

УДК: 616.8-022+ 616:612.995-073.7

МАКРОМІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ У НИРКАХ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ У НОРМІ, ЗА УМОВ ІМУНОКОМПРОМЕТАЦІЇ ТА ЕНТЕРОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ

Торяник¹ І. І., Мироненко¹ Л. Г., Перетятко¹ О. Г.,
Ткачик² І. П.

¹Державна Установа «Інститут мікробіології та
імунології

ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних
наук України», Харків

²Державна Установа «Інститут нейрохірургії ім.
акад. А.П. Ромоданова Національної академії
медичних наук України», Київ

Вступ

За даними аналітиків, на сьогоднішній день рівень захворюваності на ниркову патологію не має тенденції до зниження [8]. Розвиток хронічних інфекційних процесів у паренхімі нирок, субкапсулярному компоненті супроводжується виразними запальними рецидивами, їх подальшим прогресом та, у решті решт, формуванням нефросклерозу з хронічною нирковою недостатністю. Остання стає невід'ємним чинником інвалідизації хворих та зводить проблему діагностики, лікування і профілактики нефритів у ранг особливо важливих. У публікаціях наших колег вказується, що серед факторів, які її спричинюють провідну роль відіграє ріст антибіотикорезистентності умовно-патогенної мікрофлори (*Enterococcus* spp., у тому числі) та виразне зниження імунної резистентності у населення [7]. Відомо, що на долю ентерококів припадає до 10 % усіх бактеріальних інфекцій уринарного тракту, при внутрішньолікарняних інфекціях з цією локалізацією питома вага ентерококів зростає до 15-20 % [2, 6]. Нещодавно вважалося, що більшість ентерококових інфекцій (80-90) % обумовлено *E. faecalis*, однак аналіз наукової літератури показав, що за останній період зростає роль *E. faecium*, особливо при бактерієміях [4, 9].

Не останнє місце у негативізації клінічної панорами захворювання посідає відсутність досконалої і своєчасної патоморфологічної діагностики, яку із зрозумілих причин, на жаль, не завжди вдається провести за життя пацієнта [1]. Не зважаючи на доволі об'єктивну сучасну інформацію, що стосується етіопатогенезу нефритів, на тепер існує ціла низка нез'ясованих питань щодо перебігу хвороби, її структурних маркерів, глибини, характеру ушкоджень, віддалених наслідків, індивідуалізації клінічних показань та протипоказань до призначення антибіотикотерапії. Зважаючи на це, подальше вивчення клініко-морфологічних (у тому числі, макромікроскопічних) аспектів ниркових уражень у разі розвитку інфекційного процесу (накшталт, ентерококового) на тлі іму-

нокомпрометації в експерименті не викликає сумнівів.

Мета роботи: вивчити макромікроскопічні зміни у нирках імунокомпрометованих щурів в умовах експериментально модельованого гнійно-запального процесу, викликаного *E. faecium*.

Матеріал та методи дослідження

При проведенні експериментальної частини роботи по вивченню ролі *E. faecium* у патогенезі ентерококових інфекцій були використані самиці щурів лінії Wistar трьохмісячного віку масою тіла від 165 до 170 г. Тварини знаходились у стандартних умовах експериментально-біологічної клініки – виварію і мали вільний доступ до їжі і води. Досліди здійснювали відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейські конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986 р.) на базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України».

Імунокомпрометації досягали шляхом підкірального введення циклофосфану у дозі 200 мг/кг маси тварини [7]. Мікробну завис *E. faecium* 1991/1 у дозі 10^{12} КУО/мл кількістю 1 мл вводили інтраперитонеально, після чого проводили експериментальне спостереження загальною тривалістю 14 діб. Штам *E. faecium* 1991/1 був виділений з ліквору хворого на постопераційний менінгіт та знаходиться на збереженні у музеї мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України».

