

DOI: 10.26693/jmbs04.06.349

УДК 616.45-008.64:57.012.4:[615.361:615.452.1:618.46]:57.086.13

*Рєпін М. В., Марченко Л. М., Говоруха Т. П.,  
Строна В. І., Чиж Ю. О.*

## УЛЬТРАСТРУКТУРА НАДНИРНИКІВ ЩУРІВ З ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ПІСЛЯ ТЕРАПІЇ КРІОЕКСТРАКТОМ ПЛАЦЕНТИ НА ТЛІ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ БЛОКАДИ РААС

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

1nvrepin@gmail.com

Проведено електронно-мікроскопічне та морфометричне дослідження клітин клубочкової зони кори наднирників щурів з хронічною нирковою недостатністю при введенні алогенного кріоекстракту плаценти та застосуванні медикаментозної блокади ренін-ангіотензин-альдостеронової системи енапом та верошпіроном. Моделювання токсичної ниркової недостатності проводили на безпородних білих щурах шляхом внутрішньом'язового введення 50% водного розчину гліцеролу. При сформованій протягом 8 тижнів хронічної ниркової недостатності в корі наднирників спостерігалися функціональні і ультраструктурні ознаки посилення процесів біосинтезу і секреції альдостерону, які проявлялися в гіпертрофії ендоплазматичного ретикулулу та набряканні мітохондрій, утворенні в них мієліноподібних структур, а також наявності комплексів мітохондрій, ендоплазматичного ретикулулу та ліпосом в адренкортикоцитах, зменшенні товщини клубочкової зони, гіперкаліємії. У всіх груп тварин, яким застосовувалась медикаментозна блокада ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, та після введення кріоекстракту плацентарної тканини, спостерігалось вірогідне збільшення товщини клубочкової зони кори наднирників у порівнянні з нелікованими тваринами, поліпшення електролітного обміну до рівня контролю. Медикаментозна блокада ренін-ангіотензин-альдостеронової системи приводила до зменшення морфологічних ознак активації стероїдогенезу в корі наднирників на 8-му тижні хронічної ниркової недостатності.

Коливання вмісту іонів натрію і калію в сироватці крові та в сечі щурів через 8 тижнів після введення гліцеролу свідчать про порушення каналцевої реабсорбції в проксимальних та дистальних відділах нефронів, викликані розвитком хронічної ниркової недостатності у нелікованих тварин. Застосування медикаментозної блокади ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, введення кріоекстракту плацентарної тканини та їх комплекс-

ний вплив поліпшують електролітний обмін до рівня контролю на цей термін спостереження, що значною мірою пов'язано з нормалізацією синтезу та секреції альдостерону адренкортикоцитами.

**Ключові слова:** хронічна ниркова недостатність, наднирники, кріоекстракт плаценти, ультраструктура, ренін-ангіотензин-альдостеронова система.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана за планом НДР «Дослідити морфологічні і функціональні аспекти нефропротекторної і регенераційної дії кріоекстракту плаценти при моделюванні патології нирки у щурів», № держ. реєстрації 0116U003495.

**Вступ.** Хронічна ниркова недостатність (ХНН) – це порушення гомеостазу, викликане безповоротним зниженням маси діючих нефронів. Виникає вона при всіх прогресуючих захворюваннях нирок і проявляється багатосимптомним комплексом, що відображає участь в цьому процесі практично всіх органів і систем [1].

При формуванні ниркової недостатності відбувається розвиток істотно виражених структурних змін, які можливо мінімізувати за рахунок введення сполук, що нормалізують метаболізм тканин і підвищують їх репаративні властивості. Дані літератури свідчать про успішну апробацію при корекції ниркової патології препаратів з епітелію фетальної нирки [2], мезенхімальних ствольових клітин кісткового мозку [3], препаратів плаценти [4] та інших біологічних об'єктів, які активізують регенерацію клітин і відновлюють порушений клітинний і тканинний гомеостаз [5].

Ренін-ангіотензин-альдостеронова система (РААС) відіграє ключову роль в регуляції артеріального тиску (АТ), а її активація при ХНН призводить до розвитку артеріальної гіпертензії (АГ) і в кінцевому підсумку до ураження органів-мішеней [6]. Препарати, що діють на РААС, наприклад інгібітори

ангіотензинперетворюючого ферменту (іАПФ) і блокатори рецепторів ангіотензину (БРА), є ефективними методами терапії АГ і значно знижують частоту серцево-судинних і ниркових ускладнень. Однак пригнічення утворення ангіотензину при застосуванні іАПФ або блокада його ефектів при застосуванні БРА призводять до збільшення секреції реніну нирками, а також стимулюють компенсаторне підвищення активності реніну плазми, що в результаті забезпечує тільки часткове зниження активності РААС [7].

