

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦЕВ НЕФРОНОВ ПРИ СУПРАДУОДЕНАЛЬНОМ ОБТУРАЦИОННОМ ХОЛЕСТАЗЕ

Л. С. Кизюкевич

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Обтурационный холестаз сопровождается развитием эндогенной интоксикации, почечной недостаточности и гепаторенального синдрома, что быстро приводит к декомпенсации организма.

Цель исследования. Дать оценку ультраструктурным изменениям, развивающимся в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев нефронов почек крыс в динамике экспериментального супрадуоденального обтурационного холестаза.

Материалы и методы. Экспериментальный супрадуоденальный обтурационный холестаз (продолжительностью 3 и 10 суток) моделировали у крыс путем перевязки общего желчного протока в супрадуоденальной его части. Контролем служили ложнооперированные животные. В сыворотке крови и моче 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 желтушных животных на протяжении 10 суток эксперимента на фоне эндотоксемии, обусловленной выраженной холатемией и холатурией, в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев развиваются тяжелые ультраструктурные изменения, сопровождающиеся дезорганизацией микроворсинок щеточной каемки, развитием острого отека цитоплазмы с возникновением в ней зон просветления, скоплением лизосом, содержащих матрикс разнородной плотности, и повреждением митохондрий.

Заключение. Наблюдаемые тяжелые ультраструктурные изменения в канальцевом аппарате нефронов являются причиной развития гепаторенального синдрома и полиорганной недостаточности, степень выраженности которой зависит от продолжительности супрадуоденального холестаза и обусловленной холатемией эндогенной интоксикации.

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

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

L. S. Kizyukevich

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Background. Obstructive jaundice is accompanied by the development of endogenous intoxication, renal failure and hepatorenal syndrome, resulting in decompensation in the body.

Objective – to estimate the ultrastructural changes developing in the renal proximal tubule epithelial cells of rats in dynamics of experimental supraduodenal obstructive jaundice.

Materials and methods. Experimental supraduodenal obstructive jaundice (duration: 3 and 10 days) was simulated in rats by bandaging the common bile duct in its supraduodenal part. Sham operated animals were used as a control group. The concentration of common bile acids was determined by enzyme-colorimetric method in blood serum and urine of experimental and control rats. The electron microscope JEM-100 CX II of "JROL" company (Japan) was used for electron microscopic studies of rat kidneys.

Results. During 10 days of the experiment on the background of endotoxemia caused by marked cholemia and cholaturia jaundiced animals have been developing severe ultrastructural changes in the renal proximal tubule epithelial cells, accompanied by disorganization of microvilli of the brush border, acute oedema of the cytoplasm with electron lucent zones appearing in it, accumulation of lysosomes containing matrix of heterogeneous density, and damage to mitochondria.

Conclusion. The observed severe ultrastructural changes in the tubular apparatus of nephrons result in the development of hepatorenal syndrome and multiple organ failure, the degree of severity of the latter depending on both the duration of supraduodenal cholestasis and cholemia-induced endogenous intoxication.

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

Автор, ответственный за переписку:

Кизюкевич Леонид Стефанович, канд. мед. наук, доцент;
Гродненский государственный медицинский университет /
Grodno State Medical University; e-mail: kizyukevichl@mail.ru

Corresponding author:

Kizyukevich Leonid, PhD (Medicine), Associate Professor;
Grodno State Medical University; e-mail: kizyukevichl@mail.ru

Для цитирования:

Кизюкевич, Л. С. Ультраструктурные изменения в эпителиоцитах проксимальных канальцев нефронов при супрадуоденальном обтурационном холестазах / Л. С. Кизюкевич // Гепатология и гастроэнтерология. 2019. Т. 3, № 2. С. 172-177. <https://dx.doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-2-172-177>.

For citation:

Kizyukevich LS. Ultrastructural changes in the renal proximal tubule epitheliocytes in the dynamics of the supraduodenal obstructive jaundice. *Hepatology and Gastroenterology*. 2019;3(2)172-177.: <https://dx.doi.org/10.25298/2616-5546-2019-3-2-172-177>.

