

Μελέτη της ενδοπαρεγχυματικής νεύρωσης του ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού

Αναγνώστου Β.¹, Τηνιακού Ντ.¹, Καρανδρέα Δ.¹, Αγαπητός Ε.², Κίττας Χ.¹

Immunohistochemical study of the intraparenchymal innervation of human fetal kidney

Anagnostou V.¹, Tiniakos D.¹, Karandrea D.¹, Agapitos E.², Kittas C.¹

¹Laboratories of Histology-Embryology and ²Pathology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Greece.

The purpose of this study was to define, the development of intraparenchymal innervation and to assess the distribution and nature of intrinsic nerves in human fetal kidney. Our material consisted of routinely-processed renal tissue sections from 17 human fetuses (20-24 gestational weeks-gw, n=6; 25-40 gw, n=11) and 3 adults. We used immunohistochemistry with antibodies to the pan-neural markers neurofilaments (NF), neuron specific enolase (NSE), PGP9.5 and S100 protein. NF-, NSE-, S100- and PGP9.5-positive nerves were identified in the renal cortex, showing a perivascular (arterial and venous) distribution, from 20gw onwards. Their density appeared to increase with gestation, reaching adult levels at 28gw. Nerve fibers extended from the cortico-medullary region to the outer cortex, reaching the renal capsule in the 3rd trimester. In detail, NF, NSE-, S100- and PGP9.5-immunoreactive fibers were observed in close apposition to renal artery and its branches, occasionally reaching the afferent and efferent arteriole (3rd trimester). Nerve fibers were detected in close apposition to the juxtaglomerular apparatus in the 2nd and 3rd trimester. In the renal medulla, NSE-, PGP9.5- and S100-positive nerve fibers were detected close to tubular cells as early as 20 gw. However, their density gradually decreased during the 3rd trimester and were not observed in the medulla of the adult kidney. In conclusion, human fetal kidney appears richly innervated during the 2nd and 3rd trimester. There is progressive increase in the density of parenchymal nerve fibers towards term from the cortico-medullary region to the cortex. Most intrarenal nerves have a predominant perivascular distribution, implying that renal innervation plays an important functional role during intrauterine life.

Key words: ανοσοϊστοχημεία, innervation, fetal kidney

Μελετήσαμε την οντογένεση της ενδονεφρικής νεύρωσης και να εκτιμήσαμε την κατανομή και τη φύση των νευρικών ινών στον ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρό. Εφαρμόσαμε την ανοσοϊστοχημική τεχνική στρεπταβιδίνης-βιοτίνης σε τομές παραφίνης νεφρών 17 εμβρύων ανθρώπου (20-24 εβδομάδες κύησης-EK, n=6 και 25-40 EK, n=11) και 3 ενηλίκων με αντισώματα έναντι παν-νευρικών δεικτών (NF, PGP9.5, S100 και NSE). NF, NSE-, S100- και PGP9.5-θετικά νεύρα, σχετιζόμενα με το αρτηριακό και φλεβικό δίκτυο, εντοπίστηκαν στο νεφρικό φλοιό στις 20 EK και η πυκνότητά τους αυξανόταν με την πρόοδο της κύησης, φτάνοντας το επίπεδο του ενήλικα στις 28 EK. Οι νευρικές ίνες επεκτείνονταν από την φλοιομυελική συμβολή προς τον εξωτερικό φλοιό, φτάνοντας στη νεφρική κάψα κατά το 3^ο τρίμηνο της κύησης. Οι NF-, PGP9.5-, S100- και NSE-θετικές νευρικές ίνες παρατηρήθηκαν τόσο σε στενή σχέση με τη νεφρική αρτηρία και τους κλάδους της, φτάνοντας μέχρι και το προσαγωγό και απαγωγό αρτηρίδιο στο 3^ο τρίμηνο, όσο και με την παρασπειραματική συσκευή (2^ο και 3^ο τρίμηνο). Νευρικές ίνες εκτείνονταν από τη συμβολή φλοιού-μυελού μέχρι τον εξώτερο φλοιό, φτάνοντας κοντά στη νεφρική κάψα στο 3^ο τρίμηνο. Στο νεφρικό μυελό, S100-, PGP9.5- και NSE-θετικά νεύρα παρατηρήθηκαν γύρω από σωληναριακά κύτταρα στις 20 EK. Όμως, η πυκνότητά τους φάνηκε σταδιακά να μειώνεται κατά τη διάρκεια του 3^{ου} τριμήνου. Συμπερασματικά, ο ανθρώπινος εμβρυϊκός νεφρός φαίνεται να έχει πλούσια νεύρωση κατά το 2^ο και 3^ο τρίμηνο της κύησης με προοδευτική αύξηση της πυκνότητας των παρεγχυματικών νευρικών ινών από τη συμβολή φλοιού-μυελού μέχρι την κάψα. Τα περισσότερα ενδονεφρικά νεύρα εντοπίζονται κυρίως γύρω από αρτηριακούς κλάδους καταδεικνύοντας ότι η νεφρική νεύρωση παίζει σπουδαίο λειτουργικό ρόλο στην ενδομήτρια ζωή.

Λέξεις-κλειδιά: ανοσοϊστοχημεία, νεύρωση, εμβρυϊκός νεφρός

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο φυσιολογικός νεφρός στον ενήλικα νευρώνεται από ένα πλέγμα από νεύρα, που αποτελούν μέρος του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού συστήματος. Συμπαθητικές νοραδρενεργικές μεταγαγγλιονικές νευρικές ίνες ακολουθούν την πορεία της νεφρικής αρτηρίας¹, νευρώνοντας την ίδια και τους κλάδους της μέχρι το επίπεδο του προσαγωγού και απαγωγού αρτηριδίου καθώς και την παρασπειραματική συσκευή και τα σωληνάκια²⁻⁴). Οι λίγες παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες, φερόμενες στο νεφρικό παρέγχυμα με το πνευμονογαστρικό, παρουσιάζουν περιαρτηριακή κατανομή⁵.

