki Y, Yoneki Y, Guo Q, Suto E, Ito S (2012) Albuminuria indicates the pressure-associated injury of juxtamedullary nephrons and cerebral strain vessels in spontaneously hypertensive stroke-prone rats. Hypertens Res. 35(10):1024-1031.

Naseem KM (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Mol Aspects Med. 26(1-2):33-65.

Nava E, Llinás MT, Gonzalez JD, Salazar FJ (1996) Nitric oxide synthase activity in renal cortex and medulla of normotensive and spontaneously hypertensive rats. Am J Hypertens. 9:1236-1239.

Navar LG (2004) The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. Kidney Int. 65(4):1522-1532.

Newbold KM, Sandison A, Howie AJ (1992) Comparison of size of juxtamedullary and outer cortical glomeruli in normal adult kidney. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 420(2):127-129.

Nigam SK, Aperia AC, Brenner BM (1996) Development and maturation of the kidney. WB Saunders Company, Philadelphia, USA.

Nikolić I, Rančić G, Radenković G, Lačković V, Todorović V, Mitić D (2004) Embriologija čoveka. Niš, Serbia.

Nyengaard JR, Bendtsen TF (1992) Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. Anat Rec. 232(2):194-201.

Ofstad J, Iversen BM (2005) Glomerular and tubular damage in normotensive and hypertensive rats. Am J Physiol Renal Physiol. 288(4):F665-F672.

Oliver J, Lueu AS (1935) Plastic studies in abnormal renal architecture: III. The aglomerular nephrons of terminal Bright's disease. Arch Pathol. 19:1-23.

Olivetti G, Anversa P, Rigamonti W, Vitali-Mazza L, Loud AV (1977) Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy. A light microscope study. J Cell Biol. 75:573-585.

Ollerstam A, Persson AEG (2002) Macula densa neuronal nitric oxide synthase. Cardiovascular Research. 56:189-196.

Ollerstam A, Pittner J, Persson AE, Thorup C (1997) Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. J Clin Invest. 99(9):2212-2218.

Omer N, Rohilla A, Rohilla S, Kushnoor A (2012) Nitric oxide role in human biology. IJPSDR 4(2):105-109.

Paliege A, Mizel D, Medina C, Pasumarthy A, Huang YG, Bachmann S, Briggs JP, Schnermann JB, Yang T (2004) Inhibition of nNOS expression in the macula densa by COX-2-derived prostaglandin E(2). Am J Physiol Renal Physiol. 287(1):F152-F159.

Pannarale G, Carbone R, Del Mastro G, Gallo C, Gattullo V, Natalicchio L, Navarra A, Tedesco A (2010) The aging kidney: structural changes. J Nephrol. 23:S37-S40.

Paradise WA, Vesper BJ, Goel A, Waltonen JD, Altman KW, Haines GK, Radosevich JA (2010) Nitric oxide: perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin. Int J Mol Sci. 11(7):2715-2745.

Persson AE, Schnermann J,Wright FS (1979) Modification of feedback influence on glomerular filtration rate by acute isotonic extracellular volume expansion. Pflugers Arch. 381:99–105.

Pesce CM, Schmidt K, Fogo A, Okoye MI, Kim R, Striker LJ, Striker GE (1994) Glomerular size and the incidence of renal disease in African Americans and Caucasians. J Nephrol. 7:355–358.

Pichler R, Giachelli CM, Lombardi D, Pippin J, Gordon K, Alpers CE, Schwartz S, Johnson RJ (1994) Tubulointerstitial disease in glomerulonephritis: potential role of osteopontin (uropontin). Am J Pathol. 144(5):915-926.

Pletiskaitz T, Gomes G (2012) D α-tocopherol reduces renal damage in hypertensive rats. Braz J Pharm Sci. 48(2)291-298.

Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JW, Lee WS, Brown D, Poch E, Gullans SR, Hebert SC (1996) Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1 in the rat kidney. Kidney Int. 50(1):174-183.

Popović S (1988) Embriologija čoveka. Valjevo, Serbia.

Postnov YV, Perov YL (1977) Morphometric study of the ultrastructure of nephrons and collecting tubules in the kidney of rats with renal and spontaneous hypertension. Virchows Arch B Cell Pathol. 26(2):175-185.

Potter EL, Osathanondh V (1966) Normal and abnormal development of the kidney. The Kidney. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, USA.

Quaggin SE, Kapus A (2011) Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal myofibroblast transition. Kidney Int. 80(1):41-50.

Rana MW (1998) Human embryology made easy. Harwood Academic Publishers, Australia.

Ren YL, Garvin JL, Carretero OA (2000) Role of macula densa nitric oxide and cGMP in the regulation of tubuloglomerular feedback. Kidney Int. 58(5):2053-2060.

