

NEERUPUUDULIKKUSE EKSPERIMENTAALSED MUDELID

M. Aunapuu, Ü. Pechter, M. Ots

ABSTRACT. *Experimental renal failure.* Renal failure is defined as the cessation of kidney function. Acute renal failure develops over the period of hours or days. Ischemia reperfusion (I/R) injury is one of the leading cause of the transplanted organ loss. Chronic renal failure develops over months, years or decades. Chronic progressive kidney disease leads to end-stage renal disease. Several experimental models are being used for the studies of the renal failure. We studied 20 adult Wistar rats during four and eight weeks after the renal ablation. 10 rats without surgery served as healthy controls. Renal damage was assessed using following parameters: urine protein excretion rate, systolic blood pressure, and serum creatinine. We showed that after the renal ablation blood pressure was raised and proteinuria developed in nephrectomized rats. Kidney morphology showed focal segmental glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. Acute renal failure will be studied in the ischemia-reperfusion experimental model.

Keywords: 5/6 nephrectomy, experimental renal failure, ischemia-reperfusion, hypertension.

Eksperimentaalsetes töödes kasutatakse erinevaid loommudeleid, mille teadlased on välja töötanud pikaajaliste katsetuste ja kogemuste põhjal. Käesolevas artiklis tutvustatakse ägeda ja kroonilise neerupuudulikkuse loommudeleid, mida on võimalik kasutada eksperimentaalse neerupuudulikkuse uurimiseks. Meie poolt läbiviidud eksperiment on esimene omandatud hüpertensiooni alane uuring, mis on tehtud Eestis. See eksperiment võimaldas alustada Eestis uuringuid, kus kasutati maailmas üldlevinud eksperimentaalset loommudelit ja uut, kaasaegset uurimisaparatuuri. Eksperimendis kasutati valgeid isaseid Wistar-liini rotte. 5/6 nefrektoomia mudeli tegemiseks eemaldati narkoosis loomadel operatsiooni käigus parem neer ja vasakus neerus ligeeriti valikuliselt kahte *art. renalis* kaudaalset haru, tekitades sellega neeru verevarustuse kahjustuse. Tulemusena kirjeldati füsioloogilisi ja morfoloogilisi muutusi. Järgmisena on kavas uurida isheemia-reperfusiooni mudelil ägeda neerupuudulikkuse patomehhanisme.

Võtmesõnad: 5/6 nefrektoomia, eksperimentaalne neerupuudulikkus, isheemia-reperfusioon, hüpertensioon.

Sissejuhatus

Neerupuudulikkuse korral tekib neerufunktsiooni langus. Ägeda neerupuudulikkuse (ÄNP) puhul tekib see lühikese aja (tundide või päevade) jooksul ning selline äge neerupuudulikkus on potentsiaalselt taastuv. Kliinilises praktikas tekib äge neerupuudulikkus kõige sagedamini neeruperfusiooni häire tõttu (südamepuudulikkus, oksendamine, verekaotus jt) ning kõikides transplanteeritud neerudes, kus kahjustuse aste sõltub doonorneeru isheemia perioodi pikkusest. Krooniline neerupuudulikkus (KNP) areneb kuude, aastate või dekaadide jooksul, mil tekivad pöördumatud destruktiivsed neerukoe muutused, mis viivad lõppstaadiumis neerupuudulikkuse tekkele (ingl *end-stage renal disease – ESRD*). Sagedasemad haigused, mis põhjustavad kroonilist neerupuudulikkust, on krooniline glomerulonefriit, diabeetiline nefropaatia, hüpertooniatõbi, krooniline tubulointerstsiaalne nefriit, polütsüstiline neeruhaigus.

Ägeda ja kroonilise neerupuudulikkuse patofüsioloogilistest mehhanismidest arusaamiseks ja neeruhaiguse progresseerumise ennetamiseks manustatavate ravimite efektiivsuse uurimiseks kasutatakse laialdaselt erinevaid loommudeleid (Hostetter *et al.*, 1981; Meyer *et al.*, 1985; Heyman *et al.*, 2002; Chatterjee, Thiernemann, 2003; Fogo, 2003). Järgnevalt tutvustame klassikalisi ägeda ja kroonilise neerupuudulikkuse loommudeleid ning esitame oma katse tulemused.