Τα παρεγχυματικά νεύρα επηρεάζουν σημαντικά τις λειτουργίες του νεφρού⁶. Συγκεκριμένα, ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των κυττάρων της παρασπειραματικής συσκευής, των νεφρικών σωληναρίων και των αγγείων τροποποιούν την έκκριση ρενίνης, τη σωληναριακή λειτουργία/επαναρρόφηση άλατος και τις νεφραγγειακές, αντιστάσεις αντίστοιχα^{7,8}.

Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η σύζευξη των λειτουργιών της σπειραματικής διήθησης, της σωληναριακής επαναρρόφησης, της σωληναριακής έκκρισης και της έκκρισης ρενίνης.

Η ανατομία και η ενδοπαρεγχυματική κατανομή της νεφρικής νεύρωσης έχει διερευνηθεί όσον αφορά το νεφρό του ενήλικα ανθρώπου⁵. Οι ενδονεφρικές νευρικές ίνες, έχουν καταδειχθεί κατά την πορεία τους από την πυελο-ουρητηρική συμβολή μέχρι το φλοιό με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Στο φλοιό του νεφρού ενήλικα ανθρώπου παρατηρήθηκαν πυκνά περιαρτηριακά NPY-θετικά^{9,10} και VIP-θετικά¹⁰ πλέγματα, ενώ η παρασπειραματική συσκευή νευρώνεται με πλούσιο δίκτυο μονοαμινεργικών νευρικών ινών⁹. Στον ανθρώπινο νεφρικό μυελό, τα ευθέα αγγεία νευρώνονται τόσο από νοραδρενεργικές όσο και από ντοπαμινεργικές συμπαθητικές νευρικές ίνες. Σπάνιες νευρικές ίνες θετικές για CGRP, γαλανίνη και ουσία P έχουν παρατηρηθεί στο μυϊκό χιτώνα της πυελικής περιοχής¹⁰.

Η λειτουργία των νεφρικών νεύρων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής έχει μελετη-

θεί σε πειραματικές μελέτες σε ζώα. Η χημική συμπαθεκτομή επηρεάζει τόσο την πλήρη ανάπτυξη του νεφρού όσο και τη νεφρική λειτουργία^{11,12}. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι η συμπαθητική νεφρική νεύρωση ρυθμίζει την αιμοδυναμική των νεφρών στο αρχικό στάδιο και την ομοιοστάση ύδατος και ηλεκτρολυτών στο τελικό στάδιο της κύησης¹³. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι τα νεφρικά νεύρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από την εμβρυϊκή στη νεογνική περίοδο^{14,15}. Νευροτροφικοί αυξητικοί παράγοντες θεωρούνται ότι επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη νεφρική εμβρυογένεση και διαφοροποίηση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων¹³.

Η οντογένεση της ενδονεφρικής νεύρωσης μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές σε έμβρυα αρουραίου¹⁶⁻¹⁸ και σκύλου¹⁹. Παρατηρήθηκε ότι νευρικές ίνες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής εντοπίζονται σε στενή σχέση με το αγγειακό δίκτυο του νεφρού και εκτείνονται από τη νεφρική αρτηρία έως το προσαγωγό και απαγωγό αρτηρίδιο του νεφρικού σπειράματος, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη πυκνότητα στο όριο φλοιού-μυελού. Επιπλέον, στα έμβρυα του αρουραίου νευρικές ίνες παρατηρήθηκαν κοντά στα σπειράματα, την παρασπειραματική συσκευή και τη νεφρική κάψα. Στον αρουραίο η πυκνότητα της απαγωγού νεύρωσης αυξάνεται κατά τη διάρκεια της κύησης και φτάνει στο επίπεδο του ενήλικα μετά τη γέννηση, ενώ η κατανομή της προσαγωγού νεύρωσης κατά τη γέννηση είναι η ίδια με αυτή του ενήλικα¹⁷. Στον εμβρυϊκό νεφρό του αρουραίου εντοπίστηκαν νευρικές ίνες σε στενή σχέση με ρениνοπαραγωγά κύτταρα, τόσο κατά μήκος των μεγάλων αρτηριακών στελεχών όσο και στην εγγύτητα των προσαγωγών αρτηριδίων²⁰.

Παρόλο που η οντογένεση των ενδονεφρικών νευρικών ινών έχει μελετηθεί επαρκώς σε ζώα, μέχρι σήμερα δεν έχουν δημοσιευθεί πλήρεις μελέτες όσον αφορά την τοπογραφία και τη φύση των περεγχυματικών νευρών στον

ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρό. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές με αντισώματα ειδικά για παν-νευρικούς δείκτες, ώστε να αναδείξουμε την κατανομή και τη φύση των νευρικών ινών του ανθρώπινου νεφρού κατά την ενδομήτρια ζωή.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό μας αποτελείτο από νεφρικό ιστό 3 ενηλίκων ανθρώπων (υγιείς περιοχές από νεφρεκτομές λόγω κακοήθειας) και 17 εμβρύων ανθρώπου, έξι από τα οποία είχαν ηλικία κύησης 20-24 εβδομάδες κύησης-ΕΚ (αναλογία αρσενικών προς θηλυκά Α/Θ=1/0.25) και ένδεκα ηλικία κύησης 25-40 ΕΚ (αναλογία Α/Θ=0.29/1). Τα έμβρυα απεβλήθησαν αυτόματα ή για θεραπευτικούς λόγους, ενώ η νεκροτομή δεν ανέδειξε άλλη παθολογία. Το υλικό συλλέχθηκε σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες Βιοηθικής της διακήρυξης του Ελσίνκι (1964). Επιπρόσθετα λήφθηκε για κάθε περίπτωση γραπτή συγκατάθεση των γονέων για τη χρησιμοποίηση του εμβρυϊκού υλικού για ερευνητικούς σκοπούς. Οι ενήλικες ασθενείς έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη χρησιμοποίηση μη διαγνωστικών ιστοτεμαχίων για ερευνητικούς σκοπούς.