Матеріалом макромікроскопічного дослідження стали шматочки нирок (5x5 мм), окремих ділянок вісцеральних судин органу від щурів. За для повноцінного виконання мікроскопічного (гістологічного) аналізу структурних змін у нирках експериментальних тварин матеріал фіксували у 12 % розчині формаліну на фосфатному буфері (рН = 7,0 – 7,2), при температурі $t = 18 - 20$ °C у скло-керамічному посуді із щільно притертими корками. Далі зневоднювали методом проведення матеріалу через батареї етилових спиртів підвищеної концентрації від 30^0 до абсолютного спирту включно, заливали у смоли (парафін, целлоїдин за потребами завдання). З парафінових, целлоїдинових блоків виготовляли серії гістологічних зрізів, товщиною 10 – 15 мкм. Препарати різали за допомогою ротарійного мікротому в одній із трьох взаємно перпендикулярних площин (фронтальній, горизонтальній, сагітальній), що надавало змогу більш ретельно вивчити будову речовини органу та його мікросудин, співвідношення окремих структур (цито-, міелоархитектоніку, локальні вогнища запалень, проліферації клітинних популяцій). Отримані зрізи забарвлювали у відповідності до ідеї та мети експерименту, завдань та головної стратегії пошуку (гематоксиліном- еозином, азур- еозином, за Ван- Гізоном).

Мікроскопічний аналіз матеріалу проводили із застосуванням оптичної системи мікроскопу ЛОМО (x300; x600; x1350). Дослідженню піддавали коркову, мозкову речовину нирок, піраміди, мікросудини та їхні сплетіння. У порівняльному аспекті характеризували контрольні зразки (від інтактних тварин) із експериментальними, де особливої уваги надавали вивченню феноменів інфільтрації, діapedезу еритроцитів, розм'якнення тканини, набряків, некрозів [3, 5]. Конкретизації належали зміни у мікросудинному руслі. Обов'язкової констатації піддавали факти наявності чи відсутності стазу, тромбозу, змін агрегатних властивостей еритроцитів, сладжування останніх. У разі виявлення схожих морфологічних ознак статистичну оцінку останніх проводили сумарно. Узагальнені результати зводили до уніфікованої схеми, за якою будували висновки.

Результати дослідження

Макромікроскопічне дослідження нирок самців щурів лінії Вістар, що належали до групи інтактного контролю виявило повну відповідність останніх варіантам статево-вікової норми для лабораторних тварин застосованих у експерименті. Органи мали типову бобовидну форму, чітко окреслені вигнутий до зовні латеральний та внутрішній медіальний край, верхній та нижній полюси. Ворота нирок широкі, відкривались вільно, продовжувались у *pelvis renalis*, містили фрагменти відсепарованих ниркової артерії, вен. Задня поверхня плоска щільно притиснута до задньої черевної стінки, передня гладка, блискуча, випукла орієнтована внутрішніх органів черевної порожнини (печінка, дванадцятипала кишка, підшлункова залоза). Зверху нирки контактують із наднирковими залозами. Кожен із органів вкритий щільною, пружною фіброзною капсулою, що надсилає до паренхіми пучки з'єднанотканинних волокон. Із-зовні нирки оточувала жирова капсула. На поперековому зрізі контрастостана паренхіма органу, що позначалась наявністю двох шарів: зовнішнього коркового та внутрішнього мозкового. Колір першого більш темного насиченого забарвлення, ближче до коричневого відтінків. Мозковий шар коричнево-рожевий, коричнево-червоний, м'який за відтінком, однорідний. В останньому *ad osculi* добре помітні піраміди, їхні верхівки, основа, стовпи.

Мікроскопічно: капсула долучала два шари колагенових волокон з незначною кількістю еластичних та м'язів у глибині зразків. Останні поступово переходять у м'язові клітини зірчастих вен. Капсулу пронизували чисельні кровоносні мікросудини, що пов'язані не лише із судинною системою нирки, але й її оточуючої жирової тканини. Переважну більшість візуально доступної частини зрізу на препараті коркової речовини займають клубочки. Вони однорідно, проте, вкрай нещільно розосереджувались у корі, мали чітко диференційовану капсулу, яка вкривала останній та разом із ним утворювала ниркове тільце. Власне клубочки складались із капілярів, що у нижче