Ren YL, Garvin JL, Ito S, Carretero OA (2001) Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. Kidney Int. 60(5):1676-1683.

Ridderstrale Y, Kashgarian M, Koeppen B, Giebisch G, Stetson D, Ardito T, Stanton B (1988) Morphological heterogeneity of the rabbit collecting duct. Kidney Int. 34(5):655-670.

Roczniak A, Burns KD (1996) Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. Am J Physiol. 270:F106-F115.

Roczniak A, Fryer JN, Levine DZ, Burns KD (1999) Downregulation of neuronal nitric oxide synthase in the rat remnant kidney. J Am Soc Nephrol. 10(4):704-713.

Roczniak A, Levine DZ, Burns KD (2000) Localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 278(5):F702-F707.

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986) Flow-induced release of endothelium derived relaxing factor. Am J Physiol. 250:H1145-H1149.

Ruiz E, Del Rio M, Somoza B, Ganado P, Sanz M, Tejerina T (1999) L-Citrulline, the by-product of nitric oxide synthesis, decreases vascular smooth muscle cell proliferation. J Pharmacol Exp Ther. 290(1):310-313.

Rule AD, Amer H, Cornell LD, Taler SJ, Cosio FG, Kremers WK, Textor SC, Stegall MD (2010) The association between age and nephrosclerosis on renal biopsy among healthy adults. Ann Intern Med. 152(9):561-567.

Sands JM, Knepper MA (1987) Urea permeability of mammalian inner medullary collecting duct system and papillary surface epithelium. J Clin Invest. 79(1):138-147.

Sands JM, Martial S, Isozaki T (1996) Active urea transport in the rat inner medullary collecting duct: functional characterization and initial expression cloning. Kidney Int. 49(6):1611-1614.

Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA (1987) Vasopressin effects on urea and H2O transport in inner medullary collecting duct subsegments (1987) Am J Physiol. 253:F823-F832.

Santmyire B, Baylis C (1998) Isoform specific changes in kidney NOS activity during rat pregnancy (Abstract). J Am Soc Nephrol. 9:346–347.

Sasser JM (2015) Nitric oxide in the kidney. Colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function to disease. San Rafael, California, USA.

Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ (2012) The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. Virulence. 3:112-115.

Schlöndorff D (1996) Roles of the mesangium in glomerular function. Kidney Int. 49(6):1583-1585.

Schmidt RJ, Baylis C (2000) Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. Kidney Int. 58(3):1261–1266.

Schmieder RE (2010) End organ damage in hypertension. Dtsch Arztebl Int. 107(49):866-873.

Schnermann J, Briggs JP (1992) Function of the juxtaglomerular apparatus. Control of glomerular hemodynamics and renin secretion. The Kidtiey: Phisiology arid Pathophysiology. New York, USA.

Seely JC (2017) A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. J Toxicol Pathol. 30(2):125-133.

Serón D, Moreso F (2007) Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. Kidney Int. 72(6):690-697.

Servais A, Meas-Yedid V, Toupance O, Lebranchu Y, Thierry A, Moulin B, Etienne I, Presne C, Hurault de LB, Le Pogamp P, Le Meur Y, Glotz D, Hayem C, Olivo Marin JC, Thervet E (2009) Interstitial fibrosis quantification in renal transplant recipients randomized to continue cyclosporine or convert to sirolimus. Am J Transplant. 9(11):2552-2560.

Sharma SP (2004) Nitric oxide and the kidney. Indian J Nephrol. 14:77-84.

Shayakul C, Hediger MA (1996) Mammalian urea transporters. Curr Opin Nephrol Hypertens. 5(5):401-405.

Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O (1996) Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. Proc Nat Acad Sci USA. 93(23):13176–13181.

Silva FG (2005) The aging kidney: a review - part I. Int Urol Nephrol. 37(1):185-205.

Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, Killen P, Smart A, Schnermann J, Briggs JP (1996) Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. Am J Physiol. 270:F1027-F1037.

Siragy HM, Johns RA, Peach MJ, Carey RM (1992) Nitric oxide alters renal function and guanosine 39,5-cyclic monophosphate. Hypertension. 19:775–779.

Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvany MJ (1994) Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 12(12):1373-1376.

Skov K, Nyengaard JR, Patwardan A, Mulvany MJ (1999) Large juxtamedullary glomeruli and afferent arterioles in healthy primates. Kidney Int. 55(4):1462-1469.

Smeda JS, Lee RM, Forrest JB (1988) Prenatal and postnatal hydralazine treatment does not prevent renal vessel wall thickening in SHR despite the absence of hypertension. Circ Res. 63(3):534-542.