Ägeda neerupuudulikkuse loomudel

Äge neerupuudulikkus on tõsine kliiniline probleem, mis võib õigeaegse ravita lõppeda letaalselt. Neerukoe kahjustus ägeda neerupuudulikkuse korral on tingitud peamiselt neerukoe hüpoksiast, isheemiast või toksiliste ainete toimest. Selle tulemusel tekib patoloogiline (nekroos) või programmeeritud raku surm (apoptoos) (Padanilam, 2003), mis morfoloogiliselt avaldub tubulaarnekreosina. Apoptoos tekib nii normaalses koes kui ka haiguste puhul. Nekroos tekib ainult koekahjustuse korral. Ägeda neerupuudulikkuse uurimiseks kasutatakse mitmesuguseid eksperimentaalseid mudeleid. Levinumaks on isheemia-reperfusiooni (I/R) loomudel, kus ligeeritakse lühiajaliselt (30–60 minuti jooksul) neeruarter ja veen. Tubulaarse kahjustuse tekitamiseks kasutatakse ka mitmesuguseid toksilisi medikamente: gentamütsiini, tsüklosporiini jt. Nefroni eri segmentide kahjustuse ulatus võib ühesuguse kahjustava faktori tagajärjel olla erinev. Kõige tundlikumad on

proksimaalsed tuubulid, kus tekivad varakult kahjustused, teised nefroni osad kahjustuvad hiljem. Neeru tubulaarpiirkonnas tekib äge tubulaarne kroos, väheneb renaalne verevool ja glomerulaarne filtratsioon. Rakkude kahjustuse mehhanismidest arusaamine on praeguseni täpselt määratlemata ning seetõttu on tubulaarne kroosi ennetamine raske. Näiteks on isheemia-reperfusiooni kahjustuse teke neerutransplantaadis vältimatu (Grinyo, 2001; Brown *et al.*, 2002) ja siiani pole võimalik peale neeru isheemia aja vähendamise praktiliselt midagi ette võtta, et seda kahjustust ei tekiks või et tubulaarne regeneratsioon oleks kiirem. Isheemia-reperfusiooni eksperimentaalset mudelit kasutatakse selleks, et uurida igakülgset neeru transplantatsiooni korral tekkida võivaid tüsistusi.

Kroonilise neerupuudulikkuse loomudel

Neeruhaiguste lõppstaadiumis neerupuudulikkuseni viivate patofüsioloogiliste protsesside kulust arusaamine on viimastel aastatel (Ots *et al.*, 2000) tunduvalt paranenud. Klassikaliseks, sagedamini kasutatavaks eksperimentaalseks kroonilise neerupuudulikkuse ja sekundaarse hüpertensiooni patomehhanismide uurimise loomudeliks on nn 5/6 nefrektoomia (*remnant kidney*) mudel, mis on kasutusele võetud 1932. aastal Chanutini poolt (Chanutin, Ferris, 1932). Eksperimentaalset loomal, sageli rotil, eemaldatakse üks neer ja teisel neerul ligeeritakse neeruarteri kaks haru. Kroonilise neerupuudulikkuse korral, kui kriitiline arv nefroneid on hävinud, toimuvad järelejäänud nefronites kompensatoorsed muutused (Hostetter *et al.*, 1981; Meyer *et al.*, 1985). Selle protsessi ajal kaotavad järelejäänud nefronid oma võime autoreguleerida glomerulaarset voolu ja rõhku ning kahjustuvad süsteemse ja intrakapillaarse rõhu tõusu, hüperfiltratsiooni ja hüpertroofia tõttu (Hostetter *et al.*, 1981). Suure neerukoe reseksiooni järgselt tekib organismis kõrgeenenud proteiinuuria ning progressiivne hüpertensioon, hüperfiltratsioon ja fokaalne, segmentaalne glomeruloskleroos (FSGS). Varajane glomeruloskleroos tekib pärast neeru kahjustust ligeerimisega, segmentaalne skleroos tekib siis, kui ligikaudu 20% neerukehakesi on kahjustatud, ning kaheksandaks nädalaks areneb juba välja tubulointerstitiaalne fibroos. Loomadel arenevad tavaliselt ureemia nähud 12 kuni 16 nädala jooksul. Neerus toimuvad morfoloogilised ja füsioloogilised muutused võimaldavad uurida kahjustuse erinevaid aspekte (Hostetter *et al.*, 1981; Faraj, Morley, 1992; Faraj, Morley, 1993) suhteliselt lühikese aja jooksul. Suurte imetajate või inimese neeruhaiguse progresseerumise uurimine kestaks aga aastaid või aastakümneid.

