

СОСТОЯНИЕ ТКАНЕВОГО ГОМЕОСТАЗА ПОЧЕЧНОЙ ПАРЕНХИМЫ ЧЕРЕЗ 30 СУТОК ОТ НАЧАЛА МОДЕЛИРОВАНИЯ ВНЕПЕЧЕНОЧНОГО ОБТУРАЦИОННОГО ХОЛЕСТАЗА

Л.С. Кизюкевич¹, к.м.н., доцент; О.Е. Кузнецов², к.б.н.; И.Э. Гуляй¹, к.б.н.

1 - УО «Гродненский государственный медицинский университет»

2 - УЗ «Гродненская областная клиническая больница»

Эксперимент выполнен на 55 беспородных белых крысах-самцах, массой 250±50г. Результаты комплексных исследований показали, что у выживших крыс (51%) 30-суточный холестаз вызывает вторичное вовлечение печеночной паренхимы в патологический процесс с тяжелым нарушением ее внешнесекреторной функции. В сыворотке крови таких животных значительно увеличивается концентрация поверхностно-активных компонентов желчи – желчных кислот, общего билирубина, активность АЛТ и снижается активность АСТ. В условиях выраженной холемии почки выводят из организма избыток желчных кислот – развивается стойкая холатурия. При этом в гомогенатах почек активизируются процессы перекисного окисления липидов и уменьшается антиоксидантная защита органа. В цитоплазме эпителиоцитов проксимальных канальцев как корковых, так и юкстамедуллярных нефронов снижается активность СДГ, увеличивается активность маркерного фермента лизосом – КФ, развивается гидropическая дисторфия, что является прямым доказательством тяжелых морфологических изменений.

Ключевые слова – холестаз, желчь, желчные кислоты, гомеостаз, нефрон, почки.

The experiment was carried out on 55 white outbred male rats weighing 250±50g. The results of the complex investigation showed that in surviving rats a 30-day cholestasis resulted in secondary involvement of the liver parenchyma and serious disorder of its exocrine function. There was a marked increase in concentration of surface-active bile components in blood serum of these animals (bile acids, common bilirubin) as well as in alanine-aminotransferase activity while aspartate aminotransferase activity decreased. Under marked cholaemia kidneys removed excess bile acids from the body and stable choluria developed. The processes of lipid peroxidation were activated in renal homogenates and antioxidant defense of the organ decreased. Reduced activity of SDH, increased activity of the lysosomal marker enzyme acid phosphatase, hydropic degeneration were observed in the cytoplasm of proximal tubule epithelial cells in both cortical and juxtamedullary nephrons which appeared to be a direct evidence of serious morphological changes.

Key words: cholestasis, bile, bile acids, homeostasis, nephron, kidneys.

Введение

Недостаточность функции почек, связанная с первичным заболеванием желчных путей и печени, привлекает все большее внимание клиницистов, так как часто прогноз может быть неблагоприятен. У больных с механической желтухой, обусловленной патологией внепеченочных желчных протоков, осложненной и не осложненной холангитом, развивается острая функциональная почечная недостаточность, на что указывают данные радиоизотопной ренографии с гиппураном-¹³¹I [6]. Нарушения гомеостаза при механической желтухе могут носить различный характер и во многом зависят от длительности и выраженности холемии [1]. Проблема изучения закономерностей структурной организации и регуляции систем жизнеобеспечения в условиях здоровья и при развитии патологического процесса имеет ключевое значение в современной биологии и медицине. В этом случае на первый план должны выступать поиск, выявление и изучение динамики состояния ключевых звеньев гомеостаза целостного организма в порочном развитии от здоровья к предболезни и, соответственно, болезни [9].

Комплексные экспериментальные исследования, посвященные изучению почечных дисфункций в условиях хронического холестаза, в доступной нам литературе отсутствуют.

Цель работы – дать комплексную оценку структурно-функциональных нарушений, развивающихся со стороны почечной паренхимы через 30 суток от начала моделирования внепеченочного обтурационного холестаза.