Τα ιστοτεμάχια μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% για 24 ώρες και ακολούθως εγκλείσθησαν σε παραφίνη. Από κάθε block κόπηκαν σειριακές τομές πάχους 5μm, οι οποίες επιστρώθηκαν σε πλακίδια καλυμμένα με poly-L-lysine. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημική τεχνική στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης με ειδικά αντισώματα προς τους παν-νευρικούς δείκτες: NF (νευροϊνίδια), NSE (ειδική ενολάση νευρώνων), πρωτεΐνη S100, η οποία κατανέμεται στα κύτταρα Schwann και PGP9.5 (Πίνακας 1).

Μετά την αποπαραφίνωση και ενυδάτωση σε κατιόντα διαλύματα αιθανόλης, οι τομές

Πίνακας 1. Ειδικότητα, προέλευση, χρησιμοποιούμενη αραιώση και πηγή προμήθειας των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική μελέτη

Αντίσωμα ειδικό προς	Προέλευση	Αραιώση	Πηγή
PGP 9.5	Επίμυς	1:100	Novocastra Laboratories, UK
Νευροϊνίδια (NF)	Επίμυς	1:50	Dako A/S, Denmark
Ειδική Ενολάση Νευρώνων (NSE)	Επίμυς	1:50	Dako A/S, Denmark
Πρωτεΐνη S100	Κόνικλος	1:200	Dako A/S, Denmark

επώασθησαν στο σκοτάδι για 30 min σε διάλυμα μεθανόλης/H₂O₂ 3% (Sigma, Saint Louis MO, USA), ώστε να αδρανοποιηθεί η ενδογενής υπεροξειδάση, και εκπλύθηκαν με νερό βρύσης και στη συνέχεια με απεσταγμένο νερό. Για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων, οι τομές τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (800W) σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,001M για τρία τετράλεπτα. Στη συνέχεια, οι τομές εκπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό, μετά σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0.25M (PBS, pH=7.4) και επώασθησαν για 20 min με διάλυμα 20% φυσιολογικού ορού κουνελιού (NRS, Dako A/S, Denmark) ή σε διάλυμα 20% φυσιολογικό ορό χοίρου (NSS, Dako A/S, Denmark) σε PBS. Ακολούθησε επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων, όπως φαίνονται στον Πίνακα 1, έγιναν σε διάλυμα PBS 0,25M με 0,5% NRS ή NSS. Στη συνέχεια οι τομές εκπλύθηκαν σε PBS και ακολούθησε επώαση με το δευτερογενές βιοτινυλιωμένο αντίσωμα, αραιωμένο σε PBS (1:200 για τα μονοκλωνικά και 1:300 για το πολυκλωνικό αντίσωμα) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκπλυση σε PBS, οι τομές επώασθησαν για 30 λεπτά με το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-υπεροξειδάση (sABC, Code No K0377, Dako A/s, Denmark), αραιωμένο 1:100 σε PBS. Μετά από νέα έκπλυση σε PBS, οι τομές εμβαπτίσθηκαν αρχικά για 10 sec σε διάλυμα 3,3' τετραϋδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης, 2,5gr/100ml σε PBS (DAB, Sigma, Saint Louis MO, USA), που περιείχε 50μl H₂O₂ (Sigma, Saint Louis MO, USA). Ακολούθησε μικροσκοπική εκτίμηση της ανοσοχρώσης και επιπλέον επώσεις των 10 sec, όταν κρίθηκαν αναγκαίες. Τελικά, μετά την

έκπλυση με νερό βρύσης, οι τομές εμβαπτίσθηκαν σε αιματοξυλίνη για 15 sec, αφυδατώθηκαν σε σειρά ανιόντων διαλυμάτων αιθανόλης, εμβαπτίσθηκαν σε ξυλόλη και επιστρώθηκαν με DPX (BDH, England) και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν για κάθε περίπτωση τομές στις οποίες εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημική τεχνική όπως περιγράφηκε παραπάνω, παραλείποντας την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από εμβρυϊκό επινεφρίδιο.

Η πυκνότητα των ανοσοθετικών νευρικών στελεχών και νευρικών ινών εκτιμήθηκε ημιποσοτικά, χρησιμοποιώντας κλίμακα από «-» έως «+++». Στον εμβρυϊκό νεφρικό φλοιό, η ένδειξη «+++» αντιστοιχεί στην πυκνότητα ενδοπαρεχυματικών νεύρων του ενήλικα, η «++» σε ενδιαμέση πυκνότητα, η «+» χρησιμοποιήθηκε όταν εντοπίστηκαν ελάχιστες νευρικές ίνες ενώ η «-» συμβολίζει ότι δεν παρατηρήθηκε ειδική ανοσοχρώση. Στον εμβρυϊκό μυελό, η ένδειξη «+++» αντιστοιχεί στην υψηλότερη πυκνότητα των παρατηρούμενων νευρικών ινών, απολήξεων ή κυττάρων, η «++» σε ενδιαμέση πυκνότητα και η «+» σε σπάνια ανοσοθετικότητα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Νεφρός ενήλικα ανθρώπου

Στον ανθρώπινο ενήλικο νεφρό οι NF, NSE-, PGP9.5 και S100- θετικές ενδογενείς νευρικές ίνες κατανέμονται κατά κύριο λόγο περιαγγειακά (Πίνακες 2-5). Οι νευρικές ίνες εκτείνονταν από την περιοχή της πύλης προς τη φλοιομυελική συμβολή και το φλοιό, συνοδεύοντας τους κλάδους της νεφρικής αρτηρίας

Πίνακας 2. Περιαγγειακή κατανομή και πυκνότητα των PGP9.5-ανοσοθετικών νεύρων στον εμβρυϊκό νεφρικό φλοιό και στον νεφρικό φλοιό ενήλικα ανθρώπου

Εμβρυϊκός νεφρός	PGP9.5 - ανοσοθετικά νεύρα			
	Μεσολόβιες Αρτηρίες	Τοξοειδείς Αρτηρίες	Μεσολοβίδιες Αρτηρίες	Προσαγωγό - Απαγωγό αρτηρίδιο
Εβδομάδες κύησης				
20-24	++	++	+	+
25-27	+++	++	++	+
28-39	+++	++	++	++
Νεφρός ενήλικα	+++	+++	+++	+++

-: απουσία ειδικής ανοσοχρώσης, +: λίγες νευρικές ίνες, ++: ενδιαμέση πυκνότητα νευρικών ινών, +++: πυκνότητα ενδοπαρεχυματικών νευρικών ινών ίδια με αυτή του ενήλικα

Πίνακας 3. Περιαγγειακή κατανομή και πυκνότητα των NF-ανοσοθετικών νεύρων εμβρυϊκό νεφρικό φλοιό και στον νεφρικό φλοιό ενήλικα ανθρώπου.

