

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦЕВ НЕФРОНОВ В ДИНАМИКЕ ПОДПЕЧЕНОЧНОГО ОБТУРАЦИОННОГО ХОЛЕСТАЗА

Л. С. Кизюкевич (kizyukevichl@mail.ru)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

**Введение.** Механическая желтуха сопровождается нарушением внешнесекреторной функции печени, значительным увеличением в сыворотке крови концентрации биологически активных компонентов желчи – общих желчных кислот и, как следствие, развитием эндотоксикоза.

**Цель исследования** – дать оценку ультраструктурным изменениям, развивающимся в эпителиоцитах проксимальных канальцев нефронов почек крыс в динамике экспериментального подпеченочного обтурационного холестаза.

**Материал и методы.** Экспериментальный подпеченочный обтурационный холестаз (продолжительностью 1, 3, 10, 30 и 90 суток) у крыс моделировали путем перевязки общего желчного протока в области ворот печени. Контролем служили ложноперевязанные животные. В сыворотке крови опытных и контрольных крыс энзимо-колориметрическим методом определяли концентрацию общих желчных кислот. Для электронно-микроскопических исследований почек крыс использовали электронный микроскоп JEM-100 CX II фирмы «JROL» (Япония).

**Результаты.** У холевичных животных на протяжении всего периода наблюдений в эпителиоцитах проксимальных канальцев корковых и юкстамедуллярных нефронов развиваются ультраструктурные изменения, сопровождающиеся дезорганизацией микроворсинок щеточной каемки, очаговым разрушением апикальной поверхности эпителиоцитов, нарушением структуры митохондрий, увеличением содержания лизосом, развитием гидropической дистрофии.

**Заключение.** Наблюдаемые изменения являются прямым доказательством тяжелых морфологических изменений в канальцевом аппарате нефронов, степень выраженности которых зависит от продолжительности холестаза и, соответственно, эндогенной интоксикации, обусловленной холатемией.

**Ключевые слова:** холестаз, эндогенная интоксикация, эпителиоциты, проксимальные канальцы, нефроны.

**Для цитирования:** Кизюкевич, Л. С. Ультраструктурные изменения в эпителиоцитах проксимальных канальцев нефронов в динамике подпеченочного обтурационного холестаза / Л. С. Кизюкевич // Гепатология и Гастроэнтерология. 2019. Т. 3, № 1. С. 87-92. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-87-92>

## ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE RENAL PROXIMAL TUBULE EPITHELIOCYTES IN THE DYNAMICS OF THE OBSTRUCTIVE SUBHEPATIC JAUNDICE

L. S. Kizyukevich

Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

**Background.** Obstructive jaundice is accompanied by impaired liver function, a significant increase in serum concentration of biologically active bile components - common bile acids and consequently the development of endotoxycosis.

**Objective.** To assess the ultrastructural changes developing in the renal proximal tubule epitheliocytes of rats in experimental subhepatic obstructive jaundice.

**Materials and methods.** An experimental subhepatic obstructive jaundice (with a 1-, 3-, 10-, 30-, and 90-day duration) in rats was modeled by ligation of the common bile duct in the hepatic hilum region. The control group were sham operated animals. The serum concentration of common bile acids of experimental and control groups was determined by an enzyme-colorimetric method. A JRO-100 CX II electron microscope by JROL (Japan) was used for electron microscopic studies.

**Results.** Throughout the entire period of observation ultrastructural changes have been developing in epithelial cells of proximal tubules of cortical and juxtamedullary nephrons in cholemic animals. These changes are accompanied by disarrangement of the brush border microvilli, focal destruction of the apical surface of the epithelial cells, mitochondrial structure impairment, lysosomal content increase, hydropic dystrophy development.

**Conclusion.** The observed changes provide direct evidence of severe morphological changes in the tubular apparatus of nephrons, their severity depending on the duration of jaundice and, consequently, on endogenous intoxication caused by cholemia.