Важлива роль в підтримці іонного гомеостазу належить наднирникам та їх гормону – альдостерону. Альдостерон діє через мінералокортикоїдний рецептор, який експресується в клітинах епітелію, що здійснюють транспорт натрію (епітеліальні клітини дистального відділу нефрону). Секреція альдостерону в організмі також контролюється ренін-ангіотензиною системою, яка є важливим чинником трофіки клубочкової зони наднирників [8]. Дані літератури, а також наші електронно-мікроскопічні дослідження вказують на те, що зростання об'ємної щільності мітохондрій і везикул ЕПР вказує на посилення біосинтезу альдостерону, оскільки добре відомо, що ферменти, які беруть участь в синтезі цього гормону, розташовані в цих органелах [9]. В той же час, зниження об'єму ліпідних крапель клітин клубочкової зони, може свідчити про посилення їх функції, оскільки холестерин і складні ефіри холестерину, які є попередниками стероїдних гормонів, зберігаються внутрішньоклітинно в ліпідних краплях і що виснаження останніх може бути пов'язано з прискореним використанням холестерину для синтезу альдостерону. Гіпертрофія апарату Гольджі також може вказувати на посилення синтезу альдостерону, оскільки відомо, що ця органела бере участь в стероїдогенезі [9]. Антагоністи альдостерону, такі як спіронолактон, розривають коло зворотних взаємозв'язків, яке призводить до травмування нирок, вони мають також антифібротичну дію.

Виходячи з цього, ми припустили, що інгібування РААС може впливати на геометричні параметри клубочкової зони, морфологічні та ультраструктурні характеристики її клітин.

**Мета роботи** – дослідження ультраструктури клітин клубочкової зони кори наднирників щурів з ХНН при введенні алогенного кріоекстракту плаценти та застосуванні медикаментозної блокади РААС.

**Матеріал та методи дослідження.** У роботі використано модель токсичного ураження нирок. Всі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для

експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Дослідження проводили в процесі формування хронічної ниркової недостатності [10, 11]. Матеріалом дослідження служили 40 білих беспородних щурів масою тіла 180-200 г, віком 4 місяці.

Для моделювання ниркової недостатності щурів витримували 24 години без їжі, після чого внутрішньом'язово вводили 50% водний розчин гліцеролу в дозі 10 мл на 1 кг маси тіла. Тварини були розподілені на 4 групи:

- група 1 – щури з моделлю ХНН;
- група 2 – щури з моделлю ХНН, яким застосовували медикаментозну блокаду РААС за допомогою енапу (таблетки по 2,5 мг фірми KRKA, Словенія) та верошпірону (таблетки по 25 мг фірми Гедеон Ріхтер), які вводили орально у формі суспензії в дозі 0,5 мл (10 мг енапу та 200 мг верошпірону в 30 мл фізіологічного розчину) протягом 2 тижнів, починаючи з другого тижня після введення гліцеролу;
- група 3 – щури з моделлю ХНН, яким на другому тижні розвитку патології внутрішньом'язово вводили кріоекстракт плацентарної тканини щура (КЕП) по 0,5 мл тричі протягом тижня;
- група 4 – щури з моделлю ХНН, яким застосовували медикаментозну блокаду РААС та вводили одночасно КЕП за вищезазначеними дозами.

Контролем були інтактні щури. Розрахунок доз медикаментів проводили за формулою Риболовлева [12]. Кріоекстракт плаценти щура виготовляли за описаним раніше методом [4]. Тварин виводили з експерименту через 8 тижнів після введення гліцеролу. Для електронно-мікроскопічних досліджень були взяті ліві наднирники щурів. Фрагменти тканини наднирників фіксували в 3 % розчині глутарового альдегіду на фосфатному буфері та чотирьохокисю осмію, поміщали в епон-аралит. Напівтонкі зрізи (0,5 мкм) забарвлювали метиленовим синім та лужним фуксином, аналізували в оптичному мікроскопі ЛЮМАМ-МП-4 («ЛОМО», СРСР). Ультратонкі зрізи контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю. Ультраструктуру клітин досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К (АТ «Selmi», Україна).

На напівтонких зрізах наднирників вимірювалась товщина клубочкової зони за допомогою програми TopTek TopView 3.7. В сироватці крові і в сечі визначали рівень іонів натрію та калію емісійним полум'яно-фотометричним методом. Виміри проводили на спектрофотометрі іСЕ3500 фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.»; аналітичні лінії  $\text{Na}^+$ ,

K<sup>+</sup>, відповідали 589,0 і 766,5 нм. У роботі використовували полум'я газової суміші: ацетилен-повітря.