розташованих фрагментах поєднувались, утворюючи артеріальний тракт, *vas efferens* (добре контрастостані гематоксиліном та еозином), діаметр значно менший, ніж у випадку із аферентними судинами. Клубочки, зосереджені на межі з мозковою речовиною, великих розмірів, гістологічно калібр аферентних та еферентних мікросудин у них приблизно однаковий. На препаратах добре позначені базальні мембрани капілярів клубочків, що видавались щільними, гомогенними, досить товстими та пружними. Ендотелій виразний, з типовим для норми ядерно-цитоплазматичним співвідношенням (на користь ядра), проте, з ознаками незначної вакуолізації цитоплазми. Петлі капілярів нібито підвищено у просторі на своєрідному гачку (брижі- мезангіуму), що видаються за якісними ознаками гіаліновими пластинами. Клітини кальців за типологією-кубічні епітеліальні, притиснуті до паралельно розташованих доволі сильно розвинутих складок базальної мембрани. Петля Генле складалась із двох колінець, різних за діаметрами, висланих плоским епітелієм, світлим, добре сприймаючим барвники, зі слабкою зернистістю.

Макромікроскопічне дослідження зразків препаратів нирок від особин з імунокомпрометованою групою продемонструвало наявність дистрофічних процесів у останніх, які, безумовно, були викликані дією цитостатиків та сприяли пригніченню імунокомпетентної системи організму, ушкодженню швидко проліферуючих тканин (у тому числі, епітеліальної). Гальмування відновних процесів майже на перших етапах експерименту, очевидно, сприяло підвищенню потенціалу деструкції, розвитку некротичних явищ, структурно-функціональному виснаженню органу в цілому. На цьому тлі морфологічні зміни, що відбувались у нирках, ставали вагомим аргументом на користь системного аналізу проявів імунодепресії.

Макроскопічно: нирки сіро-коричневого кольору, зі збереженою формою, піддатливі у разі натиснення, з помітно зниженою щільністю. Капсула цілісна, не містить поверхневих чи субкапсулярних дефектів, вогнищ крововиливів, кальцинозу, без ознак набряку. Поверхня гладка, тьмяна, однорідна. Фіброзна фасція витончена, жирова капсула дещо збідніла. Стінки судин, що виходять із воріт кожної нирки тонкі, запусіті, сухі. На поперековому зрізі коркова та мозкова речовини диференційовані, проте, у окремих випадках їхні межі дещо розмиті. Піраміди звужені, відстань між ними збільшена, забарвлення нативних препаратів зі втраченою яскравістю, тьмяне, сіре, сіро-коричневе, брют. *Pelvis renalis* спалі, сухі, зі втраченою блиску, витончені, з білявим нальотом.

Мікроскопічно: чисельність ниркових клубочків помітно зменшена. Між капсулою та власне клубочком утворювався простір. Кровоносні капіляри з ознаками руйнації, структура порушена, епітелій десквамований. Базальна мембрана містить дефекти, витончена, гетерогенна. Петлі капілярів спалі. Відстань між *pars ascendens* та *pars descendens* збільшена. Стінки каналців першого порядку зі втраченою епітелією, між

ним та базальною мембраною формуються простори, контакти відсутні, складчастість не спостерігалась. Колінця петлі Генле однакові за калібром, з ознаками десквамації ендотелію та деструкцією останнього, у окремих капілярах тромби, стаз. Капсула обох нирок утримує колагенові волокна та вкрай мало чисельні еластичні.

У разі впливу ентерококкової інфекції на центральний орган сечовивідної системи щурів зміни, що діагностували при цьому, полягали у наявності запальних елементів та розвитком відповідних до того структурно-функціональних проявів.