**Keywords:** mechanical jaundice, endogenous intoxication, epitheliocytes, proximal tubule, nephrons.

**For citation:** Kizyukevich LS. Ultrastructural changes in the renal proximal tubule epitheliocytes in the dynamics of the obstructive subhepatic jaundice. *Hepatology and Gastroenterology*. 2019;3(1):87-92. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-1-87-92>

### Введение

Механическая желтуха – грозное осложнение различных доброкачественных и злокачественных заболеваний органов гепатопанкреатодуоденальной зоны [1-2]. Синдром обтурационной желтухи – одна из основных причин сохранения высокой летальности [3-5]. Механическая желтуха с явлениями печеночно-почечной недостаточности и эндотоксикоза остается острой проблемой лечения [6].

**Цель исследования** – дать оценку ультраструктурным изменениям, развивающимся в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев (ПИК) нефронов почек крыс в динамике экспериментального подпеченочного обтурационного холестаза.

### Материал и методы

Эксперимент выполнен в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также с требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 г. и правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях» от 18.06.1986 г. и ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь (№ 56 от 28.03.2008 г.). В работе использован материал от 124 белых крыс-самцов, массой  $250 \pm 50$  г. Топографическая особенность взаимоотношений общего желчного протока (ОЖП) и панкреатических протоков у крыс [7] позволяет идеально использовать данных лабораторных животных для разработки и внедрения инновационной модели разноуровневой закупорки желчных путей, что имеет место у человека. С целью изучения влияния места обтурации ОЖП на развитие ультраструктурных изменений в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев (ПИК) нефронов все животные были разделены на пять групп. У опытных животных 1 (n=15), 2 (n=15), 3 (n=14), 4 (n=14) и 5-й (n=5) групп под эфирным наркозом обтурационный подпеченочный холестаз продолжительностью 1, 3, 10, 30 и 90 суток, соответственно, моделировали путем перевязки ОЖП в его проксимальной части – области впадения в последний долевых печеночных протоков (рис. 1).

В этом случае решается важная задача экспериментальной медицины – создание на животных моделей различных функциональных состояний человека. При такой высокой перевязке у крыс ОЖП моделируется патология, связанная (в силу особенностей топографо-анатомических взаимоотношений желчных и панкреатического протоков) с закупоркой у человека только ОЖП, без вовлечения в патологический процесс панкреатического протока.

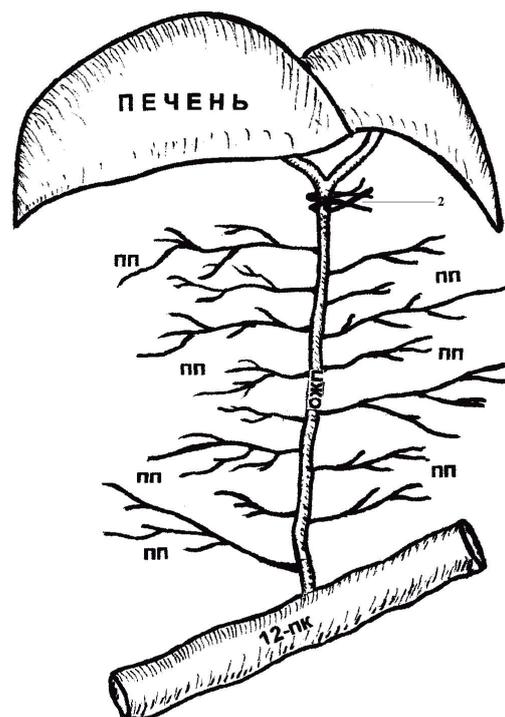


Рисунок 1. – Участок перевязки общего желчного протока (2) у крыс при моделировании подпеченочного холестаза