Статистична обробка отриманих результатів проводилася за допомогою стандартної програми Statgraph 2.1. Рівень достовірності складав 0,05 і 0,01, вірогідність оцінювали за допомогою критерію Уїтні-Мана.

**Результати дослідження та їх обговорення.**

Оскільки стероїдні гормони не накопичуються у клітинах і відразу екскретуються [13], ми припустили, що активізація синтезу альдостерону призводить до витончення клубочкового шару наднирників через зменшення кількості ліпідних включень, які використовуються для синтезу стероїдів. Результати вимірювання товщини клубочкової зони наднирників наведено в таблиці 1.

**Таблиця 1** – Товщина клубочкової зони кори наднирників щурів з ХНН та після застосування медикаментозної блокади РААС, введення КЕП та їх комбінації

Група	Товщина клубочкової зони, мкм
Контроль	57,26±3,40 <sup>2,4,5</sup>
1 –ХНН	47,90±3,23 <sup>1,3,4,5</sup>
2 –ХНН-Б	65,98±5,13 <sup>1,2</sup>
3 –ХНН-КЕП	61,23±6,25 <sup>2</sup>
4 –ХНН-Б-КЕП	66,15±3,99 <sup>1,2</sup>

**Примітки:** 1 – вірогідно в порівнянні з групою контролю; 2 – вірогідно в порівнянні з групою ХНН; 3 – вірогідно в порівнянні з групою ХНН-КЕП; 4 – вірогідно в порівнянні з групою ХНН-Б-КЕП; 5 – вірогідно в порівнянні з групою ХНН-Б. p<0,05.

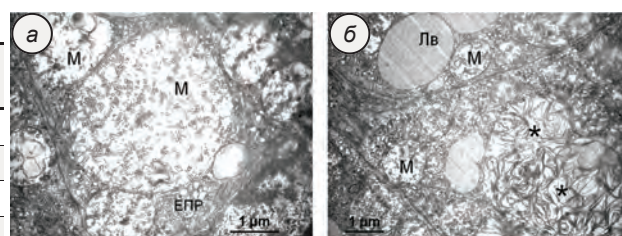
Різниця між товщиною зони у контролі та після введення гліцеролу є достовірною, тобто створена модель ХНН на 8 тиждень експерименту підвищила інтенсивність синтезу та секреції альдостерону.

У всіх груп тварин, яким застосовувалась медикаментозна блокада РААС, та після введення КЕП, спостерігалось вірогідне збільшення товщини клубочкової зони кори наднирників у порівнянні з нелікованими тваринами.

Це може свідчити про зменшення синтезу та секреції альдостерону та нормалізації активності цього важливого компоненту РААС, що в свою чергу може призвести до призупинення розвитку ниркової патології [14].

Електронно-мікроскопічне дослідження тканини наднирників при розвитку ХНН (група 1) впродовж 8 тижнів експерименту показало, що їх корковий шар представлений епітеліальними тяжами адренкортикоцитів. Плазматична мембрана адренкортикоцитів утворювала мікрворсинки в міжклітинному просторі і перикапілярних зонах. Ядра адренкортикоцитів, як і в нормі, характеризувалися

округлими формами, рівним контуром, з переважанням дрібнодисперсного хроматину. Гетерохроматин у вигляді скупчень концентрувався біля ядерця і внутрішньої ядерної мембрани. Лише в окремих клітинах спостерігалось розширення перинуклеарного простору. У цитоплазмі клітин клубочкової, перехідної і пучкової зон виявлялися мітохондрії з проясненням матриксу, частковою редукцією крист. Зустрічалися також гігантські мітохондрії з високим ступенем набрякання (рис. 1, а), а також органели з наявністю внутрішньомітохондріальних вакуолей. Кількість ліпосом у клітинах зовнішньої частини клубочкової зони була мінімальною на відміну від внутрішньої. Вони мали гомогенну внутрішню структуру і низьку електронну щільність. Ліпосоми часто контактували з мітохондріями і вакуолями ендоплазматичного ретикулу, утворюючи складні мембранні комплекси (рис. 1, б).