Smith SM, Hoy WE, Cobb L (1989) Low incidence of glomerulosclerosis in normal kidneys. Arch Pathol Lab Med. 113(11):1253-1255.

Snelgrove SL, Kausman JY, Lo C, Lo C, Ooi JD, Coates PT, Hickey MJ, Holdsworth SR, Kurts C, Engel DR, Kitching AR (2012) Renal dendritic cells adopt a pro-inflammatory phenotype in obstructive uropathy to activate T cells but do not directly contribute to fibrosis. Am J Pathol. 180(1):91-103.

Stojanović VR, Jovanović ID, Ugrenović SZ, Vasović LP, Živković VS, Jocić MV, Kundalić BK, Pavlović MN (2012) Morphometric analysis of nonsclerosed glomeruli size and connective tissue content during the aging process. Scientific World Journal, Egypt.

Stuehr D, Pou S, Rosen GM (2001). Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. J Biol Chem. 276(18):14533-14536.

Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota A (1996) Apoptosis in glomerular sclerosis. Kidney Int. 49(1):103-111.

Sunaga T, Fujino H, Tagami M, Nishiyama K, Ohmori K, Uchimura I, Sugiyama H, Hattori M, Maezawa H (1979) Electron microscopic study of osminophilic granules in interstitial cells of renal medulla and papilla. Jpn Heart J. 20(5):705.

Sykes D (1963) The arterial supply of the human kidney with special reference to accessory renal arteries. Br J Surg. 50:368-374.

Tan JC, Workeneh B, Busque S, Blouch K, Derby G, Myers BD (2009) Glomerular function, structure, and number in renal allografts from older deceased donors. J Am Soc Nephrol. 20(1):181-188.

Tang R, Yang C, Tao JL, You YK, An N, Li SM, Wu HL, Liu HF (2011) Epithelial mesenchymal transdifferentiation of renal tubular epithelial cells induced by urinary proteins requires the activation of PKC-α and βI isozymes. Cell Biol Int. 35(9):953-959.

Tauchi H, Tsuboi K, Okutomi J (1971) Age changes in the human kidney of the different races. Gerontologia. 17(2):87-97.

Teng-umnuay P, Verlander JW, Yuan W, Tisher CC, Madsen KM (1996). Identification of distinct subpopulations of intercalated cells in the mouse collecting duct. J Am Soc Nephrol. 7(2):260-274.

Thorup C, Persson AEG (1996) Macula densa derived nitric oxide in regulation of glomerular capillary pressure. Kidney Int. 49:430–436.

Tian Z, Liu Y, Usa K, Mladinov D, Fang Y, Ding X, Greene AS, Cowley AW Jr, Liang M (2009) Novel role of fumarate metabolism in dahl-salt sensitive hypertension. Hypertension. 54(2): 255–260.

Tisher CC, Brenner BM (1993) Structure and function of the glomerulus. Renal pathology with clinical and functional correlations. JB Lippincott, Philadelphia, USA.

Tojo A, Bredt DS, Wilcox CS (1999) Distribution of postsynaptic density proteins in rat kidney: relationship to neuronal nitric oxide synthase. Kidney Int. 55(4):1384-1394.

Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HH, Wilcox CS, Madsen KM (1994) Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. J Am Soc Nephrol. 4(7):1438-1447.

Tojo A, Kimoto M, Wilcox CS (2000) Renal expression of constitutive NOS and DDAH separate effects of salt intake and angiotensin. Kidney Int. 58(5):2075-2083.

Tojo A, Onozato ML, Fujita T (2006) Role of macula densa neuronal nitric oxide synthase in renal diseases. Med Mol Morphol. 39(1):2-7.

Toledo JC Jr, Augusto O (2012) Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. Chem Res Toxicol. 25(5):975-989.

Tracy RE (1996) Renovasculopathies of hypertension and the rise of blood pressure with age in blacks and whites. Semin Nephrol. 16(2):126-133.

Tracy RE, Velez-Duran M, Heigle T, Oalmann MC (1988) Two variants of nephrosclerosis separately related to age and blood pressure. Am J Pathol. 131(2):270-282.

Tsuboi N, Kawamura T, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Hosoya T (2011) Low glomerular density is a risk factor for progression in idiopathic membranous nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 26(11):3555-3560.

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R (2002) Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. Hypertension. 39(1):135 -141.

Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK (2010) Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol. 298(5):F1078-F1094.

Verlander JW (1998) Normal ultrastructure of the kidney and lower urinary tract. Toxicol Pathol. 26(1):1-17.

Verlander JW, Madsen KM, Tisher CC (1987) Effect of acute respiratory acidosis on two populations of intercalated cells in rat cortical collecting duct. Am J Physiol. 253:F1142-F1156.