Katseteetodika

Uurimistöös kasutati 5/6 nefrektoomia neerupuudulikkuse mudelit. Eksperimentaalne töö on tehtud TÜ Biomeedikumi vivaariumis isastel valgetel Wistar-liini rottidel, loomad osteti Soomest (National Laboratory Animal Centre, University of Kuopio). Eksperimendi läbiviimisel arvestati katseloomadega töötamise eeskirju ning eksperimendi läbiviimiseks oli olemas TÜ loomaeetika komisjoni luba. Aklimatiseerumise ajal (10 päeva) eksperimentaalset tööd loomadega ei tehtud. Eksperimendis kasutati 30 rott. Opereeriti 8 nädala vanuseid rotte keskmise kehamassiga 262–280 g. Loomadele tehti intraperitoneaalne anesteesia Brietaliga, arvestusega 5 mg Brietali 100 g kohta. 5/6 nefrektoomia (5/6 NPX) mudeli tegemiseks eemaldati loomal operatsiooni käigus parem neer ja vasakus neerus ligeeriti valikuliselt kahte neeruarteri kaudaalset haru. Loomi hoiti vivaariumis, kus neile oli tagatud püsiv temperatuur ja 12-tunnine valgustsüklil. Söögiks anti standardtoitu (R 70, Lactamin, Rootsi) ja joogivett. Ööpäevase uriini kogumiseks kasutati individuaalseid metaboolseid puure. Loomadel jälgiti dünaamiliselt järgmisi füsioloogilisi näitajaid: ööpäevane uriini kogus (ml), süstoolne arteriaalne vererõhk (mm Hg). Kogutud uriinist määrati TÜ ühendlaboris valgusisaldus. Katse lõppedes määrati seerumist kreatiniin ja cysC. Süstoolset vererõhku mõõdeti roti sabal (*Harvard Rat Tail Blood Pressure Monitor*). Katsed lõpetati 4 või 8 nädala pärast, loomad surmati narkoosis (Brietal, 50 mg 100 g kehamassi kohta). Morfoloogiliseks uuringuks võeti vasaku neeru tükk (Krinke, 2000). Võetud tükid fikseeriti 10% formaliinilahuses ja sisestati parafiini klassikalise meetodika järgi. Mikrotoomil Ergostar valmistati 4 µm paksused lõigud. Preparaate värviti H&E, van Gieson'i, PAS, Masson trichrome meetodikate järgi. Valgusmikroskoopia preparaate uuriti ja pildistati Olympus BX-50 mikroskoobiga. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati statistikaprogrammi SPSS 10.0 (Tukey test, Dunnett's test).

Tulemused

Makroskoopiline uuring

Tervete loomade neerud olid oakujulised, pruuni värvi, neerude mass oli 1,3–1,6 g piires. Neerud olid kaetud õhukese sidekoelise kapsliga, vasaku neeru frontaallõikel olid selgelt eristatavad koore ja säsi osad. Opereeritud loomade neerud olid hüpertrofeerunud, neerude kaal oli 1,7–1,95 g. Hüpertrofeerunud neerude uurimisel oli selgelt nähtav isheemilise kahjustuse piirkond, mis oli tingitud neeruarteri kaudaalsete harude ligeerimisest. Neeruarteri verevarustuspiirkonnas oli nähtav neerukoore kahjustus erineva suurusega helepruuni piirkonna näol, mis mõnel juhul laienes ka sügavale säsi piirkonda.