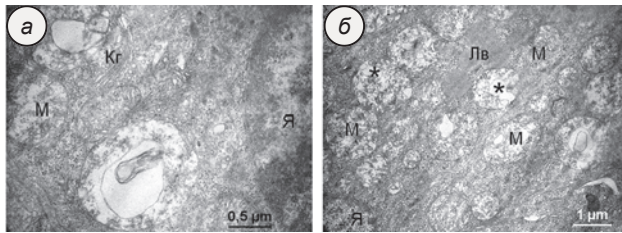
**Рис. 1.** Ультраструктура адренкортикоцитів клубочкової зони кори наднирників щурів з ХНН:

а – набрякання мітохондрій і везикул агранулярного ЕПР; б – складні комплекси (\*) мітохондрій і ліпосом

**Позначення:** М – мітохондрії; ЕПР – ендоплазматичний ретикулума; Лв – ліпідні включення.

Такі ультраструктурні ознаки як зменшення кількості ліпосом, утворення складних комплексів з мітохондріями, наявність внутрішньомітохондріальних вакуолей і гігантських мітохондрій в клітинах клубочкової зони свідчать про збереження до 8-го тижня розвитку ХНН високого рівня синтезу і екскреції альдостерону.

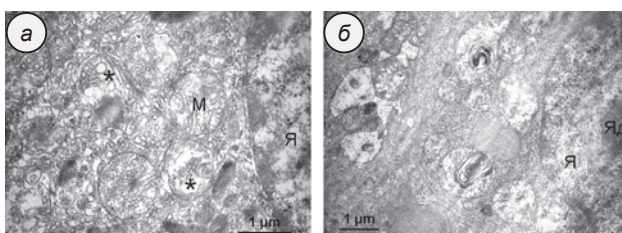
Електронно-мікроскопічне дослідження тканини наднирників щурів з ХНН при застосуванні медикаментозної блокади РААС (група 2) показало, що ядра клітин клубочкової зони мали округлу або овальну форму з рівномірним розташуванням гетерохроматину уздовж ядерної мембрани і добре вираженими ядерними порами. Комплекс Гольджі переважно був локалізований біля ядра і представлений стопками цистерн і багаточисельними гладкоконтурними і облямованими везикулами. Частина везикул мала електроннощільний вміст (рис. 2, а). Клубочкова і перехідна зони характеризувалися наявністю мітохондрій з локальною дезінтеграцією крист і проясненням матриксу, а також внутрішньомітохондріальних вакуолей (рис. 2, б; 3, а).



**Рис. 2.** Ультраструктура адренкортикоцитів клубочкової зони кори наднирника щура з ХНН після застосування блокади РААС:

а – гіпертрофія елементів комплексу Гольджі;  
а б – внутрішньомітохондріальні вакуолі (\*);

**Позначення:** Я – ядро; КГ – комплекс Гольджі; М – мітохондрії; Лв – ліпосоми



**Рис. 3.** Ультраструктура адренкортикоцитів перехідної (а) і клубочкової (б) зон наднирників щурів з ХНН після застосування блокади РААС:

а – дезінтеграція крист (\*); б – мієліноподібні структури в мітохондріях

**Позначення:** Я – ядро; Яд – ядерце; М – мітохондрії.

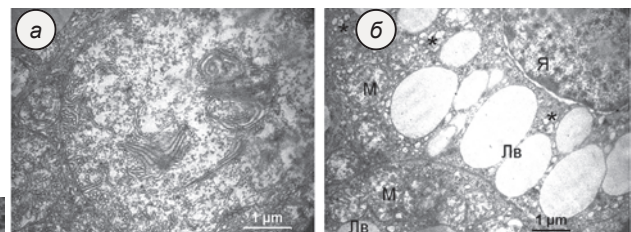
Виявлялася також трансформація крист мітохондрій з утворенням мієліноподібних структур (рис. 3, б), що свідчить про дистрофічні зміни цих органел, які є результатом функціонального перенапруження.

Також спостерігалось утворення багат шарових мембран по периферії мітохондрій, що розглядається деякими авторами як прояв підвищення їх функціональної активності [15]. У клітинах всіх зон кори спостерігався слабкий ступінь розвитку ЕПР, каналці якого були подекуди розширені.

Слід зазначити, що складних комплексів, утворених мітохондріями, ліпосомами і везикулами агранулярного ЕПР не спостерігалось, що може свідчити про гальмування процесів стероїдогенезу, обумовлених медикаментозною блокадою РААС.

Електронно-мікроскопічне дослідження тканини наднирників щурів з ХНН після введення КЕП (група 3) показало, що стан ядра і органоїдів цитоплазми клітин кори був близький до характерного для групи ХНН. У клубочковій зоні спостерігалось набрякання і значне розширення везикул гладкого ЕПР. Комплекс Гольджі складався з системи паралельно орієнтованих мішечків, вакуолей і мікроевезикул, серед яких переважали облямовані форми. Частина мітохондрій мала подовжену форму і ви-

разні поперечні кристи в матриксі. В той же час спостерігалися набряклі мітохондрії з просвітленим матриксом, а також гігантські мітохондрії з кристами різноманітної форми (рис. 4, а). У цитоплазмі адренкортикоцитів клубочкової зони визначалися багаточисельні ліпосоми низької електронної щільності (рис. 4, б), які утворювали комплекси з мітохондріями і рідше з гладким ЕПР.