Введение

Несмотря на тесную взаимосвязь нарушений функциональной активности печени и почек при остром обтурационном холестазах, большинство работ посвящено патогенезу острой печеночной недостаточности [1], что вполне объяснимо, поскольку источником заболевания является печень. Однако последующее развитие заболевания усугубляется присоединением почечной недостаточности, а в ряде случаев и необратимой картины гепаторенального синдрома, что быстро приводит к декомпенсации организма [2-5].

Цель исследования – представить оценку ультраструктурным изменениям, развивающимся в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев нефронов почек крыс в динамике экспериментального супрадуоденального обтурационного холестаза.

Материалы 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», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь (№ 56 от 28.03.2008 г.). В работе использован материал от 83 белых крыс-самцов, массой 250±50 г. Топографическая особенность взаимоотношений общего желчного протока (ОЖП) и панкреатических протоков у крыс [6] 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 две группы. У опытных животных 1-й (27 крыс) и 2-й (36 крыс) групп под эфирным наркозом производили послойный разрез передней брюшной стенки по белой линии живота, извлекали брыжейку 12-перстной кишки и обтурационный внепеченочный холестаза, продолжи-

тельностью 3 и 10 суток, соответственно, моделировали путем перевязки ОЖП с последующим его пересечением между двумя шелковыми лигатурами в дистальной (супрадуоденальной) его части – области впадения последнего в двенадцатиперстную кишку (рис. 1), что приводит к нарушению оттока в тонкий кишечник не только желчи, но и поджелудочного сока и, как следствие, к развитию сопутствующего панкреатита и полиорганной недостаточности [7-8].

При этом решается важная задача экспериментальной медицины – создание на животных моделей различных патологических состояний человека. Так, при перевязке ОЖП в супрадуоденальной его части моделируется патология, связанная с одновременной закупоркой у человека общего желчного и панкреатического протоков (клиническая картина стеноза Фатерова сосочка) (рис. 2).

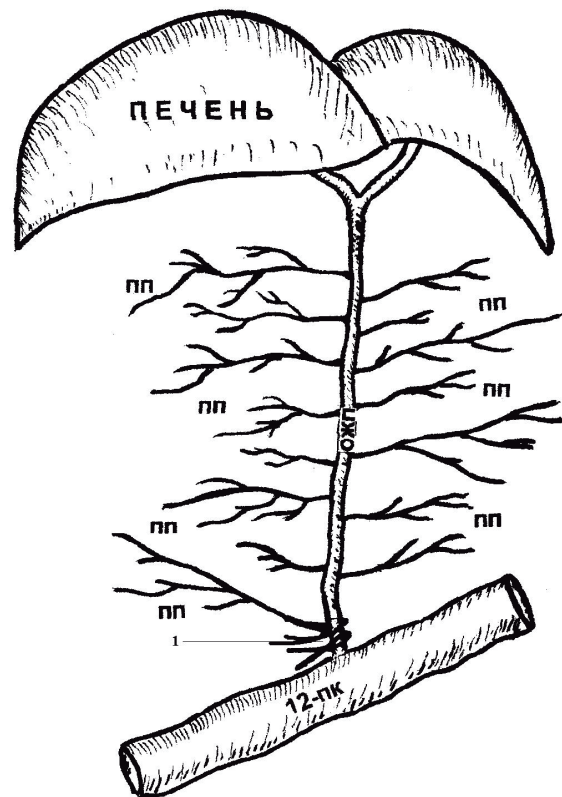


Рисунок 1. – Участок перевязки общего желчного протока (1) у крыс при моделировании обтурационного супрадуоденального холестаза (пп - панкреатические протоки)

Figure 1. – The ligation site of the common bile duct (1) in rats when modeling obstructive supraduodenal cholestasis (пп - pancreatic ducts)