Материалы и методы

В работе использован материал от 55 беспородных белых крыс-самцов, массой 250±50г. У опытных животных (37 крыс) под эфирным наркозом 30-суточный обтурационный внепеченочный холестаз моделировали путем перевязки и последующего пересечения общего желчного протока (ОЖП) между двумя шелковыми лигатурами в области ворот печени – на расстоянии 0,5 см от места слияния долевых печеночных протоков. При постановке эксперимента всем опытным животным с целью исключения влияния операционного стресса на развитие функциональных и биохимических нарушений со стороны внутренних органов и систем организма ставился адекватный контроль. У всех крыс контрольной группы производилась ложная операция – ОЖП оставался интактным. Оперированные животные содержались в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и пище. За сутки до окончания эксперимента (через 29 суток) каждую опытную и контрольную крысу помещали в отдельные метаболические клетки для сбора мочи.

Применяя общепринятые биохимические методики [2] и используя биохимический микроанализатор Architect С 8000, производства Abbott Laboratories (США) и Biological alkali micro – analyzer, type: OP- 266/1 (Radelkis) в суточном объеме мочи определяли концентрацию общих желчных кислот, уробилина, общего билирубина, содержание белка и глюкозы, удельный вес, рН, концентрацию и суточную экскрецию мочевины и ионов натрия и калия. В сыворотке крови по окончании эксперимента определяли концентрацию общих желчных кислот,

общего билирубина, мочевины, электролитов (ионов Na^+ и K^+), холестерина, общих липидов, активность щелочной фосфатазы, АЛТ, АСТ, ЛДГ и \square -ГТП. На основе полученных данных рассчитывали минимальный клиренс мочевины и ее концентрационный индекс (U/P) [4–5; 12]. По количеству собранной мочи и результатам биохимических исследований сыворотки крови и мочи оценивали степень нарушения функции почек – ведь только комплексный анализ биохимических показателей может способствовать ранней диагностике острой почечной недостаточности [10]. В конце опытного срока после предварительного эфирного наркоза животных забивали декапитацией. Кусочки ткани почки фиксировали в охлажденном ацетоне и жидкости Карнуа, после чего заключали в парафин. В парафиновых срезах изучали активность ЩФ по G. Gomori (1950), содержание РНП по Эйнарсону и гликопротеинов по Шабашу [13]. В приготовленных гистологических препаратах с помощью окуляр-микрометра проводили морфометрические исследования канальцев нефрона. Для цитохимического анализа кусочки ткани почки, содержащие корковое и мозговое вещество, тотчас после забоя животных помещали в жидкий азот. В кристатных срезах свежемороженого материала в эпителиоцитах различных отделов канальцевого аппарата нефронов гистохимическими методами изучали активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по M. Nachlas et al. (1957), дегидрогеназы восстановленного НАД (НАДН-ДГ) по M. Nachlas et al. (1958), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) по R. Hess et al. (1958) и кислой фосфатазы (КФ) по G. Gomori (1950) [13]. Количественную оценку активности продуктов реакции проводили с помощью компьютерной программы Bioscan NT 2.0 и выражали в единицах оптической плотности (ед.о.п. $\times 10^3$). В гомогенатах почек определялись продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновые коньюгаты [7], малоновый диальдегид [8] и факторы антиоксидантной защиты – активность каталазы [3] и концентрация \square -токоферола [11].

Для электронномикроскопических исследований кусочки ткани коркового вещества почечной паренхимы (2–3 мм²) фиксировали при комнатной температуре в 1% растворе OsO_4 на 0,05 М какодилатном буфере (pH = 7,2). Материал дегидрировали в нескольких порциях этилового спирта возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, после чего заливали в аралдит. Срезы контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца [14], после чего просматривали в электронном микроскопе JEM-100 CX II фирмы “JROL” (Япония).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программных пакетов Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) и Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc.). Для обработки данных использовался двусторонний непарный t-критерий Стьюдента в случае нормального распределения данных в выборке и равенства дисперсий выборок. В случае отклонения распределения данных в выборке от нормального использовали двусторонний непарный U-критерий Манна-Уитни. Результаты считались достоверными при значениях $P < 0,05$, когда вероятность различия была больше или равна 95%. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего.