**Рис. 4.** Ультраструктура адренкортикоцитів клубочкової зони наднирників щурів з ХНН після введення КЕП:

а – гігантська мітохондрія з поліморфізмом крист;  
б – розширення цистерн агранулярного ЕПР (\*) і ліпосоми (Лв) низької електронної щільності в цитоплазмі

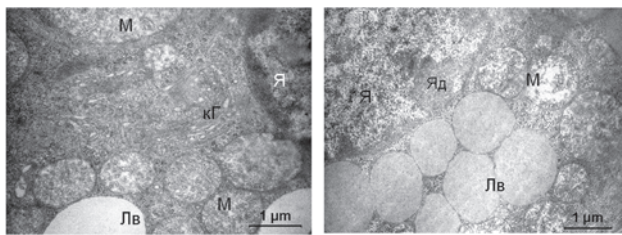
**Позначення:** Я – ядро; Лв – ліпосоми.

Таким чином, спостережувані ультраструктурні зміни – набрякання і збільшення розмірів мітохондрій, активація комплексу Гольджі з переважанням клатринових везикул, наявність складних комплексів мітохондрій і ліпосом – можуть свідчити про активний синтез кортикостероїдів наднирниками щурів із сформованою ХНН, незважаючи на введення КЕП, що спостерігалось і в попередніх дослідженнях [16].

Ультраструктура адренкортикоцитів наднирників щурів з ХНН після дії блокади РААС і введення КЕП (група 4) мало відрізнялась від контролю. Так, ядра більшості клітин мали округлу форму з примембранною локалізацією гетерохроматину та його брилчастими скупченнями по всьому об'єму ядра. Крупні активні ядерця глобулярно-фібрилярної природи розташовувалися в центрі ядра або ексцентрично.

Розширення перинуклеарного простору ми не спостерігали. Комплекс Гольджі частіше розташовувався поблизу ядра і складався зі сплюснених цистерн і великої кількості клатринових везикул (рис. 5, а). У цитоплазмі клітин клубочкової зони мітохондрії мали переважно нормальну будову, характеризувалися матриксом середньої електронної щільності з чіткими пластинчастими кристами. Матрикс мітохондрій в перехідній зоні був трохи просвітленим, кристалоїди не виявлені. Необхідно відзначити відсутність в клубочковій і пучковій зонах внутрішньомітохондріальних вакуолей, а також комплексів мітохондрій і ліпосом, характерних для інших груп тварин. Кількість ліпосом в клітинах

була нерівномірною: від повної їх відсутності до значного заповнення клітини скупченнями дрібних, середньої електронної щільності органел (рис. 5, б).



**Рис. 5.** Ультраструктура адренокортикоцитів клубочкової зони наднирника щура з ХНН після застосування блокади РААС і введення КЕП:

а – комплекс Гольджі; б – ліпосоми в цитоплазмі

**Позначення:** Я – ядро; Яд – ядерце; М – мітохондрії; Лв – ліпосоми; кГ – комплекс Гольджі.

Поблизу ліпідних крапель зустрічалися гранули глікогену, а також вільні рибосоми. Структура цистерн агранулярного ЕПР не змінювалася. У міжклітинному просторі виявлялися, як і в нормі, багаточисельні мікрворсинки, їх було також багато на поверхні, зверненій до перикапілярного простору. Таким чином, у тварин цієї групи в ультраструктурі клітин кори наднирників були відсутні морфологічні ознаки посилення синтезу кортикостероїдів.

Зважаючи на те, що альдостерон, який синтезується клубочковою зоною наднирників, є одним з основних регуляторів екскреції електролітів: він збільшує реабсорбцію натрію та хлору з просвіту каналців і одночасно підсилює секрецію в них іонів калію, необхідно було визначити електролітний склад крові експериментальних тварин, а також екскрецію іонів калію та натрію з сечею. Проведені дослідження свідчать, що через 8 тижнів після введення гліцеролу, рівень  $K^+$  в сироватці крові тварин групи ХНН значно підвищився, разом з тим екскреція його з сечею теж перевищувала контрольні значення (табл. 2). У тварин всіх груп з використанням блокади РААС і КЕП рівень іонів калію в сироватці крові не відрізнявся від контролю, але мала місце тенденція до гіперкаліємії. Екскреція  $K^+$  незначно підвищувалась у щурів з використанням блокади РААС та комплексного впливу КЕП та блокади РААС.

Відомо, що при розвитку ХНН можуть спостерігатися коливання вмісту іонів натрію в плазмі крові від гіпонатріємії до гіпернатріємії [6].