Vlajković S, Daković-Bjelaković M, Cukuranović R, Popović J (2005) Evaluation of absolute volume of human fetal kidney's cortex and medulla during gestation. Vojnosanit Pregl. 62(2):107-111.

Wade JB, Stanton BA, Field MJ, Kashgarian M, Giebisch G (1990) Morphological and physiological responses to aldosterone: time course and sodium dependence. Am J Physiol. 259:F88-F94.

Wagner C, Gödecke A, Ford M, Schnermann J, Schrader J, Kurtz A (2000) Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. Pflugers Arch. 439(5):567-572.

Wagner L, Riggleman A, Erdely A, Couser W, Baylis C (2002) Reduced nitric oxide synthase activity in rats with chronic renal disease due to glomerulonephritis. Kidney Int. 62(2):532 -536.

Ward M (1970) Tubular metaplasia in Bowman's capsule. J Clin Pathol. 23(6):472-474.

Weigert A, Brüne B (2008) Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. Nitric Oxide.19(2):95-102.

Welch WJ, Tojo A, Lee J-U, Kang DG, Schnackenberg CG, Wilcox CS (1999) Nitric oxide synthase in the JGA of the SHR: expression and role in tubuloglomerular feedback. Am J Physiol. 277:F130-F138.

Welch WJ, Tojo A, Wilcox CS (2000) Roles of NO and oxygen radicals in tubuloglomerular feedback in SHR. Am J Physiol Renal Physiol. 278(5):F769-F76.

Welham SJ, Wade A, Woolf AS (2002) Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. Kidney Int. 61(4):1231-1242.

Welling LW, Hill JJ (1978) Shape of cells and intercellular channels in rabbit thick ascending limb. Kidney Int. 13(2):144-151.

Welling LW, Welling DJ (1975) Surface areas of brush border and lateral cell walls in the rabbit proximal nephron. Kidney Int. 8(6):343-348.

Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, Saunders TL, Dysko RC, Kohno K, Holzman LB, Wiggins RC (2005) Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. J Am Soc Nephrol. 16(10):2941-2952.

Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK, Wharram BL, Shedden KA, Misek DE, Kuick RD, Wiggins RC (2005) Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. J Am Soc Nephrol. 16(10):2953-2966.

Wilcox CS (2000) L-arginine-nitric oxide pathway. The kidney: physiology and pathophysiology. Raven Press, New York, USA.

Wilcox CS, Deng X, Welch WJ (1998) NO generation and action during changes in salt intake: roles of nNOS and macula densa. Am J Physiol. 274:R1588-R1593.

Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HH (1992) Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. Proc Natl Acad Sci USA. 89(24):11993–11997.

Williams PL, Bannister LH, Berry MM (1995) Gray's Anatomy. 38th Ed., Churchill Livingstone, London, UK.

Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV (2010) Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. Nat Med. 16(5):535-543.

Yaqoob M, Edelstein CL, Wieder ED, Alkhunaizi AM, Gengaro PE, Nemenoff RA, Schrier RW (1996) Nitric oxide kinetics during hypoxia in proximal tubules: Effects of acidosis and glycine. Kidney Int. 49:1314–1319.

Yen TT, Yu PL, Roeder H, Willard PW (1974) A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats. Heredity (Edinb). 33(3):309-316.

Young CN, Cao X, Guruju MR, Pierce JP, Morgan DA, Wang G, Iadecola C, Mark AL, Davisson RL (2012) ER stress in the brain subfornical organ mediates angiotensin-dependent hypertension. J Clin Invest. 122(11):3960-3964.

Yu AS, Hebert SC, Lee SL, Brenner BM, Lytton J (1992) Identification and localization of renal Na(+)-Ca2+ exchanger by polymerase chain reaction. Am J Physiol. 263:F680-F685.

Zaar K (1992) Structure and function of peroxisomes in the mammalian kidney. Eur J Cell Biol. 59(2):233-254.

Zeisberg M, Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest. 119(6):1429-1437.

Zhang-James Y, Middleton FA, Faraone SV (2013) Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. Physiological Genomics. 45(13):528-538.

Zhou MS, Adam AG, Jaimes EA, Raij L (2003) In salt-sensitive hypertension, increased superoxide production is linked to functional upregulation of angiotensin II. Hypertension. 42(5):945-951.

Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG (2008) The aging kidney. Kidney Int. 74(6):710-720.

Zidar N, Cör A, Premru Srsen T, Stajer D (1998) Is there an association between glomerular density and birth weight in healthy humans. Nephron. 80(1):97-98.

Zoetis T, Hurtt ME (2003) Species comparison of anatomical and functional renal development. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 68(2):111-120.

Zou AP, Cowley AW Jr (1997) Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study. Hypertension. 29:194–198.