Результаты и их обсуждение

Среди животных с 30-суточным холестазом летальность составляет 49%. У выживших крыс концентрация общих желчных кислот и общего билирубина в сыворотке крови увеличена в 71 и 8,5 раза, соответственно, дос-

товерно увеличивается активность АЛТ, концентрация общих липидов, ионов калия. Содержание ионов натрия и общего холестерина находится в пределах нормы. Повышается уровень мочевины, достигая своего максимума в ходе всего эксперимента. Значительно снижается активность АСТ и ЛДГ (таблица 1).

Таблица 1 – Биохимические показатели сыворотки крови крыс через 30 суток экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза ($M \pm m$)

Показатели	Ложная операция	Внепеченочный холестаз
Общие желчные кислоты (мкмоль/л)	5,9 \pm 0,5	422,4 \pm 70,1***
Общий билирубин (мкмоль/л)	9,74 \pm 0,46	81,78 \pm 17,75***
Общий холестерин (ммоль/л)	2,57 \pm 0,09	2,39 \pm 0,22
Общие липиды (г/л)	4,01 \pm 0,22	6,14 \pm 0,40***
Мочевина (ммоль/л)	5,03 \pm 0,21	11,21 \pm 2,70***
АЛТ (U/L)	42,50 \pm 1,38	101,3 \pm 22,44**
АСТ (U/L)	313,2 \pm 9,84	177,4 \pm 27,95***
ЛДГ (U/L)	3120,0 \pm 305,3	2165,0 \pm 284,9*
Концентрация Na^+ (ммоль/л)	145,20 \pm 1,58	146,40 \pm 2,76
Концентрация K^+ (ммоль/л)	4,34 \pm 0,06	4,90 \pm 0,09***

Примечание: *показатель достоверности $P < 0,05$; **показатель достоверности $P < 0,01$; ***показатель достоверности $P < 0,001$

Высокие показатели активности аминотрансфераз, их медленное и постепенное снижение в течение 30 суток холестаза свидетельствуют о вторичном вовлечении печени в патологический процесс и о тяжелом течении последнего.

На этом фоне наблюдаются заметные изменения со стороны экскреторной функции почек – более чем в 90 раз увеличивается в моче концентрация общих желчных кислот, значительно возрастает концентрация белка, уробилина, общего билирубина, pH мочи. Полиурии уже нет, диурез постепенно снижается и становится даже ниже, чем у ложнопериоперированных животных. В моче на 31,9% ($p < 0,01$) уменьшается концентрация мочевины и на 40,1% ($p < 0,05$) – ее суточная экскреция, значительно снижается удельный вес мочи, при этом концентрация электролитов (ионов натрия и калия) и их суточная экскреция не отличается от показателей контрольных животных (таблица 2). До самых минимальных значений – 32,3

Таблица 2 – Показатели экскреторной функции почек крыс через 30 суток экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза ($M \pm m$)

Показатели	Ложная операция	Внепеченочный холестаз
Диурез (мл)	12,0 \pm 1,6	10,2 \pm 1,0
Общие желчные кислоты (мкмоль/л)	16,5 \pm 5,6	1487,0 \pm 614,8*
Уробилин (мкмоль/л)	0,18 \pm 0,03	1,14 \pm 0,18***
Общий билирубин (мкмоль/л)	0,10 \pm 0,0	1,13 \pm 0,25***
Уд. вес	1,026 \pm 0,003	1,014 \pm 0,002***
pH	5,5 \pm 0,3	6,8 \pm 0,2***
Белок (г/л)	0,010 \pm 0,0	0,249 \pm 0,106*
Глюкоза (ммоль/л)	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3
Концентрация мочевины (ммоль/л)	400,80 \pm 20,63	272,90 \pm 31,35**
Концентрация ионов натрия (ммоль/л)	135,10 \pm 5,87	125,80 \pm 7,73
Концентрация ионов калия (ммоль/л)	48,46 \pm 2,06	48,00 \pm 2,44
Суточная экскреция мочевины (ммоль/сут)	3,42 \pm 0,27	2,05 \pm 0,20*
Суточная экскреция ионов натрия (ммоль/сут)	1,18 \pm 0,11	1,01 \pm 0,10
Суточная экскреция ионов калия (ммоль/сут)	0,41 \pm 0,03	0,39 \pm 0,04

Примечание: *показатель достоверности $P < 0,05$; **показатель достоверности $P < 0,01$; ***показатель достоверности $P < 0,001$

% (относительно контрольного показателя) – снижается минимальный клиренс мочевины.