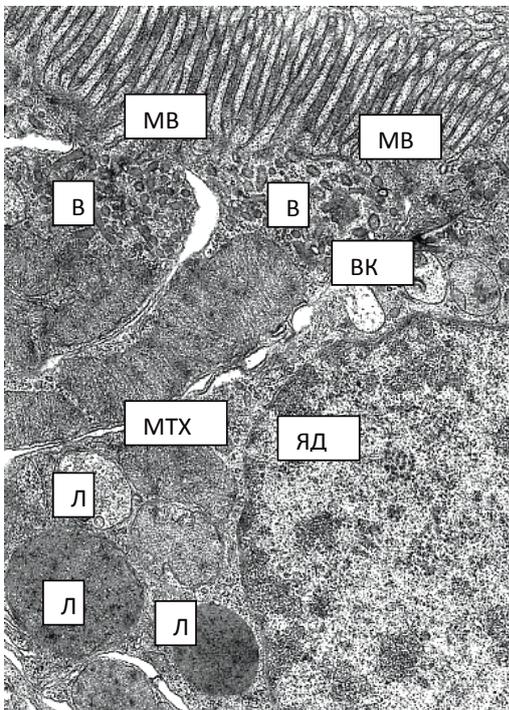
В условиях данного эксперимента всем опытным животным с целью исключения влияния операционного стресса на развитие структурно-функциональных нарушений со стороны внутренних органов и систем организма ставился адекватный контроль [8]. У контрольных крыс всех групп (n=61) производилась ложная операция – ОЖП оставляли интактным. Все оперированные животные содержались в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и пище.

В конце опытного срока после предварительного эфирного наркоза животных декапитировали. В сыворотке крови энзимо-колориметрическим методом определяли концентрацию общих желчных кислот [9]. Для электронно-микроскопических исследований кусочки ткани коркового вещества почечной паренхимы размером 2-3 мм<sup>2</sup> фиксировали при комнатной температуре в 1% растворе OsO<sub>4</sub> 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 [10], 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.). Для обработки данных применялся 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.

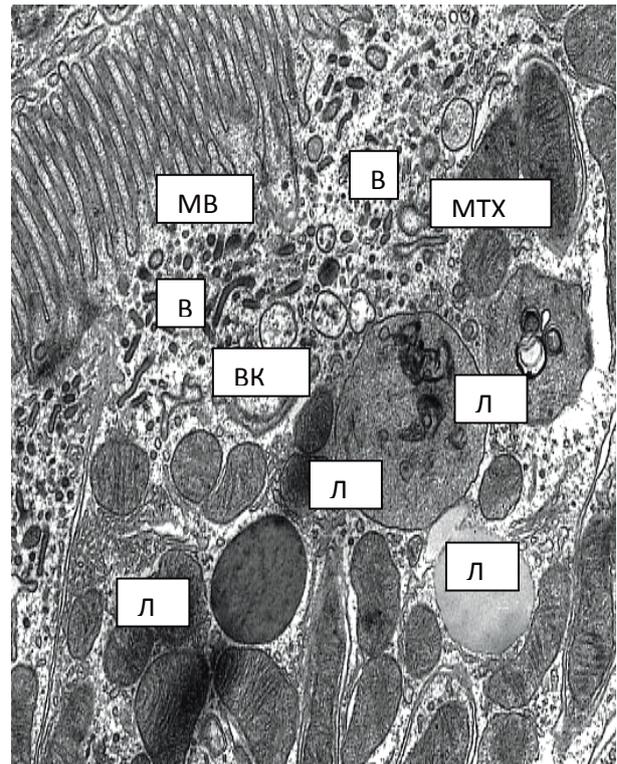
### Результаты и их обсуждение

Через 24 часа от начала моделирования внепеченочного обтурационного холестаза в сыворотке крови опытных животных в 74 раза увеличивается концентрация общих желчных кислот (с  $16,0 \pm 2,8$  мкмоль/л в контроле до  $1185,0 \pm 95,2$  мкмоль/л у опытных крыс;  $P < 0,001$ ). На этом фоне в эпителиоцитах ПИК у основания микроворсинок щеточной каемки, по сравнению с аналогичными структурами у контрольных животных (рис. 2), возрастает содержание электронно-плотных везикул. В цитоплазме таких клеток наблюдается скопление крупных вакуолей и лизосом, содержащих матрикс разнородной плотности (рис. 3). Митохондрии становятся мелкими, их матрикс уплотнен. Между эпителиоцитами практически исчезают щелевидные пространства, становятся слабозаметными и сглаживаются складки базальной цитолеммы, что может быть связано с нарушением процесса реабсорбции.