Εμβρυϊκός νεφρός	NF - ανοσοθετικά νεύρα			
	Μεσολόβιες Αρτηρίες	Τοξοειδείς Αρτηρίες	Μεσολοβίδιες Αρτηρίες	Προσαγωγό - Απαγωγό αρτηρίδιο
<i>Εβδομάδες κύησης</i>				
20-24	++	+	++	+
25-27	+++	+	++	++
28-39	+++	++	++	+++
Ενήλικος νεφρός	+++	+++	+++	+++

-: απουσία ειδικής ανοσοχρώσης, +: λίγες νευρικές ίνες, ++: ενδιάμεση πυκνότητα νευρικών ινών, +++: πυκνότητα ενδοπαρεγχυματικών νευρικών ινών ίδια με αυτή του ενήλικα

Πίνακας 4. Περιαγγειακή κατανομή και πυκνότητα των S100-ανοσοθετικών νεύρων εμβρυϊκό νεφρικό φλοιό και στον νεφρικό φλοιό ενήλικα ανθρώπου.

Εμβρυϊκός νεφρός	S100 - ανοσοθετικά νεύρα			
	Μεσολόβιες Αρτηρίες	Τοξοειδείς Αρτηρίες	Μεσολοβίδιες Αρτηρίες	Προσαγωγό - Απαγωγό αρτηρίδιο
<i>Εβδομάδες κύησης</i>				
20-24	++	++	++	++
25-27	+++	++	++	++
28-39	+++	+++	+++	++
Νεφρός ενήλικα	+++	+++	+++	+++

-: απουσία ειδικής ανοσοχρώσης, +: λίγες νευρικές ίνες, ++: ενδιάμεση πυκνότητα νευρικών ινών, +++: πυκνότητα ενδοπαρεγχυματικών νευρικών ινών ίδια με αυτή του ενήλικα

Πίνακας 5. Περιαγγειακή κατανομή και πυκνότητα των NSE-ανοσοθετικών νεύρων στον εμβρυϊκό νεφρικό φλοιό και στον νεφρικό φλοιό ενήλικα ανθρώπου.

Εμβρυϊκός νεφρός	NSE - ανοσοθετικά νεύρα			
	Μεσολόβιες Αρτηρίες	Τοξοειδείς Αρτηρίες	Μεσολοβίδιες Αρτηρίες	Προσαγωγό - Απαγωγό αρτηρίδιο
<i>Εβδομάδες κύησης</i>				
20-24	++	++	++	++
25-27	+++	+++	+++	++
28-39	+++	+++	+++	+++
Νεφρός ενήλικα	+++	+++	+++	+++

-: απουσία ειδικής ανοσοχρώσης, +: λίγες νευρικές ίνες, ++: ενδιάμεση πυκνότητα νευρικών ινών, +++: πυκνότητα ενδοπαρεγχυματικών νευρικών ινών ίδια με αυτή του ενήλικα

έως το επίπεδο του απαγωγού και προσαγωγού αρτηριδίου των υποκαπικών νεφρώνων. Πλούσια νεύρωση παρατηρήθηκε σε σχέση με την παρασπειραματική συσκευή, ενώ λίγες νευρικές ίνες βρέθηκαν σε στενή σχέση με τα

επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα και τα ευθέα αγγεία. Στον φυσιολογικό νεφρό του ενήλικα δεν παρατηρήθηκαν νευρικές ίνες στο μυελό (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Πυκνότητα των ανοσοθετικών μυελικών νευρικών ιών στον εμβρυϊκό νεφρό και σε νεφρό ενήλικα ανθρώπου.

Εμβρυϊκός νεφρός	Ανοσοθετικότητα ενδο-μυελικών νευρικών ιών			
	S100	NSE	NF	PGP9.5
<i>Εβδομάδες κύησης</i>				
20-24	+++	+++	-	+++
25-27	+	+	-	+
28-39	+	-	-	-
Νεφρός ενήλικα	-	-	-	-

-: απουσία ειδικής ανοσοχρώσης, +: λίγες νευρικές ίνες, ++: ενδιάμεση πυκνότητα νευρικών ιών, +++: υψηλή πυκνότητα νευρικών ιών

Ανθρώπινος εμβρυϊκός νεφρός - Τοπογραφία και πυκνότητα των ενδονεφρικών νευρικών ιών

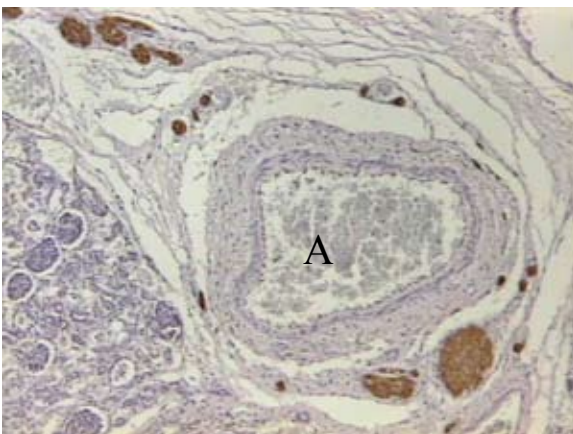
Εμβρυϊκός φλοιός

Οι Πίνακες 2-5 δείχνουν την κατανομή και την πυκνότητα των ανοσοθετικών νευρικών ιών στο φλοιό του ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού από την 20^η έως την 39^η εβδομάδα κύησης.