Füsioloogilised näitajad

Tabelis 1 on toodud füsioloogiliste näitajate tulemused. Selgub, et suuremad muutused näitajate kõrgenemise suunas toimusid opereeritud loomade gruppides. Vererõhu (SBP) mõõtmise tulemused näitavad, et peale 5/6 nefrektoomiat kõrgeneb opereeritud loomadel süstoolne vererõhk.

Tabel 1. Süstoolne vererõhk, proteiinuuria, seerum kreatiniin ja cysC eksperimentaalsetes gruppides
Table 1. Systolic blood pressure, proteinuria, serum creatinine, cysC in the experimental groups

Grupp Groups	Proteiinuuria Proteinuria (mg/24 h)	Proteiinuuria Proteinuria (mg/24 h)	Vererõhk / Systolic blood pressure (mm Hg)	Serum creat (µmol/L)	cysC (mg/L)
Nädal/ <i>Weeks</i>	IV	VIII	VIII	VIII	VIII
5/6 NPX	107,2 ± 33,0*	92,0 ± 23,0*	180 ± 7,4*	96 ± 4,7*	1,6 ± 0,1*
Terved / <i>Healthy control</i>	14,1 ± 3,0	18,0 ± 3,5	127 ± 6,9	69 ± 6,3	1,0 ± 0,03

5/6 NPX – opereeritud loomad; 5/6 NPX – *nephrectomized rats*

P<0.05 vs terved; P<0.05 vs *healthy control*

Histoloogiline uuring

Opereeritud loomad (5/6 NPX)

Pärast 5/6 nefrektoomiat tekkinud verevarustuse kahjustus on pikaajaline ja selle tõttu hävivad neerukoe struktuurid. Opereeritud loomade neerudes oli rohkesti kahjustatud neerukehakesi, proksimaalseid ja distaalseid tuubuleid (joon 1). Tuubulites viitas nekroosile rakutuuma puudumine epiteelirakus. Säilinud proksimaalsete tuubulite valendik oli laienenud, epiteel oli madal, epiteelirakkude tsütoplasma sisaldas sõmeraid. Harjasääris oli ebahütlane või puudus, esines ka üksikuid ebakorrapärase kujuga tsütoplasma jätkeid. Samuti olid laienenud distaalsete tuubulite valendikud. Osa epiteelirakke olid madalad, rakkudes esinesid suured vakuolid.

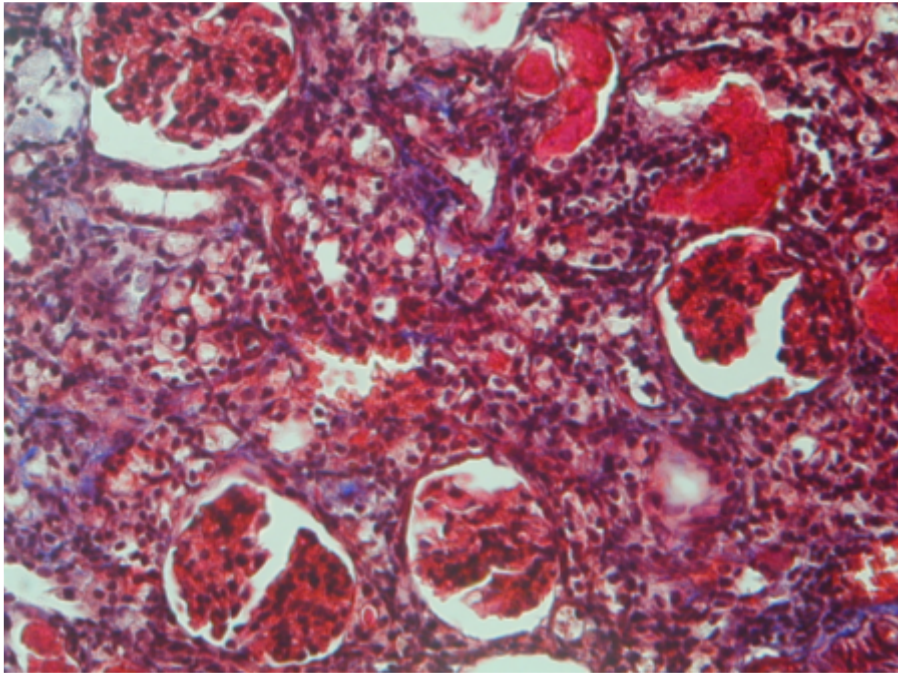
Distaalsete ja proksimaalsete tuubulite valendikud sisaldasid tihti homogeenset eosinofiilset massi. Isheemilise kahjustuse piirkonnas asendus neerukude sidekoega, kahjustuse servas oli täheldatav tugev lümfotsütaarne infiltratsioon ja granulatsioonivalli moodustumine, mille verevarustus oli halb (joon 2). Granulatsioonivalli paksus erinevatel loomadel oli varieeruv. Opereeritud loomadel esines hulgaliselt skleroseerunud neerukehakesi ja mesangiaalrakkude arv päsmakestes oli suurenenud. Mesangiaalrakkude vahel oli rohkesti erütrotsüüte, lümfotsüüte, monotsüüte. Interstitsiaalse koe hulk oli suurenenud. Interstitsiaalses koes olid rühmiti asuvad lümfotsüüdid, makrofaagid, noored basofiilsed fibroblastid, verevalandused, mis kõik viitavad põletikule neerus.