Концентрація  $Na^+$  у сироватці крові щурів з ХНН була найвищою у порівнянні з контролем та всіма іншими групами тварин. Цей показник вірогідно був вищим за контроль в групі ХНН-Б. У тварин з введенням КЕП та введенням КЕП на фоні блокади РААС рівень іонів натрію в сироватці крові

**Таблиця 2** – Концентрації іонів натрію і калію в сироватці крові та сечі щурів з ХНН, після введення КЕП та медикаментозної блокади РААС

Група	Сироватка крові		Сеча	
	$Na^+$ , ммоль/л	$K^+$ , ммоль/л	$Na^+$ , ммоль/л	$K^+$ , ммоль/л
Контроль	$136,33 \pm 7,37^{2,5}$	$6,47 \pm 0,08^2$	$52,30 \pm 0,40^{2,4}$	$38,50 \pm 16,10^2$
1–ХНН	$150 \pm 2,65^{1,3,4,5}$	$6,90 \pm 0,12^1$	$106,30 \pm 10,89^{1,4,5}$	$82,70 \pm 4,67^{1,3,4,5}$
2–ХНН-Б	$144,33 \pm 0,58^{1,2}$	$7,23 \pm 1,16$	$63,84 \pm 4,23^{1,2,3,4}$	$49,76 \pm 4,65^{2,3}$
3–ХНН-КЕП	$139,00 \pm 6,56$	$7,95 \pm 2,15$	$52,45 \pm 1,91^{2,4}$	$24,65 \pm 1,48^{2,4,5}$
4–ХНН-Б-КЕП	$142,67 \pm 3,51$	$6,86 \pm 0,44$	$54,91 \pm 2,72^{2,5}$	$46,33 \pm 3,21^{2,3}$

**Примітки:** 1 – вірогідно в порівнянні з групою контролю; 2 – вірогідно в порівнянні з групою ГНН; 3 – вірогідно в порівнянні з групою ГНН-КЕП; 4 – вірогідно в порівнянні з групою ГНН-Б-КЕП; 5 – вірогідно в порівнянні з групою ГНН-Б.  $p < 0,05$ .

не відрізнявся від контрольних значень. Екскреція іонів  $Na^+$  вірогідно зростала у щурів з ХНН, тоді як у груп тварин ХНН-КЕП та ХНН-Б-КЕП вона була близька до норми.

Отже, коливання вмісту іонів натрію і калію в сироватці крові та в сечі щурів через 8 тижнів після введення гліцеролу свідчать про порушення каналцевої реабсорбції в проксимальних та дистальних відділах нефронів, викликані розвитком ХНН у нелікованих тварин. Застосування медикаментозної блокади РААС, введення КЕП та їх комплексний вплив поліпшують електролітний обмін до рівня контролю на цей термін спостереження, що значною мірою пов'язано з нормалізацією синтезу та секреції альдостерону адренокортикоцитами.

#### Висновки

1. При сформованій протягом 8 тижнів після введення гліцеролу ХНН в корі наднирників спостерігалися функціональні і ультраструктурні зміни, що свідчать про посилення процесів біосинтезу і секреції альдостерону, які підтримуються активацією ренін-ангіотензин-альдостеронової системи.
2. Застосування медикаментозної блокади РААС на ранній стадії розвитку ниркової патології призводило до зменшення морфологічних ознак активації стероїдогенезу в адренокортикоцитах клубочкової зони наднирників до 8 тижнів розвитку ХНН.
3. Комплексне застосування блокади РААС і введення КЕП сприяє нормалізації ультраструктури адренокортикоцитів клубочкової зони кори наднирників, що може свідчити про уповільнення процесів синтезу і секреції альдостерону у порівнянні з групою нелікованих тварин.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальшому планується дослідити вплив комплексної дії криоекстракта плаценти та блокади РААС у віддалені терміни розвитку хронічної ниркової недостатності.