МВ – микроворсинки; Л – лизосомы; МТХ – митохондрии; ВК – вакуоли; ЯД – ядро; В – везикулы

Рисунок 2. – Эпителиоциты проксимального извитого канальца почки контрольной крысы.  $\times 10\,000$



Л – лизосомы; МТХ – митохондрии; МВ – микроворсинки; В – везикулы; ВК – вакуоли

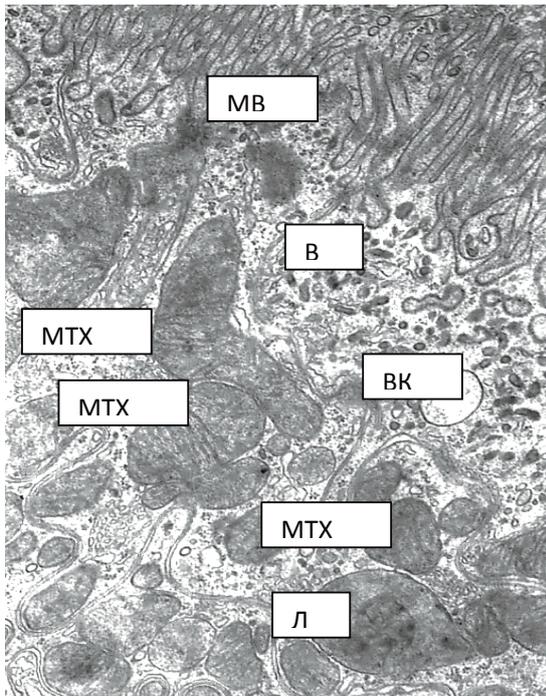
Рисунок 3. – Возрастание содержания электронно-плотных везикул, крупных вакуолей и лизосом в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев почки крыс через 24 часа обтурационного подпеченочного холестаза.  $\times 10\,000$

На протяжении 72 часов холестаза погибает 10,5% животных. У выживших опытных крыс в сыворотке крови в 56 раз увеличивается концентрация общих желчных (с  $14,1 \pm 1,8$  мкмоль/л в контроле до  $797,7 \pm 72,4$  мкмоль/л у опытных крыс;  $P < 0,001$ ). При электронно-микроскопическом исследовании почек у таких животных отмечаются очаги дезорганизации микроворсинок щеточной каемки эпителиоцитов ПИК (рис. 4).

В цитоплазме таких клеток отмечается полиморфизм митохондрий, в матриксе некоторых появляются мелкие кистоподобные образования. У основания щеточной каемки ПИК продолжает наблюдаться скопление везикул и пузырьков с повышенной электронной плотностью.

Спустя 10 суток эксперимента у выживших опытных крыс в сыворотке крови в 38 раз увеличивается концентрация общих желчных кислот (с  $18,90 \pm 2,70$  мкмоль/л в контроле до  $725,00 \pm 182,10$  мкмоль/л у опытных крыс;  $P < 0,001$ ). На этом фоне в эпителиальных клетках ПИК отмечаются очаговые разрушения митохондрий и их укрупнение, при этом в околядерной зоне значительно возрастает содержание вторичных лизосом (рис. 5).

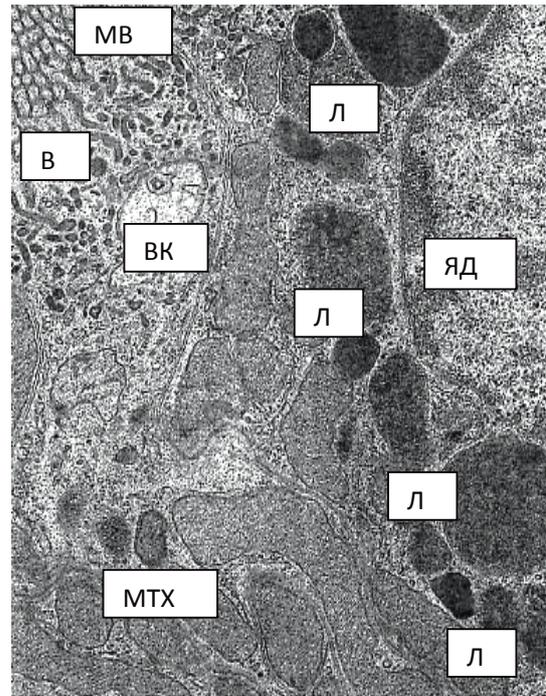
Наблюдаемые у животных с 10-суточным подпеченочным холестазом ультраструктурные