Terved loomad

Tervete rottide neerude morfoloogilisel uurimisel patoloogilisi muutusi ei esinenud. Neerukehakesed olid ümarad, seal asuvad kapillaarid olid ühtlaste valendikega, mesangiaalrakkude arv oli väike. Proksimaalsed ja distaalsed tuubulid olid normis, epiteelirakud olid muutusteta. Proksimaalsete tuubulite epiteelirakkude harjasääris oli tihe ja ühtlane.

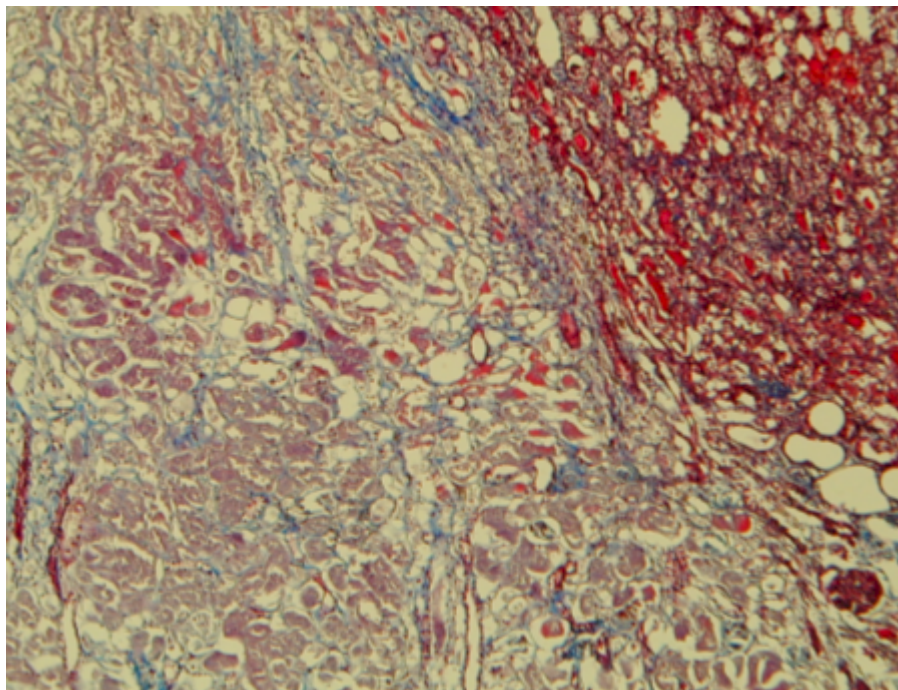
Arutelu

Eksperimentaalse töö eesmärgiks oli alustada Eestis uuringuid, kus on kasutusel maailmas üldlevinud eksperimentaalsed loomud. Eksperimenti tulemuste põhjal leidsime, et meie tulemused sarnanesid kirjanduses leiduvate andmetega, kus on kirjeldatud kroonilise neerupuudulikkuse loomudelitel tekkinud muutusi neerudes (Ots *et al.*, 1998; Fogo, 2003). Eksperiment näitas, et pärast 5/6 nefrektoomiat toimuvad neerudes ulatuslikud muutused, mis väljenduvad nii füsioloogiliste kui morfoloogiliste näitajate muutumises. Morfoloogiliste uuringute põhjal saab väita, et muutused nefronites saavad alguse degeneratiivsetest muutustest proksimaalsetes tuubulites, hiljem laienevad muutused distaalsetele tuubulitele ja neerukehakestele. Et verevarustuse häiretest tingitud kahjustus kestab kaua, siis kulgeb revaskularisatsiooni protsess aeglaselt ja paralleelselt leiavad aset nii reparaatiivsed kui ka degeneratiivsed muutused kuni neeruinfarktini. Protessi areng viib struktuursete muutusteni koes, mille tõttu kahjustuvad neeru funktsioonid. 