Макромікроскопічно: нирки типові за формою та загальною топографією, виключаючи певні елементи син- та вазотопії кожної із них (останнє пояснювалось незначною гіперплазією окремих структур досліджених органів за умов розвитку запальних реакцій). Поверхня гладка, блискуча, слизька, дещо волога на дотик, пружна. Органи твердої консистенції, у разі натисень утворюється рідина, палевого кольору, без гнилісного запаху. Капсула цілісна, фіброзна оболонка (фасція) набрякла, щільна, утовщена. Жирова оболонка крихкотлива, дрібчаста, слизька. На зрізі коркова та мозкова речовини диференційовані, їхня межа доволі чітка, колір нативних препаратів контрастований. Ниркові піраміди структуровані, розмежовані, дещо гіпохромні у разі забарвлення гематоксиліном еозином. Pelvis renalis з ознаками гіперплазії, утримує ексудат. Колагенова тканина, еластичні волокна капсули видаються набряклими, з стовщеннями фрагментів. Капіляри з ознаками деструкції стінок (розшарування останніх, десквамацією ендотелію), що призводило до утворення дефектів у вигляді пор. Через останні відбувався діapedез еритроцитів та накопичення останніх у паравазальному просторі. Осередки крововиливів з тенденціями до генералізації. У окремих препаратах спостерігали вогнища інфільтрації лімфо-лейкоцитарного характеру (клітинний спектр останньої містив як гранулоцити, так і гранулярні клітини). Проте, чисельність осередків залишалась у відповідний експериментальний період незначною. Проліферація відбувалась за рахунок лімфоїдного компоненту, позначалась набухненням окремих структур pelvis renalis, збільшенням товщі їхніх стінок, розширенням межі останніх. У лімфоїдній тканині просвітлення гермінативних центрів, гіперплазія маргінальних зон фолікулів.

Висновки

1. Сукупний вплив двох зовнішніх агентів (фактор імунокомпрометації та інфікування *E. faecium*) неодмінно призводять до розвитку декомпенсованого стану організму експериментальних тварин. Декомпенсація носить системний характер та проявляється розвитком лімфоаденопатій, гломерулонефриту, нефропатій.
2. Встановлено, що при інтраперитонеальному інфікуванні *E. faecium* щурів лінії Вістар, у тварин відбувається генералізація запального процесу у нирках з

ураженням їхніх субкортикальних та паренхіматозних структур.

3. Показано, що ступінь вираженості патологічних змін у нирках експериментальних імунокомпрометованих тварин був вищим, що пов'язано не тільки з мікробною контамінацією очеревини в поєднанні з порушеннями мікрогемодинаміки, а, в першу чергу, пригніченням механізмів клітинного захисту в умовах імунокомпрометації циклофосфаном.

Література

1. Abramov M. G. Gematological atlas [Text] / M. G. Abramov // M. – Medicina - 3-d ed. - 2005. - 116 p.
2. Contribution of individual Ebp Pilus subunits of *Enterococcus faecalis* OG1RF to pilus biogenesis, biofilm formation and urinary tract infection [Text] / Jouko Sillanpaa [et al.] // PloS one. – 2013. – No 8 (7). – P. – 68813.
3. Dati F. New Aspects of Laboratory Testing for Hemostasis Disorders [Text] / F. Dati // Journal of Laboratory and Clinic – Medicine. - 2006. - Vol. 8, No 3. - P. 9 - 11.
4. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals [Text] / D. Panesso [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2010. – No 48. – P. 1562–1569.
5. Nazarenko G. I. Clinical mark of the laboratory examination results [Text] / G. I. Nazarenko, A. A. Kishkun // M. – Medicina - 2-d ed. - 2002. - 544c.
6. Singh K. V. Efficacy of ceftobiprole Medocaril against *Enterococcus faecalis* in a murine urinary tract infection model [Text] / K. V. Singh, B. E. Murray // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2012. – No 56 (6). – P. – 3457–3460
7. Telegin L. Yu. Experimental pharmacogenetics of cyclophosphamid [Text]: Avtoref. of manusc. by L.Yu. Telegin Dr. Med. Sc.: 14.03.06 – Pharmacology, Clinical Pharmacology: 25.03.2011.: ed. /Leonid Yur'evich Telegin. - M., 2010. - 46 p.
8. Vozianova J. I. Infections and parasitry diseases [Text] / J. I. Vozianova // Kiyv – Zdorov'ya - 2001. – V. 2. – P. 656.
9. Willems R. J. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen [Text] / R. J. Willems L. W. Schaik // Future Microbiol.– 2009.– Vol. 4. – P. 1125–1135.