Л – лизосомы; МТХ – митохондрии; МВ – микроворсинки; В – везикулы; ВК – вакуоли

Рисунок 4. – Апикулярная поверхность эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев почки крысы через 72 часа экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза.  $\times 10\ 000$

изменения в эпителиоцитах проксимальных канальцев нефронов могут быть связаны с общеизвестным "феноменом 9-го дня", когда тяжелое состояние кризиса обусловлено отмиранием в организме большего, чем обычно, количества митохондрий, поврежденных при первой встрече с патологическим воздействием [11]. Реали-



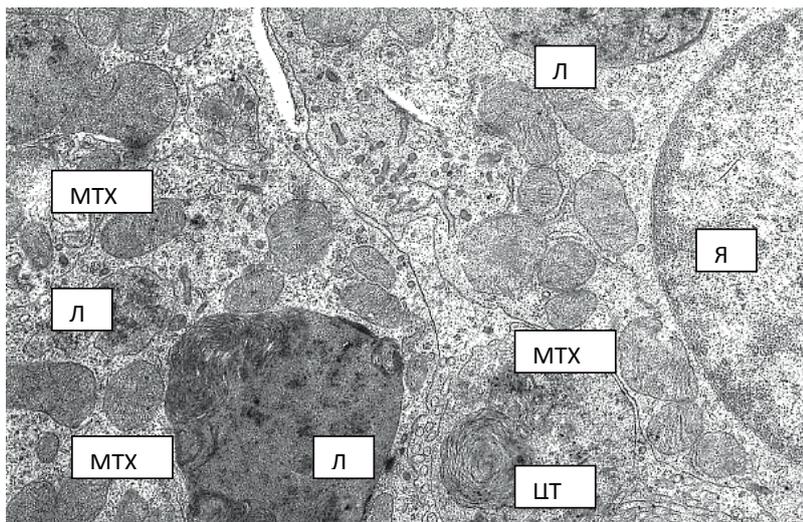
МТХ – митохондрии; МВ – микроворсинки; ВК – вакуоли; ЯД – ядро; В – везикулы; Л – лизосомы

Рисунок 5. – Укрупнение и очаговое разрушение митохондрий, увеличение содержания лизосом в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев почки крысы через 10 суток экспериментального обтурационного подпеченочного холестаза.  $\times 10\ 000$

зующееся при этом ускорение энергопродукции отнюдь не является благополучным. Оно проскакивает верхнюю границу нормы и выходит в область экстремальных состояний, граничащих с жизнью.