5/6 nefrektoomia on klassikalise kroonilise neerupuudulikkuse üks mudelitest, mis on praeguseks kasutusele võetud eksperimentide tegemiseks ka Eestis (Aunapuu *et al.*, 2003). Selline eksperimentaalne mudel võimaldab uurida erinevaid kroonilise neerupuudulikkuse aspekte ja lubab lühikese aja jooksul välja tuua kriitilised kroonilise neerupuudulikkuse etapid. Kaasaegne lähenemine kroonilise neerupuudulikkuse ravile eeldab varajaste konservatiivsete meetodite kasutamist selle protsessi kulu aeglustamiseks.



Joonis 1. Kahjustatud tuubilid ja neerukehakesed. Masson trichrome, x368

Figure 1. Changes in the tubules and renal corpuscles. Masson's trichrome stain, x368



Joonis 2. Isheemilise kahjustuse piirkond neerus. H&E, x100

Figure 2. The ischemic area in the kidney. H&E, x100

Oleme alustanud ka eksperimentaalseid isheemia-reperfusiooni mudeli uuringuid, millised võimaldavad hinnata neerukoe muutusi ägeda neerupuudulikkuse korral. Isheemia-reperfusiooni mudel on üheks enam kasutatavaks mudeliks transplantatsiooni puhuse doonororgani reperfusiooni kahjustuse hindamisel. Loommudelite kasutamine on tänapäeval oluline haiguste patogeneesi uurimisel ja ravimite efektiivsuse määramisel.

Tänuavaldused

Käesolev artikkel on ilmunud uurimistoetuste ETF 5943 ja TARSK 0472 abil.