### References

1. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Ortega JA, Sánchez A, Rodríguez-Romo R, Durand M, et al. Mild ischemic injury leads to long-term alterations in the kidney: amelioration by spironolactone administration. *Int J Biol Sci.* 2015; 11(8): 892–900. PMID: 26157344. PMCID: PMC4495407. DOI: 10.7150/ijbs.11729
2. Kirpatovskii VI, Kazachenko AV, Kon'kova TA, Drozhzheva VV, Nadtochii ON, Plotnikov EYu, et al. Functional aftereffects of intraparenchymatous injection of human fetal stem and progenitor cells to rats with chronic and acute renal failure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2006; 141(4): 500–6. doi: 10.1007/s10517-006-0209-x
3. Iwatani H, Imai E. Kidney repair using stem cells: myth or reality as atherapeutic option. *Nethrol.* 2010; 23(2): 143–6. PMID: 20175054
4. Yurchenko TN, Kondakov II, Strona VI. Renal effects following introduction of cryopreserved placental extract on the background of experimental renal failure. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2014; 24(1): 75–8. doi: 10.15407/cryo24.01.075
5. Goltsev AN, Ostankova LV, Lutsenko ED, Dubrava TG, Opanasenko EV, Prokofyeva VA. Response of the lymphohemopoietic system of the organism on the injection of the products of the fetoplacental complex. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2000; 2: 15–30.
6. Tareev EM, Ed. *Clinical nephrology.* Vol 2. M: Meditsina, 1983.
7. Moiseev SV, Arutyunov GP, Fomin VV. ACE inhibitors and nephroprotection in chronic proteinuric nephropathies. *Clinical Nephrology.* 2009; 2: 31–6.
8. Baranova E, Bolshakova O, Berkovich O. Aldosterone blockade, a new strategy in the treatment of resistant hypertension. *Arterial'naya Gipertenziya. Arterial Hypertension.* 2008; 14(3): 203–10. doi: 10.18705/1607-419X-2008-14-3-203-210
9. Cui D, Naftel JP, Daley WP, et al. *Atlas of histology: with functional and clinical correlation.* NY-London-Buenos Aires-Hong Kong-Sydney-Tokyo; 2011. 439 p.
10. Topchii II, Kondakov II, Kirienko OM. Effect of cryo placenta extract on the structure and function of rats kidneys with acute or chronic renal failure. *Ukrainian journal of nephrology and dialysis.* 2014; 43(3): 62–7. doi: 10.31450/ukrind.3(43).2014.11
11. Romanenko AM, Nepomnyashchyi VM Morphological diagnosis of nephrological diseases. In: *Nephrology.* Kyiv: Zdorov'ya; 2004. p. 38–97.
12. Rybolovlev YuR, Rybolovlev RC. Dosing of substances for mammals by biological activity constants. *Reports of Academy of Sciences of the USSR.* 1979; 247(6): 1513–6. [Russian]
13. Epstein M. Aldosterone and the hypertensive kidney: its emerging role as a mediator of progressive renal dysfunction: a paradigm shift. *J Hypertens.* 2001; 19(5): 829–42. PMID: 11393664. DOI: 10.1097/00004872-200105000-00001
14. da Silva BB, Lopes-Costa PV, Rosal MA, Pires CG, dos Santos LG, Gontijo JA, et al. Morphological and morphometric analysis of rat's adrenal cortex of androgenized female rats. *Gynecol Obstet Invest.* 2007; 64(1): 44–8. PMID: 17259713. DOI: 10.1159/000098956
15. Gordienko VM, Kozrytsky VG. *Ultrastructure of endocrine system glands.* Kiev: Zdravie. 1978.
16. Marchenko LM, Govorukha TP, Repin MV, Strona VI. Influence of preliminary introduction of placenta cryoextracts on ultrastructure of rat's adrenal gland glomerular zone with acute renal failure. *Morphology.* 2018; 12(2): 40–5. doi: 10.26641/1997-9665.2018.2.40-45

УДК 616.45-008.64:57.012.4:[615.361:615.452.1:618.46]:57.086.13

### УЛЬТРАСТРУКТУРА НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПОСЛЕ ТЕРАПИИ КРИОЭКСТРАКТОМ ПЛАЦЕНТЫ НА ФОНЕ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ БЛОКАДЫ РААС

**Репин Н. В., Марченко Л. Н., Говоруха Т. П., Строна В. И., Чиж Ю. А.**

**Резюме.** Проведено электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование клеток клубочковой зоны коры надпочечников крыс с хронической почечной недостаточностью при введении аллогенного криоекстракта плаценты и применении медикаментозной блокады ренин-ангиотензин-альдостероновой системы энапом и верошпироном. Моделирование токсической почечной недостаточности проводили на беспородных белых крысах путем внутримышечного введения 50% водного раствора глицерола. При сформированной в течение 8 недель хронической почечной недостаточности в коре надпочечников наблюдались функциональные и ультраструктурные признаки усиления процессов биосинтеза и секреции альдостерона, которые проявлялись в гипертрофии эндоплазматического ретикулула и набухании митохондрий, образовании в них миелоноподобных структур, а также наличии комплексов митохондрий, эндоплазматического ретикулула и липосом в адренокортикоцитах, уменьшении толщины клубочковой зоны, гиперкалиемии. У всех групп животных, которым применялась медикаментозная