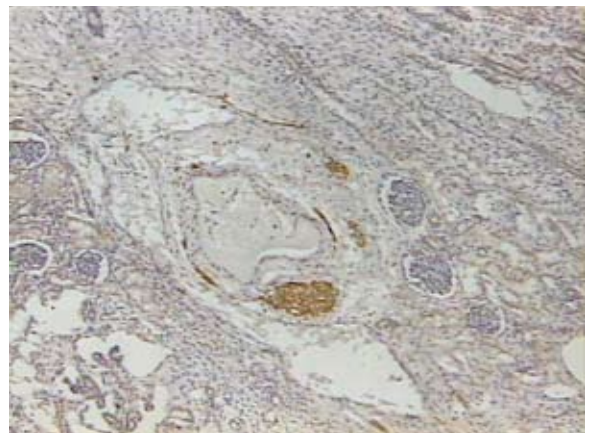
Λεπτομερέστερα, ενδονεφρικές νευρικές ίνες παρατηρήθηκαν σε στενή ανατομική σχέση με το αγγειακό δίκτυο από τις 20 ΕΚ με την πυκνότητά τους να αυξάνεται κατά τη διάρκεια της κύησης. Στις 22 ΕΚ, νευρικές ίνες παρατηρήθηκαν να εκτείνονται από τα μεγάλα νευρικά πλέγματα των πυλών, ακολουθώντας

κεντρομόλα κατεύθυνση προς την περιοχή της φλοιο-μυελικής συμβολής. Αργότερα κατά το 2^ο τρίμηνο της κύησης, οι νευρικές ίνες φάνηκαν να εισχωρούν περαιτέρω στο νεφρικό παρέγχυμα, αρχικά σε σχέση με τα περιπυλαία σπειράματα και τελικά να φτάνουν στο νεφρικό φλοιό μέχρι και τη νεφρική κάψα. Το πρότυπο της κατανομής και η πυκνότητα των ανοσοθετικών νευρικών ιών έφτασαν στο επίπεδο του ενήλικα στις 28 ΕΚ.

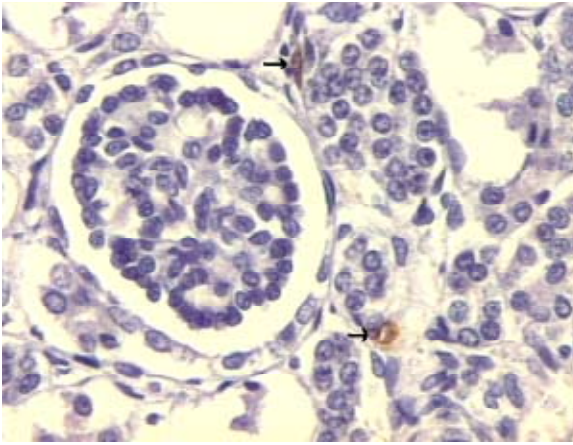
Η κατανομή των NF-, NSE-, PGP9.5- και S100- ανοσοθετικών νευρικών ιών κατά το 2^ο και 3^ο τρίμηνο της ενδομητρίου ζωής ήταν κατά κύριο λόγο περιαγγειακή. Οι νευρικές ίνες φάνηκαν να σχετίζονται ανατομικά περισσότερο με τα αρτηριακά και λιγότερο με τα φλεβικά αγγειακά στελέχη από τις 20 ΕΚ (Εικόνα 1, 2). Μονήριες νευρικές ίνες, κυρίως NSE- και S100- θετικές (Εικόνες 3, 4) παρατηρήθηκαν σε στενή σχέση με τον αγγειακό πόλο



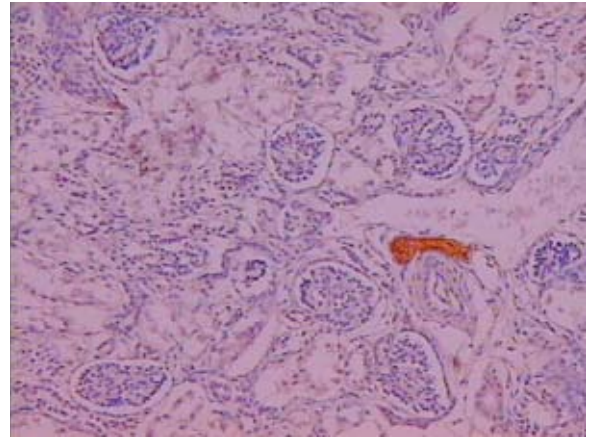
Εικόνα 1. Εμβρυϊκός νεφρός, 3^ο τρίμηνο. S100-ανοσοθετικά νευρικά δεμάτια και νευρικές ίνες σε σχέση με τη νεφρική αρτηρία (Α) στην περιοχή της πύλης του νεφρού. Δεν παρατηρήθηκαν νευρικές ίνες εγγύς της νεφρικής φλέβας, x 50.



Εικόνα 2. Εμβρυϊκός νεφρός, 22 ΕΚ. NSE-ανοσοθετικά νεύρα σε σχέση με αγγειακό αρτηριακό και φλεβικό στέλεχος στην περιοχή της φλοιομυελικής συμβολής, x 25.

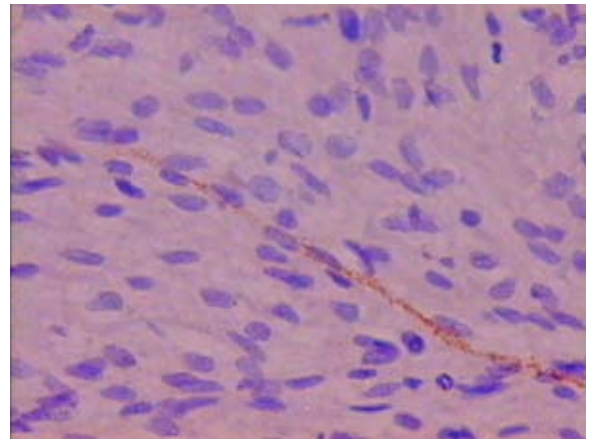


Εικόνα 3. Εμβρυϊκός νεφρός, 3^ο τρίμηνο. S100-ανοσοθετικές νευρικές ίνες (βέλη) στην περιοχή της φλοιομυελικής συμβολής σε στενή ανατομική σχέση με τον αγγειακό πόλο παραμυελικού σπειράματος, x 400.



Εικόνα 4. Εμβρυϊκός νεφρός, 28 ΕΚ. NSE-ανοσοθετικό νευρικό στέλεχος στην εγγύτητα μεσοφλοιωδών σπειραμάτων, x 50.

των παραμυελικών νεφρώνων και την παρασπειραματική συσκευή και η πυκνότητά τους φάνηκε να αυξάνεται κατά το 3^ο τρίμηνο. Οι ενδοπαρεγχυματικές νευρικές ίνες συνέχιζαν την διείσδυσή τους στο νεφρικό παρέγχυμα, φτάνοντας στο νεφρικό φλοιό. NF-, NSE-, PGP9.5- και S100-θετικές νευρικές ίνες παρατηρήθηκαν σε στενή σχέση με τον αγγειακό πόλο των μεσοφλοιωδών σπειραμάτων και κοντά σε σωληνάρια από τις 22 ΕΚ. Επιπρόσθετα παρατηρήσαμε NF-, NSE-, PGP9.5- και S100-ανοσοθετικές νευρικές ίνες να εκτείνονται προς τη νεφρική κάψα, με αυξανόμενη πυκνότητα κατά τη διάρκεια της κύησης. Στις 36 ΕΚ, S100-θετικές νευρικές ίνες βρέθηκαν σε σχέση με τα υποκάψια αρτηρίδια.



Εικόνα 5. Εμβρυϊκός νεφρός, 20ΕΚ. PGP9.5-ανοσοθετική νευρική ίνα στο νεφρικό μυελό, x400.

Εμβρυϊκός μυελός

Στο νεφρικό μυελό εντοπίστηκαν NSE-, PGP9.5- και S100-ανοσοθετικές νευρικές ίνες (Εικόνα 5) ή/και στρωματικά κύτταρα στην εγγύτητα των σωληναρίων από τις 20 ΕΚ. Η πυκνότητά τους όμως ήταν σαφώς μικρότερη σε σύγκριση με αυτή που παρατηρήθηκε στο νεφρικό μυελό. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, τόσο η ένταση της ανοσοχρώσης όσο και η πυκνότητα των ανοσοθετικών νευρικών ινών μειωνόταν βαθμιαία κατά τη διάρκεια του 3^{ου} τριμήνου (Πίνακας 6). Τέλος, ήπια NSE-, PGP9.5 και S100-ανοσοθετικότητα παρουσίασαν και τα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα του εμβρυϊκού νεφρού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη μας, αναδείξαμε την τοπογραφία, την πυκνότητα και τη φύση των ενδοπαρεγχυματικών νευρικών ινών στον εμβρυϊκό νεφρό του ανθρώπου κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων τριμήνων της κύησης με τη χρήση της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής όσον αφορά τους παν-νευρικούς δείκτες NF, NSE, S100 και PGP9.5. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ο ανθρώπινος νεφρός φαίνεται να δέχεται πλούσια νεύρωση κατά το 2^ο και 3^ο τρίμηνο της ενδομήτριας ζωής. Η ενδονεφρική νεύρωση ακολουθεί κατά κύριο λόγο το αρτηριακό αγγειακό δίκτυο, από τη νεφρική αρτηρία έως

και το επίπεδο του προσαγωγού και απαγωγού αρτηριδίου. Παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της πυκνότητας των νευρικών ινών κατά τη διάρκεια της κύησης, από τη φλοιομυελική συμβολή προς το φλοιό, φτάνοντας στο επίπεδο του ενήλικα στις 28 ΕΚ. Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε νεύρωση της παρασπειραματικής συσκευής αλλά και παρουσία νευρικών ινών, κυττάρων, ή απολήξεων σε σχέση με τα σωληναριακά κύτταρα του μυελού, με την πρώτη να αυξάνεται σε πυκνότητα και ένταση με την πρόοδο της κύησης και τα δεύτερα να ακολουθούν αντίθετη πορεία. Η τελευταία διαπίστωση μπορεί να ερμηνευθεί υπό το πρίσμα πιθανού νευροτροφικού-επαγωγικού ρόλου των μυελικών νευρών, απαραίτητου μόνο κατά την ενδομήτριο ζωή. Η μεγάλη πυκνότητα των ενδονεφρικών νευρικών ινών κατά την εμβρυϊκή ζωή, ήδη από την 20^η ΕΚ, υποδηλώνει ότι η παρεγχυματική νεύρωση παίζει σημαντικό λειτουργικό ρόλο κατά τη διάρκεια της οντογένεσης του νεφρού.

Ανατομικές και λειτουργικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η νεφρογένεση στον άνθρωπο ολοκληρώνεται πριν τη γέννηση. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την ισχύουσα άποψη, στο βαθμό που δείξαμε ότι η ενδονεφρική νεύρωση αποκτά το πρότυπο του ενήλικα πριν από τη γέννηση, σε αντίθεση με τον αρουραίο στον οποίο η απαγωγός νεύρωση φτάνει στο επίπεδο του ενήλικα μόνο μετά τη γέννηση¹⁷.

Η οντογένεση της ενδοπαρεγχυματικής νεύρωσης του ανθρώπινου νεφρού δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Μέχρι σήμερα υπάρχει μόνο μία μελέτη, με χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, κατά την οποία οι Zimmermann και συν. (1972)²¹ εντόπισαν νευρικές απολήξεις κατά μήκος των νεφρικών αγγείων σε έμβρυα ανθρώπου ηλικίας 13-16 ΕΚ. Τα ευρηματά μας, σε πιο ώριμα έμβρυα και σε υγιείς ενήλικες, συμφωνούν με την περιαγγειακή κατανομή των νεφρικών νευρικών ινών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, που αναφέρεται σε μελέτες σε πειραματόζωα.

Ο λειτουργικός ρόλος των απαγωγών συμπαθητικών νευρών κατά τη διάρκεια της οντογένεσης έχει μελετηθεί επαρκώς μόνο σε πειραματόζωα. Οι Slotkin και συν.^{11,12} μελέτησαν την επίδραση της κεντρικής και περιφερικής χημικής συμπαθηκτομής με χρήση 6-υδροξυ-ντοπαμίνης σε αρουραίους. Παρατήρησαν ότι η ποσότητα του ολικού νεφρικού DNA ήταν μειωμένη, ενώ η συγκέντρωση του RNA

και των πρωτεϊνών αυξανόταν.

Σύμφωνα με τους Lumbers και συν (2001)²² η νεφρική απονεύρωση συνεπάγεται την μείωση της δραστηριότητας του εμβρυϊκού συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, αντίθετα η διέγερση της νεφρικής συμπαθητικής νεύρωσης σε μεγαλύτερο από το φυσιολογικό βαθμό προκαλεί αγγειοσύσπαση και περιορίζει τη νεφρογένεση. Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών αποδεικνύουν το σημαντικό λειτουργικό ρόλο της συμπαθητικής νεύρωσης σε κυτταρικό και βιοχημικό επίπεδο κατά την ενδομήτριο ζωή.

Σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες στις οποίες εφαρμόστηκε διπλή ανοσοϊστοχημική τεχνική με αντισώματα για ρενίνη και β-τουμπουλίνη (ειδική για νευρώνες) σε έμβρυα αρουραίου, κύτταρα θετικά σε ρενίνη εντοπίστηκαν σε στενή σχέση με νευρικές ίνες κατά μήκος της νεφρικής αρτηρίας και των κλάδων αυτής από την 17^η ημέρα της κύησης. Με την πρόοδο της κύησης όμως και μετά τη γέννηση, φάνηκαν να περιορίζονται στην περιοχή της παρασπειραματικής συσκευής στο προσαγωγό αρτηριδίο²¹. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματά μας στον εμβρυϊκό νεφρό του ανθρώπου, όπου αναδείξαμε ανοσοθετικές νευρικές ίνες κοντά στην παρασπειραματική συσκευή και το προσαγωγό αρτηριδίο από την 20^η ΕΚ και με αυξανόμενη πυκνότητα κατά την κύηση.

Τα νεφρικά νεύρα, εκτός από το να επηρεάζουν την αιμοδυναμική του νεφρού και την παραγωγή και έκκριση ρενίνης, φαίνονται να παίζουν και επαγωγικό ρόλο κατά την οντογένεση του νεφρού¹³. *In vitro* μελέτες αναφέρουν ότι το νευρικό στοιχείο μπορεί να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των κυττάρων του νεφρού²³. Η μελέτη μας ανέδειξε την παρουσία NF-, NSE-, S100- και PGP9.5-θετικών κυττάρων στον ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρό. Μελέτες σε έμβρυα αρουραίου με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές και *in situ* υβριδισμό, έδειξαν ότι στο νεφρικό μυελό υπάρχουν στρωματικά κύτταρα τα οποία εκφράζουν νευροϊνίδια (NF) και διακρίνονται από τα μικρογαγγλιακά νευρικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν NF αλλά και την πρωτεΐνη προσκολλησεως L1-L1 neural cell adhesion protein²⁴. Αυτά τα NF-θετικά L1-αρνητικά κύτταρα φαίνεται να προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία παρά από το μεσόδερμα. Η L1 πρωτεΐνη μπορεί να εμπλέκεται στην επιθηλιο-μεσεγχυματική επαγωγή^{24,25}. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι

νευρικές ίνες ή κύτταρα του μυελού που εκφράζουν την L1 πρωτεΐνη παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση του προτύπου μορφογένεσης του εμβρυϊκού νεφρού στον άνθρωπο. Στη μελέτη μας αναδείξαμε την παρουσία ανοσοθετικότητας για τους παν-νευρικούς δείκτες στο νεφρικό μυελό αλλά δεν πραγματοποιήσαμε ειδική ανοσοχρώση για L1 πρωτεΐνη. Θα ήταν ενδιαφέρον να διεξαχθεί διπλή ανοσοϊστοχημική μελέτη, έτσι ώστε να διερευνηθεί το ενδεχόμενο L1- ανοσοθετικότητας στα NF-, NSE-, S100- και PGP9.5- θετικά στρωματικά κύτταρα του μυελού, που παρατηρήθηκαν στη δική μας μελέτη, και να διαλευκανθεί ο πιθανός επαγωγικός τους ρόλος κατά τη νεφρική ανάπτυξη στον άνθρωπο.

Αναδείξαμε ήπια NSE-, S100- και PGP9.5- ανοσοθετικότητα σε επιθηλιακά κύτταρα στον εμβρυϊκό νεφρικό μυελό. Στο ανθρώπινο νεφρό του ενήλικα εντοπίστηκε NSE²⁶ και S100²⁷ ειδική ανοσοχρώση τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα της αγκύλης του Henle όσο και στα κύτταρα των αθροιστικών σωληναρίων. PGP9.5- ανοσοθετικότητα αναδείχθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού σε σωληναριακά κύτταρα στο νεφρό του αρουραίου κατά τη γέννηση²⁸.

Νέες μελέτες με υλικό αφ' ενός μικρότερης ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου και του πρώτου τριμήνου της κύησης, και αφ' ετέρου νεογνικής ηλικίας κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθούν, προκειμένου να αποκτηθεί μια σαφής εικόνα του πλήρους φάσματος της οντογένεσης της ενδονεφρικής νεύρωσης στον άνθρωπο. Παράλληλα, χρήση ειδικών πεπτιδεργικών δεικτών, όπως η TH, το NPY, η γαλανίνη και η σωματοστατίνη, αλλά και δεικτών της προσαγωγού νεύρωσης όπως είναι η πρωτεΐνη που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (calcitonin gene related protein-CGRP) και η ουσία P (substance P-SP), είναι αναγκαίες, προκειμένου να αναδειχθεί η τοπογραφία της πεπτιδεργικής νεύρωσης στο νεφρό του ανθρώπου κατά την ενδομήτριο ζωή.