Kirjandus

- Aunapuu, M., Pechter, Ü., Roosaar, P., Gerškevič, E., Marjamägi, M. M., Arend, A., Kolts, I., Ots, M. 2003. Morphological changes in the kidney after 5/6 nephrectomy and low-dose radiation. – *Tsitologija*, 45(6):555–563.
- Brown, N. J., Vaughan, D. E., Fogo, A. B. 2002. The renin-angiotensin-aldosterone system and fibrinolysis in progressive renal disease. – *Semin Nephrol* 22(5):399–406.
- Chanutin, A., Ferris, E. 1932. Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy. – *Arch Intern Med* 49:767–787.
- Chatterjee, P. K., Thiernemann, C. 2003. An *in vivo* model of ischemia/reperfusion and inflammation the kidneys of the rat. – *Methods Mol Biol* 225:223–237.
- Faraj, A. H., Morley, A. R. 1992. Remnant kidney pathology after five-sixth nephrectomy in rat. I. A biochemical and morphological study. – *Apmis* 100(12):1097–1105.
- Faraj, A. H., Morley, A. R. 1993. Remnant kidney pathology after five-sixth nephrectomy in rat. II. Electron microscopy study. – *Apmis* 101(1):83–90.
- Fogo, A. B. 2003. Animal models of FSGS: lessons for pathogenesis and treatment. – *Semin Nephrol* 23(2):161–171.
- Grinyo, J. M. 2001. Role of ischemia-reperfusion injury in the development of chronic renal allograft damage. – *Transplant Proc* 33(7–8):3741–3742.
- Heyman, S. N., Lieberthal, W., Rogiers, P., Bonventre, J. V. 2002. Animal models of acute tubular necrosis. – *Curr Opin Crit Care* 8(6):526–534.
- Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A., Brenner, B. M. 1981. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. – *Am J Physiol* 241(1):F85–93.
- Krinke, A. 2000. Laboratory rat. – *Acad. Press*, 294–295; 385–400.
- Meyer, T. W., Anderson, S., Brenner, B. M. 1985. Converting enzyme inhibitor therapy limits progressive glomerular injury in rats with renal insufficiency. – *Am J Med* 79(3C):31–36.
- Ots, M., Mackenzie, H. S., Troy, J. L., Rennke, H. G., Brenner, B. M. 1998. Effects of combination therapy with enalapril and losartan on the rate of progression of renal injury in rats with 5/6 renal mass ablation. – *J Am Soc Nephrol* 9(2):224–230.
- Ots, M., Pechter, Ü., Tamm, A. 2000. Characteristics of progressive renal disease. – *Clin Chim Acta* 297(1–2):29–41.
- Padanilam, B. J. 2003. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. – *Am J Physiol Renal Physiol* 284(4):F608–627.

Experimental renal failure

M. Aunapuu, Ü. Pechter, M. Ots

Summary

Experimental animals and protocol

The experiments were performed on 30 male Wistar rats. All animal procedures were conducted after approval of the protocol by the animal Studies Ethics Committee of the University of Tartu. At approximately eight weeks of age, 20 rats weighing 262–280 g were anesthetized with intraperitoneal methohexital sodium (5 mg per 100 g body weight, Brietal, LILLY GmbH, Germany). Renal ablation was then accomplished by right nephrectomy and selective ligation of extrarenal branches of the left renal artery such that approximately 2/3 of the left kidney was infarcted. Normal Wistar rats (n=10), without surgery, were studied as healthy controls. Systolic blood pressure (mm Hg) was measured weekly by the tail cuff method (Harvard Rat Tail Blood Pressure Apparatus) in awake prewarmed rats. The urine was collected for 24 hours using metabolic cages at week 4 and 8. Determination of creatinine ($\mu\text{mol/L}$) and proteinuria (g/24h) were measured with a Hitachi 912 Analyser. All statistical analyses were done with statistical software package SPSS 10.0.

Morphological studies

At the end of the experiment (IV wk; VIII wk), rats were anesthetized with Brietal (50 mg per 100 g body weight). Coronal sections of the remnant kidneys were obtained and fixed in 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin. Paraffin sections of coronal slices through the pelvis of the remnant kidney were cut at four- μm thickness and stained using the H&E, van Gieson, periodic acid-Schiff and Masson's Trichrome methods for examination by light microscopy.

Results

Physiological results

Results were summarized in Table 1. Average levels of systolic blood pressure (mm Hg) in nephrectomized groups were lower than healthy control animals ($P < 0.05$). The values of mean proteinuria (g/24h), serum creatinine ($\mu\text{mol/L}$) and cysC (mg/L) was difference between nephrectomized and healthy control groups ($P < 0.05$).

Morphology

Kidneys were examined 4 and 8 weeks after 5/6 nephrectomy. Studies demonstrated that glomerular changes can be associated with renal ablation. The renal corpuscles of nephrectomized groups were plump, collapsed and sclerotic (Figure 2). The cells of proximal tubules had detriment and short brushborder, tubules contained hyalin. The epithelial cells of distal tubules were irregular. The atrophied tubules and renal corpuscles in ischemic area are finally replaced by connective tissue (Figure 1).

In summary, hypertension is the major factor determining progression of the chronic renal disease. Our results demonstrate that after renal ablation systolic blood pressure and proteinuria increase. Morphological changes in kidneys result in focal segmental glomerulosclerosis and interstitial fibrosis after renal mass ablation.