Гистологические исследования почек контрольных и опытных животных показали, что у крыс с 30-суточным подпеченочным холестазом диаметр проксимальных и дистальных извитых канальцев корковых нефронов незначительно варьирует, при этом достоверных различий с контрольными величинами не наблюдается, вместе с тем достоверно увеличивается лишь диаметр дистальных извитых канальцев корковых нефронов (таблица 3).

Таблица 3 – Морфометрические показатели канальцевого аппарата нефронов почек крыс через 30 суток от начала моделирования экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза (M±m)

Показатели	Контрольные животные	Опытные животные
Диаметр проксимальных извитых канальцев корковых нефронов (мкм)	29,71±0,56	30,48±0,68
Диаметр проксимальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов (мкм)	30,75±0,25	31,92±0,47
Диаметр дистальных извитых канальцев корковых нефронов (мкм)	19,78±0,26	19,55±0,20
Диаметр дистальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов (мкм)	19,48±0,15	20,75±0,30**
Высота эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев корковых нефронов (мкм)	9,81±0,14	10,93±0,18***
Высота эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов (мкм)	9,78±0,10	10,62±0,09***
Высота эпителиоцитов дистальных извитых канальцев корковых нефронов (мкм)	6,16±0,11	6,70±0,11**
Высота эпителиоцитов дистальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов (мкм)	6,15±0,08	6,81±0,17**
Объем ядер эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев корковых нефронов (мкм ³)	64,35±1,59	63,27±3,35
Объем ядер эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов (мкм ³)	68,62±1,94	69,84±2,11
Объем ядер эпителиоцитов дистальных извитых канальцев корковых нефронов (мкм ³)	62,18±1,93	58,10±1,45
Объем ядер эпителиоцитов дистальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов (мкм ³)	70,07±2,31	63,85±2,21

Примечание: *показатель достоверности $P < 0,05$; **показатель достоверности $P < 0,01$; ***показатель достоверности $P < 0,001$

При этом увеличивается высота эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев как корковых, так и юкстамедуллярных нефронов, происходит набухание и вакуолизация цитоплазмы данных клеток, снижаются ее оксифильные свойства. Объем ядер в эпителиоцитах канальцевого аппарата нефронов почек животных с подпеченочным 30-суточным холестазом достоверных изменений, по сравнению с контролем, не претерпевает (таблица 3).

Результаты гистохимических исследований цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев показали, что в корковых нефронах на 14,0 % ($p < 0,01$) снижается активность СДГ и на 14,5% ($p < 0,1$) – ЛДГ. Параллельно с этим на 37,5% ($p < 0,05$) возрастает активность маркерного фермента лизосом – КФ (рисунок 1; рисунок 2). Активность ЩФ, НАДН-ДГ, содержание РНП

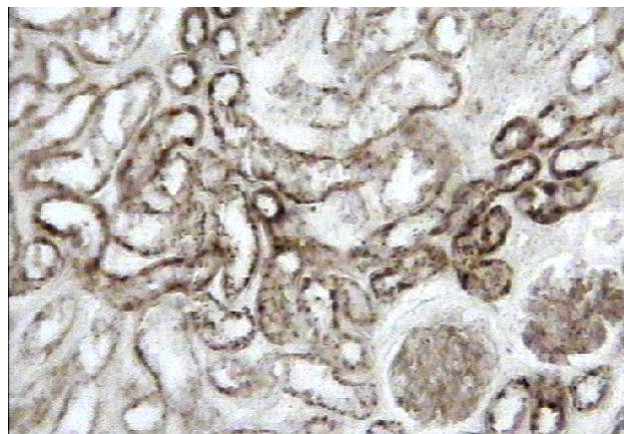


Рисунок 1 – Активность кислой фосфатазы в цитоплазме эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев корковых нефронов почки контрольной крысы. Окраска по Гомори. Ув. 150

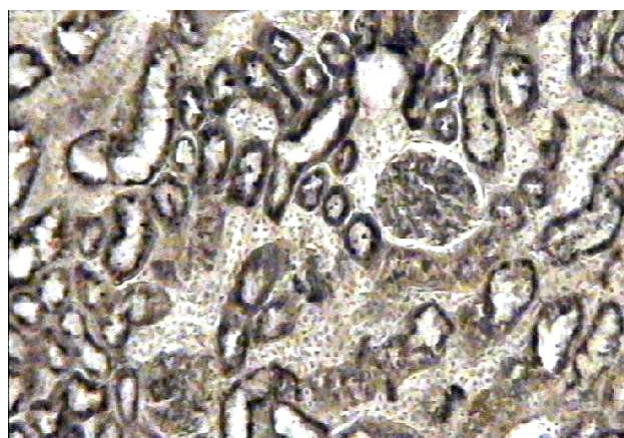


Рисунок 2 – Усиление активности кислой фосфатазы в цитоплазме эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев корковых нефронов почки крысы через 30 суток экспериментального подпеченочного холестаза. Окраска по Гомори. Ув. 150

и гликопротеинов фактически не отличается от контрольных показателей. В цитоплазме эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов холестаз такой продолжительности также вызывает уменьшение активности СДГ (на 13,4%; $p < 0,01$) и ЛДГ (на 19,2%; $p < 0,1$). Без изменений (относительно контроля) остается активность КФ, НАДН-ДГ, содержание РНП, количество гликопротеинов в базальной мембране канальцев, активность ЩФ и содержание гликопротеинов в области щеточной каемки эпителиоцитов.

В эпителиальных клетках дистальных извитых канальцев корковых нефронов наблюдается снижение активности СДГ (на 11,4%; $p < 0,05$), ЛДГ (на 21,8%; $p < 0,01$), при этом активность КФ, НАДН-ДГ, содержание РНП и гликопротеинов не отличается от показателей ложнооперированных крыс.

В эпителиоцитах дистальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов активность всех изучаемых ферментов, а также содержание РНП и гликопротеинов незначительно снижается, удерживаясь при этом в пределах контрольных значений. В цитоплазме эпителиоцитов дистальных прямых канальцев значительно уменьшается, по сравнению с контрольными показателями, активность ЛДГ (на 28,1%; $p < 0,05$) и НАДН-ДГ (на 24,8%; $p < 0,01$).

Подтверждением наблюдающихся в световом микроскопе структурно-метаболических изменений в канальцевом аппарате нефронов являются результаты электронномикроскопических исследований, показавшие, что у животных с 30-суточным холестазом, по сравнению с ложноперированными животными, в цитоплазме эпителиоцитов проксимальных канальцев уменьшается плотность расположения митохондрий, последние мелкие и характеризуются просветленным матриксом. Параллельно с этим возрастает содержание лизосом (некоторые из них достигают гигантских размеров), появляются причудливой конфигурации цитоплазматические тельца. Среди большой и гетерогенной группы этих образований следует выделить такие, которые содержат внутриклеточные органеллы на разных стадиях деструкции. В эпителиоцитах проксимальных извитых канальцах отдельных нефронов, где активность гидролитических ферментов (КФ) достигает своего максимума, развивается гидропическая дистрофия.

В гомогенатах почек опытных животных активируются процессы перекисного окисления липидов – почти в три раза возрастает уровень диеновых конъюгатов, содержание малонового диальдегида и уменьшается антиоксидантная защита органа – снижается активность каталазы и концентрация \square -токоферола (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели перекисного окисления липидов в почках крыс через 30 суток экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза ($M \pm m$)

Показатели	Ложная операция	Внепеченочный холестаза
Диеновые конъюгаты (Ед/г ткани)	4,17 \pm 0,58	12,53 \pm 0,85***
Малоновый диальдегид (мкмоль/г ткани)	12,04 \pm 0,59	35,27 \pm 2,05***
Каталаза (ммоль H_2O_2 /мин/г ткани)	335,80 \pm 0,61	321,40 \pm 3,36**
\square -токоферол (мкмоль/г ткани)	29,29 \pm 2,77	14,81 \pm 0,58***

Примечание: *показатель достоверности $P < 0,05$; **показатель достоверности $P < 0,01$; ***показатель достоверности $P < 0,001$.

Выводы

1. 30-суточная экспериментальная механическая желтуха сопровождается длительным нарушением внешнесекреторной функции печени, стойким и значительным увеличением в сыворотке крови концентрации биологически активных компонентов желчи (общих желчных кислот, общего билирубина), общих липидов, активности АЛТ и снижением активности АСТ, что свидетельствует о вторичном вовлечении печени в патологический процесс и тяжелом течении последнего.

2. В условиях развивающейся холемии канальцевый аппарат нефронов почечной паренхимы выполняет повышенную нагрузку по выведению желчных кислот из организма – развивается стойкая холатурия.

3. Спустя тридцать суток от начала моделирования подпеченочного холестаза на фоне продолжительной и выраженной и холатурии в гомогенатах почек опытных крыс активизируются процессы перекисного окисления липидов – возрастает содержание малонового диальдегида и уровень диеновых конъюгатов, при этом угнетается антиоксидантная защита органа: уменьшается активность каталазы, снижается концентрация \square -токоферола.

4. У холемичных животных с 30-суточным холестазом развивается ренальная форма почечной недостаточности, что сопровождается повышением в сыворотке крови концентрации мочевины, общих липидов и ионов калия, уменьшением удельного веса мочи, увеличением в моче концентрации белка и уменьшением концентрации мочевины, ее суточной экскреции и min клиренса. В эпителиоцитах дистальных канальцев нефронов уменьшается активность СДГ и ЛДГ, а в эпителиоцитах дистальных прямых канальцев снижается активность ЛДГ и НАДН-ДГ. В цитоплазме эпителиоцитов проксимальных канальцев корковых и юкстаамедуллярных нефронов уменьшается активность СДГ и увеличение активности маркерного фермента лизосом – КФ, нарушается структура митохондрий, возрастает содержание лизосом, развивается гидропическая дистрофия, что является прямым доказательством тяжелых морфологических изменений.

Литература

1. Брусницына, М.А. Тромб огеморрагии е осложнения и нарушения гемостаза у больных механической желтухой / М.А. Брусницына // Врачебное дело. – 1985. – № 3. – С. 93-96.
2. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т / В.С. Камышников. – Мн.: Беларусь, 2000.
3. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк и [др.] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16-19.
4. Рябов, С.И. Диагностика болезней почек / С.И. Рябов, Ю.В. Наточин, Б.Б. Бондаренко. – Л.: Медицина. – 1979. – 255 с.
5. Рябов, С.И. Функциональная нефрология / С.И. Рябов, Ю.В. Наточин. – СПб. – 1997. – 304 с.
6. Система ренин-ангиотензин при функциональной недостаточности почек у больных с механической желтухой / И.Я. Усватова и [др.] // Хирургия. – 1981. – № 3. – С. 76-81.
7. Стальная, И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина. – 1977. – С. 63-69.
8. Тимошина, Р.С. Содержание соединений, реагирующих с 2-ТБК, в плазме крови здоровых людей и больных некоторыми эндокринопатиями / Р.С. Тимошина // Вопросы мед. химии. – 1987. – №1. – С. 72-75.
9. Удут, В.В. Структурная организация гомеостаза при патологическом процессе ЖКТ / В.В. Удут, С.А. Наумов, Е.В. Бородулина // Актуальные вопросы гастроэнтерологии: материалы 2-й научно-практ. конференции. – Томск, 1994. – С. 112-114.
10. Ужва, В.П. Ранняя диагностика острой послеоперационной почечной недостаточности / В.П. Ужва, Н.Ф. Мосинцева, А.Я. Гавура // Клин. хирургия. – 1993. – № 3. – С. 28-30.
11. Черняускене, Р.Ч. Одновременное флюорометрическое определение концентраций витамина Е и витамина А в сыворотке крови / Р.Ч. Черняускене, З.З. Варшкявичене, П.С. Грибаускас // Лабораторное дело. – 1984. – №6 – С. 362-365.
12. Эмануэль, В.Л. Лабораторная оценка функционального состояния почек / В.Л. Эмануэль // Клин. и лаб. диагностика. – 1997. – № 10. – С. 25-32.
13. Pearse, A.G.E. Гистохимия теоретическая и прикладная / A.G.E. Pearse. – М.: Изд-во иностр. литературы. – 1962. – 598 с.
14. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.

Поступила 25.03.2011