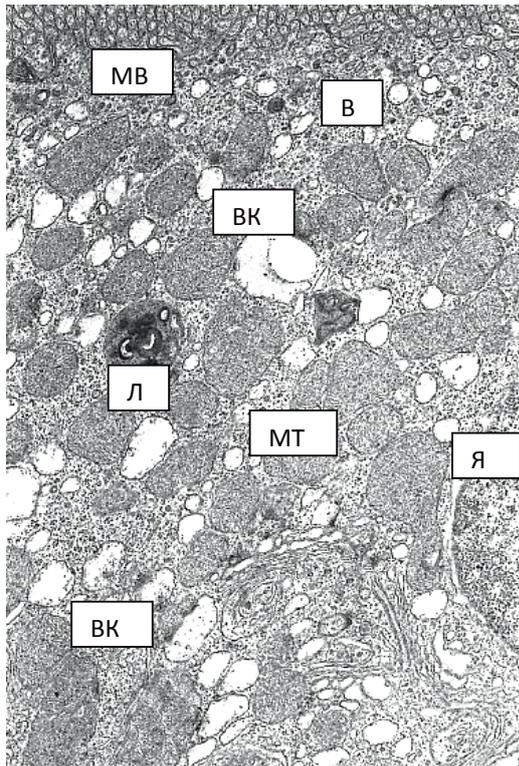
Среди животных с 30-суточным холестазом

летальность составляет 49%. У выживших опытных крыс на фоне почти 70-кратного увеличения концентрации общих желчных кислот в сыворотке крови ( $P < 0,001$ ) в цитоплазме эпителиоцитов ПИК уменьшается плотность расположения митохондрий. Последние мелкие, частично разрушенные, характеризуются просветленным матриксом. Параллельно с этим появляются крупные лизосомы (некоторые из них достигают гигантских размеров), а также причудливой конфигурации цитоплазматические тельца (рис. 6). Среди большой и гетерогенной группы этих образований следует выделить такие, которые содержат внутриклеточные органеллы на разных стадиях деструкции. В эпителиоцитах ПИК отдельных нефронов развивается гидропическая дистрофия (рис. 7).



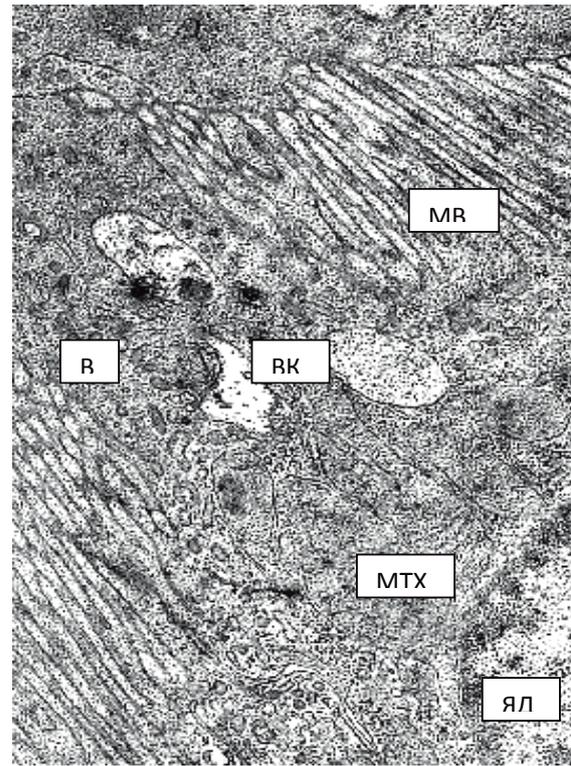
МТХ – митохондрии; Яд – ядро; В – везикулы; Л – лизосомы; ЦТ – цитоплазматические тельца

Рисунок 6. – Снижение плотности расположения митохондрий, их частичное разрушение и появление гигантских лизосом в цитоплазме деструктивно измененных эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев почки животных с 30-суточным обтурационным подпеченочным холестазом.  $\times 10\ 000$



МТХ – митохондрии; МВ – микроворсинки; ВК – вакуоли; ЯД – ядро; В – везикулы; Л – лизосомы

Рисунок 7. – Вакуолизация цитоплазмы деструктивно измененных эпителиоцитов ПИК почки крысы через 30 суток обтурационного подпеченочного холестаза. Электронная микрофотография. Ув. 10 000



МТХ – митохондрии; МВ – микроворсинки; ВК – вакуоли; В – везикулы; ЯД – ядро

Рисунок 8. – Апикальная часть эпителиоцита ПИК нефрона почки крысы через 90 суток от начала моделирования обтурационного подпеченочного холестаза. ×10 000

К исходу 90 суток подпеченочного обтурационного холестаза погибает 50% опытных крыс – это животные, у которых выше места перевязки ОЖП сформировался крупный протоковый пузырь с большим количеством застойной желчи, а коллатерали ОЖП не образовались, соответственно, оттока желчи в 12-перстную кишку и восстановления ее энтерогепатической циркуляции не произошло. У животных, оставшихся в живых, развиваются коллатерали ОЖП, что способствует восстановлению оттока желчи в 12-перстную кишку. При электронно-микроскопическом исследовании почек у таких животных обращает на себя внимание наличие в эпителиоцитах ПИК корковых и юкстамедуллярных нефронов лишь ограниченных участков дезорганизации и разрушения микроворсинок щеточной каемки, вакуолей и митохондрий, характеризующихся просветленным матриксом и частично разрушенными кристами (рис. 8).