блокада ренин-ангіотензин-альдостеронової системи, і після введення криоекстракта плацентарної тканини, наблюдалось достоверное увеличение толщины клубочковой зоны коры надпочечников по сравнению с нелечеными животными, улучшение электролитного обмена до уровня контроля. Медикаментозная блокада ренин-ангіотензин-альдостеронової системи приводила к уменьшению морфологических признаков активации стероидогенеза в коре надпочечников на 8-й неделе хронической почечной недостаточности. Колебания содержания ионов натрия и калия в сыворотке крови и в моче крыс через 8 недель после введения глицерина свидетельствуют о нарушении канальцевой реабсорбции в проксимальных и дистальных отделах нефронов, вызванные развитием хронической почечной недостаточности у нелеченных животных. Применение медикаментозной блокады ренин-ангіотензин-альдостеронової системи, введение криоекстракта плацентарной ткани и их комплексное воздействие улучшают электролитный обмен до уровня контроля на этот срок наблюдения, в значительной мере связано с нормализацией синтеза и секреции альдостерона адренокортикоцитами.

**Ключевые слова:** хроническая почечная недостаточность, надпочечники, криоекстракт плаценты, ультраструктура, ренин-ангіотензин-альдостероновая система.

UDC 616.45-008.64:57.012.4:[615.361:615.452.1:618.46]:57.086.13

### Ultrastructure of Rat Adrenal Glands with Chronic Renal Insufficiency

#### Following Placental Cryoextract Therapy in the Course of RAAS Medicated Blocking

*Repin N. V., Marchenko L. N., Govorukha T. P., Strona V. I., Chizh Yu. A.*

**Abstract.** Chronic renal insufficiency involves dyscrasia, caused by the irrevocable weight loss of the active nephrons, which is accompanied by hyperactivation of the renin-angiotensin-aldosterone system. Placental preparations are successfully applied in treatment of various diseases. The ultrastructural changes in the adrenocorticocytes and the level of cell saturation with lipids will allow assessing the range of the aldosterone secretion.

*The purpose of the study* was to research the cell fine structures in the adrenal cortex of the zona glomerulosa in the rats with chronic renal insufficiency following injection of the allogenic placental cryoextract and application of a medicated renin-angiotensin-aldosterone system blocking.

*Material and methods.* Toxic renal insufficiency was modelled in white outbred rats by intramuscular injections of a 50%-glycerol aqueous solution at a dose of 10 ml per 1 mg of the body weight. Animals were divided into 4 groups: the 1<sup>st</sup> group included rats with a modeled chronic renal insufficiency; the 2<sup>nd</sup> group had rats with a modeled chronic renal insufficiency, where rats were injected with a rat placental cryoextract at a dose of 0.5 ml thrice a week; the 3<sup>rd</sup> group encompassed rats with a modeled chronic renal insufficiency with a renin-angiotensin-aldosterone system blocking by oral introduction of Enap and spironolactone suspensions at a dose of 0.5 ml (10 mg Enap + 200 mg spironolactone in 30 ml normal saline) for 2 weeks, starting from the second week after glycerol injections; the 4<sup>th</sup> group had rats with a modeled chronic renal insufficiency with a renin-angiotensin-aldosterone system blocking and simultaneous placental cryoextract injections in the above doses. The intact rats were used as control ones. The experiments were closed in 8 weeks after glycerol injections. The ultrastructure of cells was studied with a PEM-125K electron microscope (manufactured by Selmi JSC). The thickness values of the zona glomerulosa were measured in the adrenal gland semifine sections. The levels of sodium and potassium ions were taken in blood and urine serum by emission flame photometry.

*Results and discussion.* Under fabricated chronic renal insufficiency the adrenal cortex demonstrated functional and ultrastructural signs of intensification of the processes of the aldosterone synthesis and secretion, which were manifested by a hypertrophy of the endoplasmic reticulum and swelling of the mitochondria, formation of the myelin-like structures in them and appearance of the complexes of the mitochondria, endoplasmic reticulum and liposomes. A significant increase in the thickness values of the adrenal cortex of the zona glomerulosa and improvement in the electrolyte metabolism up to the control levels became evident in all the animals, treated with a medicated renin-angiotensin-aldosterone system blocking and following rat placental cryoextract injections, compared with the untreated animals.

*Conclusions.* A medicated renin-angiotensin-aldosterone system blocking had reduced morphological symptoms of steroidogenesis activation in the adrenal cortex by the 8<sup>th</sup> week of chronic renal insufficiency. A combined application of the renin-angiotensin-aldosterone system blocking and rat placental cryoextract injections brought normalization of the adrenocorticocyte ultrastructures.

**Keywords:** chronic renal insufficiency, adrenal glands, placental cryoextract, ultrastructure, renin-angiotensin-aldosterone system.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 05.08.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування