

УДК: 616.61-092:616.361-089

СОСТОЯНИЕ ТКАНЕВОГО ГОМЕОСТАЗА ПОЧЕЧНОЙ ПАРЕНХИМЫ ЧЕРЕЗ 24 ЧАСА ОТ НАЧАЛА МОДЕЛИРОВАНИЯ ВНЕПЕЧЕНОЧНОГО ОБТУРАЦИОННОГО ХОЛЕСТАЗА

Л.С. Кизюкевич, к.м.н., доцент; О.Е. Кузнецов, к.б.н.; И.Э. Гуляй, к.б.н.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

УЗ «Гродненская областная клиническая больница»

*Эксперимент выполнен на 67 беспородных белых крысах-самцах, массой 250±50 г. Применив в комплексе электронно-микроскопический, гистологический, гистохимический и биохимические методы исследования установлено, что 24-часовая перевязка общего желчного протока сопровождается резким увеличением концентрации компонентов желчи (общих желчных кислот и билирубина) в сыворотке крови и моче. На этом фоне в почках опытных крыс активируются процессы перекисного окисления липидов. В цитоплазме эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев как корковых, так и юкстамедуллярных нефронов наблюдаются разнонаправленные метаболические сдвиги с компенсаторным перераспределением функциональной нагрузки и нарушением функции почек, что сопровождается полиурией, повышением концентрации мочевины в сыворотке крови, уменьшением *min* клиренса мочевины и ее концентрационного индекса.*

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

The experiment was carried out on 67 outbred white male rats weighing 250±50 grams. Complex employment of electron microscopy, histological, histochemical and biochemical methods of investigation enabled us to determine that a 24-hour ligation of the common bile duct is accompanied by sudden increase in concentration of bile constituents (common bile acids and bilirubin) in blood serum and urine. This leads to activation of lipid peroxidation processes in kidneys of the experimental rats. The cytoplasm of epithelial cells of proximal and distal tubules of both cortical and juxtamedullary nephrons shows multidirectional metabolic shifts with compensatory transfer of functional load and renal dysfunction accompanied by polyuria, increased concentration of blood urea, reduced minimum urea clearance and its concentration index.

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

Введение

Общеизвестно, что сбалансированное содержание компонентов желчи в пищеварительном тракте и крови в процессе их энтерогепатической циркуляции является необходимым условием для поддержания нейрогуморальных механизмов регуляции, обеспечивающих моторные, секреторные и обменные процессы [1, 12]. Благодаря способности образовывать мономолекулярные адсорбционные шары, а также высокой степени взаимодействия с липидами и сходству конформации с холестерином, встраиваясь в липидный комплекс мембран и действуя как стабилизаторы их структур, желчные кислоты, как одни из наиболее важных составных частей желчи, оказывают выраженное влияние на течение мембранных процессов, активацию ферментных систем и на функцию органов и систем [1, 6]. Вместе с тем, значение желчи и ее основных составных компонентов в регуляции деятельности почек – это как раз то наименее изученное звено в комплексе наших знаний о роли желчи для организма в целом, а ведь между печенью и почками, этими двумя важными «фильтрами» организма, существуют самые тесные взаимоотношения как в норме, так и в патологических условиях. Почечная экскреция моно- и дисульфатов желчных солей становится важным и эффективным путем выведения данных соединений при заболеланиях желчных путей [18–19, 22–24]. По мнению P. Back [17], почечная экскреция желчных кислот у больных механической желтухой играет важную роль в предупреждении интоксикации ими организма. При этом характер функциональных нарушений и морфологических изменений в почках до настоящего времени изучен недостаточно, а имеющиеся сведения о повреждении почек в условиях различного по продолжительности и степени выраженности внепеченочного холестаза противоречивы. Изучение механизмов тканевого гомеоста-

за во всех его аспектах должно рассматриваться как проблема основная, и именно с ней связано разрешение давно назревшей задачи – управление жизнедеятельностью тканей в нормальных и патологических условиях [5].

Цель работы – дать комплексную оценку структурно-функциональным изменениям, развивающимся со стороны почечной паренхимы через 24 часа от начала моделирования экспериментального внепеченочного холестаза.

Материалы и методы

В работе использован материал от 67 беспородных белых крыс-самцов, массой 250±50 г. У опытных животных (35 крыс) под эфирным наркозом 24-часовой обтурационный внепеченочный холестаз моделировали путем перевязки и последующего пересечения общего желчного протока (ОЖП) между двумя шелковыми лигатурами в его проксимальной трети – 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 [11]. У всех крыс контрольной группы производилась ложная операция – ОЖП оставался интактным. Оперированные животные содержались в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и пище, которая включала ячмень, перловую кашу, хлеб, молоко и овощи. Сразу же после операции опытных и контрольных крыс помещали в метаболические клетки для сбора мочи.

Применяя общепринятые биохимические методики [2–3, 7] и используя биохимический микроанализатор Architect C 8000, производства Abbott Laboratories (США) и Biological alkali micro-analyzer, type: OP-266/1 (Radclis), в суточном объеме мочи определяли концентрацию об-

щих желчных кислот, уробилина, общего билирубина, содержание белка и глюкозы, удельный вес, pH, 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 γ -ГТП. На основе полученных данных рассчитывали минимальный клиренс мочевины и ее концентрационный индекс (U/P) [8–9, 16]. 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 [14]. 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 [20]. 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 криостатных 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) [20]. 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 конъюгаты [10], малоновый диальдегид [13] и факторы антиоксидантной защиты – активность каталазы [4] и концентрация α -токоферола [15].

Для электронно-микроскопических исследований кусочки ткани коркового вещества почечной паренхимы размером 2-3 mm^2 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 [21], после чего просматривали в электронном микроскопе JEM-100 CX II фирмы “JRO” (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 различий 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

Результаты исследований показали, что через 24 часа от начала моделирования внепеченочного обтурационного холестаза в сыворотке крови опытных животных в 74 раза увеличивается концентрация общих желчных кислот, почти в 12 раз возрастает концентрация общего билирубина, достоверно увеличивается активность γ -ГТП, ЩФ, АЛТ и АСТ, возрастает содержание холестерина и общих липидов, концентрация электролитов (натрия и калия) остается в пределах нормы (таблица 1), незначительно, но достоверно повышается уровень мочевины (до $5,6 \pm 0,34$ ммоль/л; $p < 0,05$). На этом фоне наблюдаются заметные изменения со стороны экскреторной функции почек – в 125,5 раза увеличивается в моче концентрация общих желчных кислот, наблюдается полиурия, увеличивается содержание белка, возрастает суточная экскреция мочевины и ионов калия, концентрация электролитов в моче опытных животных не отличается от контрольных величин (таблица 2). До 76% (относительно контрольного показателя) снижается минимальный клиренс мочевины.

Таблица 1 – Биохимические показатели сыворотки крови через 24 часа экспериментального внепеченочного холестаза ($M \pm m$)

| Показатели | Ложная операция | Внепеченочный холестаза |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Общие желчные кислоты (мкмоль/л) | 16,0 \pm 2,8 | 1185,0 \pm 95,2*** |
| Общий билирубин (мкмоль/л) | 9,24 \pm 0,56 | 108,40 \pm 4,31*** |
| Холестерин (ммоль/л) | 2,64 \pm 0,18 | 5,55 \pm 0,44*** |
| Общие липиды (г/л) | 4,38 \pm 0,25 | 7,76 \pm 0,43*** |
| АЛТ (U/L) | 52,85 \pm 1,74 | 650,5 \pm 43,49*** |
| АСТ (U/L) | 284,7 \pm 25,03 | 1116,0 \pm 85,0*** |
| ЛДГ (U/L) | 2996,6 \pm 223,8 | 2537,5 \pm 262,1 |
| ЩФ (U/L) (Ед/л) | 396,70 \pm 43,95 | 811,20 \pm 36,91*** |
| γ -ГТП (ммоль/л) | 0,85 \pm 0,08 | 2,46 \pm 0,11*** |
| Концентрация Na^+ (ммоль/л) | 146,29 \pm 1,68 | 148,33 \pm 2,76 |
| Концентрация K^+ (ммоль/л) | 4,56 \pm 0,19 | 4,83 \pm 0,13 |

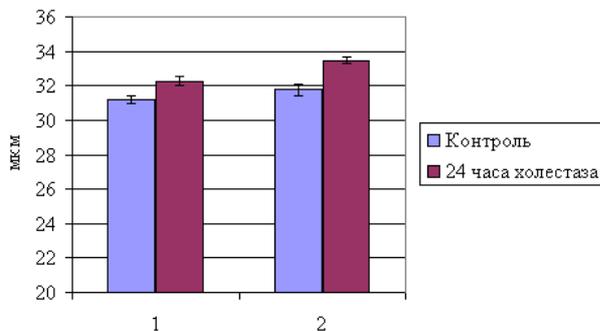
Примечание: *показатель достоверности $P < 0,05$; **показатель достоверности $P < 0,01$; ***показатель достоверности $P < 0,001$

Таблица 2 – Показатели экскреторной функции почек через 24 часа экспериментального внепеченочного холестаза ($M \pm m$)

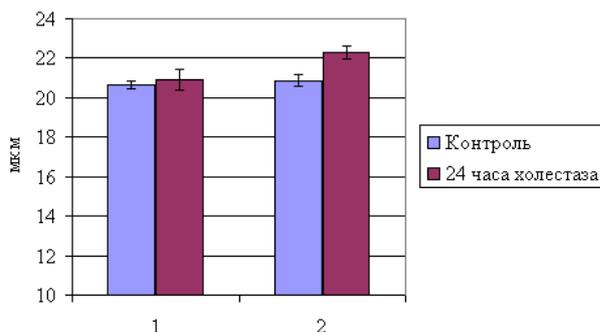
| Показатели | Ложная операция | Внепеченочный холестаза |
|---|-------------------|-------------------------|
| Диурез (мл) | 7,4 \pm 0,8 | 12,1 \pm 0,9*** |
| Общие желчные кислоты (мкмоль/л) | 26,2 \pm 6,8 | 3288,0 \pm 386,4*** |
| Уробилин (мкмоль/л) | 0,25 \pm 0,06 | 0,50 \pm 0,13 |
| Общий билирубин (мкмоль/л) | 0,19 \pm 0,09 | 0,55 \pm 0,15 |
| Уд. вес | 1,018 \pm 0,002 | 1,015 \pm 0,001 |
| pH | 6,5 \pm 0,2 | 6,9 \pm 0,3 |
| Белок (г/л) | 0,088 \pm 0,038 | 0,537 \pm 0,148** |
| Глюкоза (ммоль/л) | 0,5 \pm 0,1 | 1,3 \pm 0,5 |
| Концентрация мочевины (ммоль/л) | 389,2 \pm 31,18 | 366,0 \pm 32,40 |
| Концентрация ионов натрия (ммоль/л) | 159,1 \pm 15,29 | 153,6 \pm 27,68 |
| Концентрация ионов калия (ммоль/л) | 49,56 \pm 5,06 | 39,40 \pm 2,32 |
| Суточная экскреция мочевины (ммоль/сут) | 2,64 \pm 0,18 | 3,97 \pm 0,46* |
| Суточная экскреция ионов натрия (ммоль/сут) | 1,18 \pm 0,13 | 1,66 \pm 0,35 |
| Суточная экскреция ионов калия (ммоль/сут) | 0,36 \pm 0,04 | 0,48 \pm 0,04* |

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

Гистологические исследования показали, что у опытных животных, по сравнению с контролем, отмечается достоверное увеличение (рисунок 1) диаметра проксимальных извитых канальцев как корковых, так и юкстамедуллярных нефронов (до $32,27 \pm 0,27$ мкм; $p < 0,01$; и $33,47 \pm 0,18$ мкм $p < 0,001$ соответственно). Диаметр дистальных извитых канальцев корковых нефронов практически не отличается от контроля (рисунок 2), а юкстамедуллярных нефронов – увеличен до $22,27 \pm 0,34$ мкм ($p < 0,01$).



1 – корковые нефроны; 2 – юкстамедуллярные нефроны
Рисунок 1 – Изменение диаметра проксимальных извитых канальцев у крыс с экспериментальным холестазом



1 – корковые нефроны; 2 – юкстамедуллярные нефроны
Рисунок 2 – Изменение диаметра дистальных извитых канальцев у крыс с экспериментальным холестазом

Высота эпителиальных клеток проксимальных извитых канальцев корковых нефронов возрастает почти на 11% (до $11,58 \pm 0,11$; $p < 0,001$), при этом в юкстамедуллярных нефронах она достоверно не отличается от контрольного показателя. Высота эпителиоцитов дистальных извитых канальцев корковых и юкстамедуллярных нефронов претерпевает аналогичную динамику изменений. Объем ядер в эпителиоцитах проксимальных и дистальных извитых канальцев как корковых, так и юкстамедуллярных нефронов практически не отличается от контрольных величин.

Электронно-микроскопические исследования почек опытных животных показали, что через 24 часа холестаза в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев у основания микроворсинчатой каемки возрастает число везикул и пузырьков, причем их содержание более плотное по сравнению с контрольными животными. Вместе с тем, в цитоплазме клеток увеличивается содержание крупных вакуолей и лизосом, содержащих разнородной плотности матрикс. Митохондрии становятся более мелкими, их матрикс уплотнен. Между эпителиоцитами уменьшаются щелевидные пространства, складки базальной цитолеммы сглаживаются, становятся сла-

бозаметными, что может быть связано с нарушением процесса реабсорбции.

Результаты цитохимических исследований цитоплазмы эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев показали, что в корковых нефронах через 24 часа экспериментального внепеченочного холестаза незначительно (на 6,0%) снижается активность СДГ, на 5,4% возрастает активность НАДН-ДГ, на 4,6% – ЛДГ, на 10,3% – содержание РНП и значительно (на 38,6%; $p < 0,05$) увеличивается активность маркерного фермента лизосом – КФ. В цитоплазме эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов холестаза такой продолжительности вызывает аналогичные незначительные колебания в изменении активности окислительно-восстановительных ферментов. Активность лизосомального фермента – КФ, как и в корковых нефронах, здесь возрастает, однако менее выражено (на 21,1%; $p < 0,1$).

В эпителиальных клетках дистальных извитых канальцев корковых нефронов наблюдается лишь незначительное снижение активности СДГ, НАДН-ДГ, содержания РНП (соответственно, на 6,2%, 9,5%, 4,1%; $p < 0,5$) и такое же едва заметное увеличение цитоплазматической активности КФ и ЛДГ (на 7,5% и 2,9%, соответственно; $p < 0,5$). В эпителиоцитах дистальных извитых канальцев юкстамедуллярных нефронов достоверно угнетается активность как КФ (на 25,4%; $p < 0,05$), так и НАДН-ДГ (на 15,9%; $p < 0,05$), при этом активность СДГ и ЛДГ не отличается от контрольных величин. В цитоплазме эпителиоцитов дистальных прямых канальцев, равно как в дистальных извитых канальцах корковых нефронов, отмечается лишь тенденция ($p < 0,5$) к снижению активности СДГ (на 7,5%) и НАДН-ДГ (на 8,0%) и увеличению активности ЛДГ.

В гомогенатах почек опытных животных активируются процессы перекисного окисления липидов – достоверно возрастает содержание малонового диальдегида, активность каталазы, при этом снижается концентрация α -токоферола (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели перекисного окисления липидов в почках крыс через 24 часа экспериментального внепеченочного холестаза ($M \pm m$)

| Показатели | Ложная операция | Внепеченочный холестаза |
|--|-------------------|-------------------------|
| Диеновые конъюгаты (Ед/г ткани) | $6,89 \pm 0,67$ | $7,93 \pm 0,72$ |
| Малоновый диальдегид (мкмоль/г ткани) | $17,44 \pm 0,98$ | $23,03 \pm 0,72^{**}$ |
| Каталаза (ммоль H_2O_2 /мин/г ткани) | $335,03 \pm 1,26$ | $341,97 \pm 0,62^{**}$ |
| α -токоферол (мкмоль/г ткани) | $32,21 \pm 1,85$ | $24,37 \pm 0,93^*$ |

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

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что даже кратковременная (24-часовая) механическая желтуха, вызванная путем перевязки общего желчного протока, сопровождается некоторыми морфологическими и заметными функциональными нарушениями со стороны канальцевого аппарата нефронов, что может свидетельствовать об участии компонентов желчи в регуляции тканевого гомеостаза почечной паренхимы.

Выводы

1. 24-часовая перевязка общего желчного протока (ОЖП) сопровождается резким увеличением концентрации компонентов желчи (общих желчных кислот и билирубина) в сыворотке крови и моче.

2. На фоне развивающейся холатемии в почках опытных крыс активируются процессы перекисного окисления липидов: достоверно возрастает содержание малонового диальдегида и активность каталазы, снижается концентрация α -токоферола.

3. В цитоплазме эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев как корковых, так и юкстамедулярных нефронов наблюдаются разнонаправленные метаболические сдвиги с компенсаторным перераспределением функциональной нагрузки и нарушением функции почек, что сопровождается полиурией, повышением концентрации мочевины в сыворотке крови, увеличением содержания белка в моче, суточной экскреции мочевины и ионов калия, а также уменьшением *min* клиренса мочевины и ее концентрационного индекса.

Литература

1. Ганиткевич, Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма / Я.В. Ганиткевич. – Киев, 1980. – 178 с.
2. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т / В.С. Камышников. – Мн.: Беларусь, 2000.
3. Колб, В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Изд. второе, перераб. и доп. – Минск: Изд-во “Беларусь”, 1982. – 366 с.
4. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк и [др.] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16-19.
5. Михайлов, В.П. Тканевой гомеостаз и его механизмы / В.П. Михайлов, Г.С. Катинас // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1984. – Т. LXXXVII, № 9. – С. 5-13.
6. Молостова, Л.В. Физиологические функции желчных кислот в организме / Л.В. Молостова // Биологические науки. – 1987. – № 5. – С. 5-29.
7. Мороз, Т.Б. Клиническое значение изучения мембрано-деструктивных процессов при билиарной патологии у детей и методы коррекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.09 / Т.Б. Мороз. – Казань, 1990. – 25 с.
8. Рябов, С.И. Диагностика болезней почек / С.И. Рябов, Ю.В. Наточин, Б.Б. Бондаренко. – Л.: Медицина. – 1979. – 255 с.
9. Рябов, С.И. Функциональная нефрология / С.И. Рябов, Ю.В. Наточин. – СПб. – 1997. – 304 с.
10. 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.
11. Суджан, А.В. Оценка метаболических нарушений у хирургических больных / А.В. Суджан, Н.Б. Розанова // Вестник АМН СССР. – 1991. – № 7. – С. 27-29.
12. Суходоло, В.Д. Желчь как важный регуляторный агент / В.Д. Суходоло, И.В. Суходоло // Физиология и патология гепатобилиарной системы: тез. докл. – Томск, 1980. – С. 90-93.
13. 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.
14. 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.
15. Черняускене, Р.Ч. Одновременное флюорометрическое определение концентрации витамина Е и витамина А в сыворотке крови / Р.Ч. Черняускене, З.З. Варшкявичене, П.С. Грибаускас // Лабораторное дело. – 1984. – №6 – С. 362-365.
16. Эмануэль, В.Л. Лабораторная оценка функционального состояния почек / В.Л. Эмануэль // Клин. и лаб. диагностика. – 1997. – № 10. – С. 25-32.
17. Back, P. Ausscheidung von monohydroxy-gallens auren im urin bei verschlubikterus und acuter hepatitis / P. Back // Z. Gastroent. – 1973. – Bd. 11, № 5. – S. 477-482.
18. Bremmelgaard, A. Analysis of plasma bile acid profiles in patients with liver diseases associated with cholestasis / A. Bremmelgaard, B. Alme // Scand. J. Gastroenterol. – 1980. – Vol. 15, № 5. – P. 593-600.
19. Galeazzi, R. Renal functions in obstructive jaundice / R. Galeazzi, N.B. Javitt // J. Clin. Invest. – 1977. – Vol. 60, № 3. – P. 693-701.
20. Pearse, A.G.E. Гистохимия теоретическая и прикладная / A.G.E. Pearse. – М.: Изд-во иностр. литературы. – 1962. – 598 с.
21. 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.
22. Stiehl, A. Bile salt sulphates in cholestasis / A. Stiehl // Europ. J. Clin. Invest. – 1974. – Vol. 4, № 1. – P. 59-63.
23. Sulfated and nonsulfated bile acids in urine, serum and bile of patients with hepatobiliary disease / F. Makino [et al.] // Gastroent. – 1975. – Vol. 68, № 3. – P. 545-553.
24. Sulphation of bile acids: liver of kidney? / H.G.P. Van Berge [et al.] // Lancet. – 1977. – № 8007. – P. 374.

Поступила 27.10.2010