Таким образом, дезорганизация и очаговое разрушение микроворсинок щеточной каемки в динамике экспериментального подпеченочного обтурационного холестаза является следствием поражения ПИК [12-13]. Увеличение количества пиноцитозных вакуолей у основания микроворсинок щеточной каемки эпителиоцитов ПИК корковых и юкстамедуллярных нефронов связано

с повышенной реабсорбцией белка в условиях почечной патологии [14]. Такая напряженная работа вакуолярного аппарата может, по мнению автора, предотвратить потерю белка. Наблюдаемое при поражении ПИК увеличение количества лизосом вызвано деструктивными процессами внутри выстилающих их эпителиоцитов. Значительное накопление лизосом приводит к нарушению целостности лизосомальных мембран и выходу лизосомальных ферментов в цитоплазму, что в конечном итоге заканчивается развитием фокального или тотального некроза клетки [14].

### Выводы

1. Длительная механическая желтуха сопровождается нарушением внешнесекреторной функции печени и развитием эндотоксикоза за счет значительного увеличения концентрации общих желчных кислот в сыворотке крови.

2. У холемических животных на протяжении всего периода наблюдений в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев корковых и юкстамедуллярных нефронов развиваются ультраструктурные изменения, сопровождающиеся дезорганизацией микроворсинок щеточной каемки, очаговым разрушением апикальной поверхности эпителиоцитов, нарушением струк-

туры митохондрий, увеличением содержания лизосом, развитием гидропической дистрофии, что является прямым доказательством тяжелых морфологических изменений в канальцевом ап-

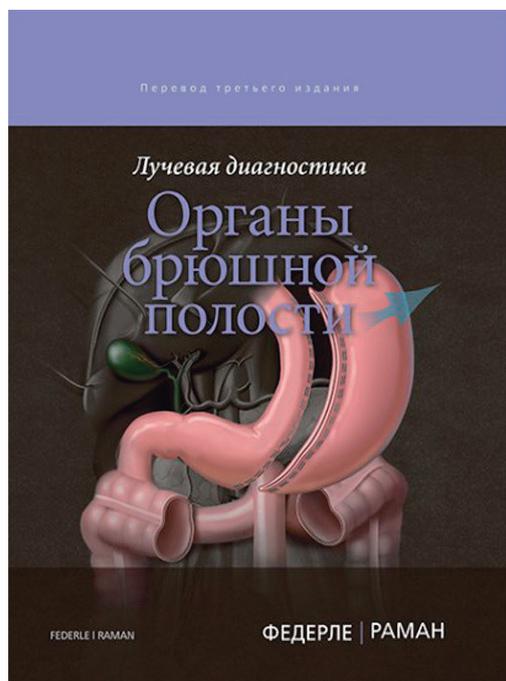
парате нефронов, степень выраженности которых зависит от продолжительности холестаза и, соответственно, эндогенной интоксикации, обусловленной холатемией.