УДК: 616.8-022+ 616:612.995-073.7

МАКРОМІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ У НИРКАХ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ У НОРМІ, ЗА УМОВ ІМУНОКОМПРОМЕТАЦІЇ ТА ЕНТЕРОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ

Торяник І. І., Мироненко Л. Г., Перетятко О. Г., Ткачик І. П.

У статті представлений уніфікований підхід до створення моделі ентерококкової інфекції в експерименті на самицях імунокомпрометованих лінійних лабораторних щурів (Wistar). Матеріалом дослідження стали

самиці лабораторних щурів (у віці 3-х місяців, вагою 165- 170 г, у кількості 60 особини (n=60)). Мета дослідження досягалася шляхом отримання стандартних уражень від ентерококової інфекції базових структур нирок, судин, схожих із тими, що виникали у людини у разі розвитку клінічної патології. Результати оцінювали за характером виявлених морфологічних змін (деструктивно-дегенеративні зміни, некроз, нефропатії, запальні (альтеративні) процеси). Резюмуючи досягнуте, відмітимо ефективність проведеного експерименту та оптимістичні перспективи застосування екстраполятивних даних у якості фундаменту для подальшої апробації новаторських методів інтервенції ентерококової інфекції.

Ключові слова: патоморфологічні зміни, експериментальна ентерококова інфекція, самиці лабораторних щурів (Wistar), нирки, нефропатія, альтеративний запальний процес.

УДК: 616.8-022+ 616:612.995-073.7

МАКРОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОЧКАХ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС В НОРМЕ, ПРИ ИММУНОКОМПРОМЕТАЦИИ И ЭНТЕРОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Торяник И. И., Мироненко Л. Г., Перетятко Е. Г., Ткачик И. П.

В статье представлен унифицированный подход к созданию модели энтерококковой инфекции в эксперименте на самках иммунокомпрометированных линейных лабораторных крыс (Wistar). Материалом исследования стали самки лабораторных крыс (в возрасте 3-х месяцев, весом 165-170 г, в количестве 60 особей (n=60)). Цель исследования достигалась путем получения стандартных повреждений в результате энтерококковой инфекции базовых структур почек, сосудов, сходных с теми, что возникали у человека в результате клинической патологии. Результаты оценивали по характеру выявленных морфологических изменений (деструктивно-дегенеративные изменения, некроз, нефропатии, воспалительные (альтеративные) процессы). Резюмируя достигнутое, отметим эффективность проведенного эксперимента и оптимистические перспективы экстраполятивных данных в качестве фундамента для дальнейшей апробации новаторских методов интервенции энтерококковой инфекции.

Ключевые слова: патоморфологические изменения, экспериментальная энтерококковая инфекция, самки лабораторных крыс (Wistar), почки, нефропатия, альтеративный воспалительный процесс.

UDC: 616.8-022+ 616:612.995-073.7

MACROMICROSCOPIC CHANGES OF THE LABORATORY RATS KIDNEY IN NORM AND AFTER IMMUNOCOMPROMETATION WITH ENTEROCOCCUS INFECTION

Torianik I. I., Myronenko L. G., Peretyatko E. G., Tkachyk I. P.

The unification approach to the creation of the enterococcus infection model in the unlinear

immunocomprometive laboratory female rats (Wistar) is presented in the article. The examinational material are in the female rats (of the 3-th- months age's (n=60), the 165-170 g by weight). The purpose of the experiment's are achieving by the seding enterococcus infection means of the basic structures and blood vessels of the kidney, digestive system damages, that similar with the such in a human in a case of the development of a traditional clinic pathology. The results are evaluated to character of the morphological changes (destructive and degenerative alterations, necrosis, nephropathy, inflammatory (alterative) processes. Sum upping, of capable of the achievement, we are noting carried out experiment's efficiency and the using optimistic perspective of the extrapolative data in the capacity as a foundation for the further of the newest methods of the enterococcus infection.

Key words: pathomorphological changes, experimental enterococcus infection, laboratory female rats (Wistar), kidney, nephropathy, inflammatory (alterative) processes.