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε τη δρα Στρατηγούλα Σακελλαρίου και τη δρα Αδριάνα Αναγνωστοπούλου για τη συνεισφορά τους στη συλλογή του υλικού καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ασπασία Κυρούδη-Βούλγαρη για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις της.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από την Ιατρική Σχολή και το ερευνητικό πρόγραμμα

Καποδίστριας (70/4/6549), Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mitchell GAG. Anatomy of the autonomic nervous system. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1953.
2. Barajas L, Muller J. The innervation of the juxtaglomerular apparatus and surrounding tubules: a quantitative analysis by serial section electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 43:107-132, 1973.
3. Barajas L, Powers K, Wang P. Innervation of the renal cortical tubules: a quantitative study. *Am J Physiol* 247:F50-F60, 1984.
4. McLachlan EM, Luff SE. Sympathetic innervation of renal and extra-renal arterial vessels. *Kidney Int* 41:S56-S60, 1992.
5. Stevens A, Lowe JS. Human histology. Mosby, London, 1997
6. Di Bona GF. The functions of the renal nerves. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 94:176-81, 1982.
7. Di Bona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol* 279:R1517-24, 2001
8. Di Bona GF. Neural control of the kidney: past, present, and future. *Hypertension* 2:621-624, 2003.
9. Ballesta J, Polak JM, Allen JM, Bloom SR. The nerves of the juxtaglomerular apparatus of man and other mammals contain the potent peptide NPY. *Histochemistry* 80:483-5, 1984.
10. Tainio H, Kylmala T, Heikkinen A. Peptidergic innervation of the normal and obstructed human pyeloureteral junctions. *Urol Int* 48:31-4, 1992.
11. Slotkin TA, Lau C, Kavlock RJ, Gray JA, Orband-Miller L, Queen KL, et al. Role of sympathetic neurons in biochemical and functional development of the kidney: neonatal sympathectomy with 6-hydroxydopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 246:427-33, 1988.
12. Slotkin TA, Levant B, Orband-Miller L, Queen KL, Stasheff S. Do sympathetic neurons coordinate cellular development in the heart and kidney? Effects of neonatal central and peripheral catecholaminergic lesions on cardiac and renal nucleic acids and proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 244:166-72, 1988.
13. Robillard JE, Guillery EN, Segar JL, Merrill DC, Jose PA. Influence of renal nerves on renal function during development. *Pediatr Nephrol* 7(5):667-71, 1993.
14. Smith FG, Smith BA, Guillery EN, Robillard JE. Role of the renal sympathetic nerves in lambs during the transition from fetal to newborn life. *J Clin Invest* 88:1988-94, 1991.
15. Smith FG, Klinkefus JM, Robillard JE. Effects of

- volume expansion on renal sympathetic nerve activity, cardiovascular and renal function in lambs. *Am J Physiol* 262:R651-8, 1992.
16. Liu L, Barajas L. Prenatal and postnatal development of the renal innervation in the rat. *J Am Soc Nephrol* 3:566, 1992
 17. Liu L, Barajas L. The rat renal nerves during development. *Anat Embryol* 188:345-61, 1993.
 18. Barajas L, Liu L. The renal nerves of the newborn rat. *Pediatr Nephrol* 7:657-66, 1993.
 19. Ferguson M, Ryan GB, Bell C. The innervation of the renal cortex in the dog. *Cell Tissue Res* 253:539-546, 1988.
 20. Pupilli C, Gomez RA, Tuttle JB, Peach MJ, Carey RM. Spatial association of rennin-containing cells and nerve fibers in developing rat kidney. *Pediatr Nephrol* 5:690-695, 1991.
 21. Zimmermann HD. Elektronenmikroskopische Befunde zur Innervation des Nephron nach Untersuchungen an der Fetalen Niere des Menschen. *Zellforschung* 129:65-75, 1972.
 22. Lumbers ER, Yu ZY, Gibson KJ. The selfish brain and the barker hypothesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:942-947, 2001.
 23. Sariola H, Ekblom P, Henke-Fahle S. Embryonic neurons as in vitro inducers of differentiation of nephrogenic mesenchyme. *J Dev Biol* 132:271-281, 1989.
 24. Sainio K, Nonclercq D, Saarma M, Palgi J, Saxu L, Sariola H. Neuronal characteristics in embryonic renal stroma. *Int J Dev Biol* 38:77-84, 1994.
 25. Nolte C, Moos M, Schachner M. Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in epithelia of rodents. *Cell Tissue Res* 298:261-273, 1999.
 26. Haimoto H, Takashi M, Koshikawa T, Asai J, Kato K. Enolase isoenzymes in renal tubules and renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 124:488-495, 1986.
 27. Teratani T, Watanabe T, Yamahara K, Kumagai H, Ishikawa A, Arai K, et al. Restricted expression of calcium-binding protein S100A5 in human kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 291:623-627, 2002.
 28. Shirato I, Asanuma K, Takeda Y, Hayashi K, Tomino Y. Protein gene product 9.5 is selectively localized in parietal epithelial cells of Bowman's capsule in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 11:2381-238, 2000.

Corresponding author:*Dina Tiniakou**Εργαστήριο Ιστολογίας - Εμβρυολογίας, Medical School University of Athens**75 M. Asias str, 115 27 Athens**Tel. 210-7462302**e-mail: dtiniak@med.uoa.gr***Υπεύθυνη αλληλογραφίας:***Τηνιακού Ντίνα**Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών**Μ. Ασίας 75, Γουδύ, Αθήνα 11527**Τηλ. 210-7462302**e-mail: dtiniak@med.uoa.gr*