## References

1. Kucukav F, Okten RS, Cumhuri T. Percutaneous biliary intervention for primary sclerosing cholangitis in a patient with situs inversus totalis. *Turk. J. Gastroenterol.* 2011;22(6):636-640. doi: 10.4318/tjg.2011.0276.
2. Horwood J, Akbar F, Davis K, Morgan R. Prospective evaluation of a selective approach to cholangiography for suspected common bile duct stones. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 2010;92(3):206-210. doi: 10.1308/003588410X12628812458293.
3. Mural R, Hashiguchi F, Kusuyama A, Yoshimi M, Watanabe K, Okui S, Ando H, Itsubo K. Percutaneous stenting for malignant biliary stenosis. *Surgical endoscopy.* 1991;5(3):140-142. doi: 10.1007/BF02653221.
4. Vetshev PS, Shulutko AM, Prudkov MI. Hirurgicheskoe lechenie holelitiaza: nezyblemye principy, shhadjashhie tehnologii. *Hirurgija. Zhurnal im. N.I. Pirogova* [Pirogov Russian Journal of Surgery]. 2005;8:91-93. (Russian).
5. Ivshin VG, Lukichev OD. Maloinvazivnye metody dekompressii zhelchnyh putej. Tula: Grif i K; 2003. 182 p. (Russian).
6. Bekbaev SA, Lipnitskij EZh, Kotovskij AE, Istratov VG. Sovremennye podhody diagnostiki i lechenija pechenochno-pochечноj nedostatochnosti u bolnyh mehanicheskoj zheltuhoy [Modern approach of diagnosis and treatment of liver-kidney failure in patients with obstructive jaundice]. *Vestnik Nacionalnogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N.I. Pirogova* [Bulletin of Pirogov National Medical Surgical Center]. 2013;8(2):76-78. (Russian).
7. Kizyukevich LS. Reaktivnye izmenenija v pochkah pri jeksperimentalnom holestaze. Grodno: GrSMU; 2005. 239 p. (Russian).
8. Sudzhyan AV, Rozanova NB. Ocenka metabolicheskikh narushenij u hirurgicheskikh bolnyh. *Vestnik Akademii medicinskih nauk SSSR.* 1991;(7):27-29. (Russian).
9. Kamyshnikov VS. Spravochnik po kliniko-biohimicheskoj laboratornoj diagnostike. Vol. 2. Minsk: Belarus; 2000. 462 p. (Russian).
10. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 1963;17(1):208-212. doi: 10.1083/jcb.17.1.208.
11. Kondrasheva MN. Energeticheskiy obmen pri patologii. In: Kondrasheva MN, editor. Itogi koordinacii issledovanij po teme „Reguljacija jenergeticheskogo obmena i ustojchivost organizma“. K sovmestnym soveshhanijam stran-chlenov SJeV i SFRJu v 1975 g. po probleme „Biokibernetika i metabolizm mitohondrij“ (v ramkah kompl. programmy). Pushhino; 1975. p. 67-82. (Russian).
12. Endon H, Sakai F. Significance of urinaru proteins and enzymes in renal disis. *Jap. J. Pharmacol.* 1980;30:33.
13. Cavanagh DM, Spaziani E. Effects of endotoxin on renal function and tubular enzyme activity. *Circ. Shock.* 1989;27(4):342-343.
14. Plotkin VJa. O vozmozhnoj roli proksimalnyh kanalcev pochki v patogeneze glomerulonefrita. *Terapevticheskij arhiv* [Therapeutic archive]. 1980;52(12):76-79. (Russian).

Поступила: 29.03.2019

Принята к печати: 04.04.2019



Федерле, М. П. Лучевая диагностика. Органы брюшной полости / М. П. Федерле, Ш. П. Раман ; пер. с англ. В. Н. Вишнякова. – Москва : Изд-во Панфилова, 2019. – 1088 с. – ISBN 978-5-91839-101-3.

Книга посвящена вопросам лучевой анатомии, технике визуализации и современным подходам к диагностике практически всех заболеваний органов брюшной полости.

Издание содержит более 3500 высококачественных тщательно подобранных иллюстраций.

В книге сохранен великолепный стиль изложения материала, характерный для всех изданий серии Diagnostic Images: выделение отдельных нозологических форм с их логической интеграцией в более широкие разделы. Компактный формат теста Amirsys позволил в наглядном и доступном виде отразить значительный объем наиболее важной для клинициста информации. Подробно рассматриваются вопросы лучевой диагностики заболевания брюшины, брыжейки, брюшной стенки, пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, печени, билиарной системы и поджелудочной железы, а также особенности лучевой визуализации при внутрибрюшных проявлениях системных заболеваний.

Книга предназначена для специалистов по лучевой диагностике и гастроэнтерологов.