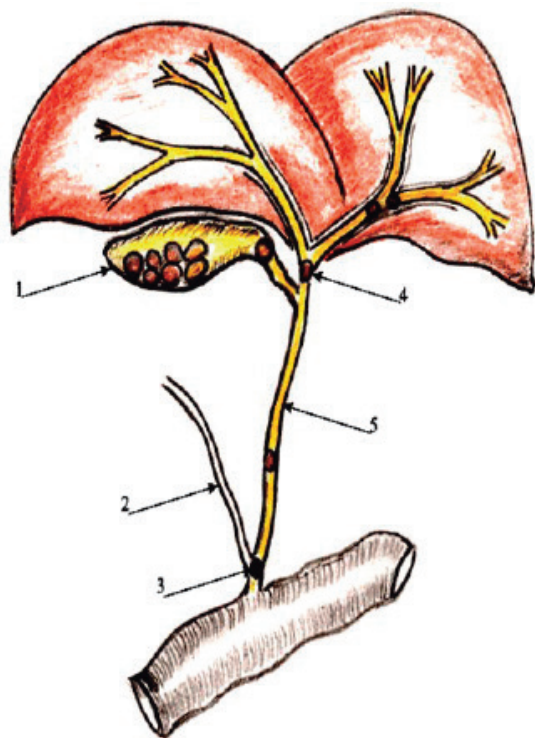


Рисунок 2. – Схема разноуровневой закупорки желчных протоков у пациентов с механической желтухой (1 – желчный пузырь; 2 – панкреатический проток; 3 – место впадения общего желчного и панкреатического протоков в 12-перстную кишку; 4 – общий печеночный проток; 5 – общий желчный проток)
Figure 2. – Scheme of multilevel blockage of the bile duct in patients with obstructive jaundice (1-gallbladder; 2 - pancreatic duct; 3 - the place where the common bile and pancreatic ducts enter the 12 duodenal ulcer; 4 - common hepatic duct; 5 - common bile duct)

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 [9]. У контрольных крыс обеих групп (n=20) 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.

Применяя общепринятые биохимические методики и используя биохимический анализатор Architect С 8000 (США) в сыворотке крови и суточном объеме мочи энзимометрическим методом определяли концентрацию общих желчных кислот [10]. Для электронно-микроскопических исследований кусочки ткани коркового вещества почечной паренхимы размером 2-3 мм² фиксировали при комнатной температуре в 1% растворе OsO₄ на 0,05 М какодилатном буфере (рН=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 [11], 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 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±m, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

На протяжении 72 часов экспериментального супрадуоденального обтурационного холестаза летальность составляет 18,5%. У выживших опытных крыс в сыворотке крови почти в 100 раз возрастает концентрация общих желчных кислот (p<0,001) (рис. 3).

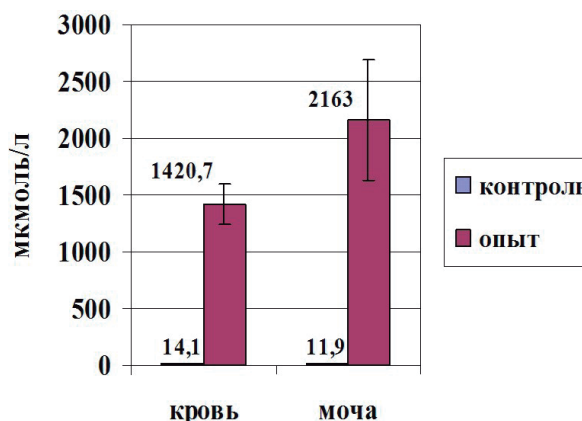
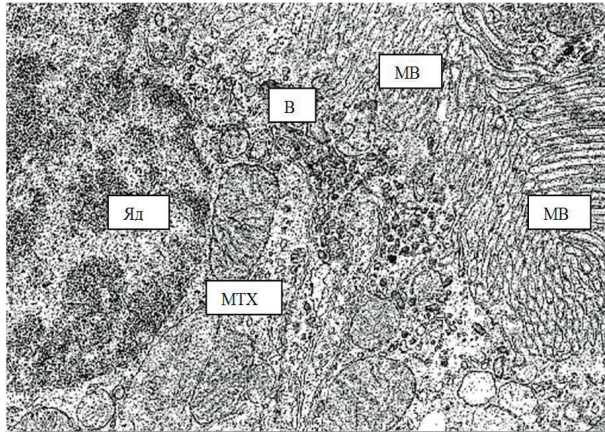


Рисунок 3. – Изменение концентрации общих желчных кислот в сыворотке крови и моче крыс через 72 часа от начала моделирования супрадуоденального обтурационного холестаза
Figure 3. – The change in the concentration of total bile acids in the blood serum and urine of rats after 72 hours from the start of modeling supraododenal obstructive cholestasis

В данных условиях почки усиленно экскретируют холаты из организма, при этом концентрация общих желчных кислот в моче увеличивается более чем в 180 раз (p<0,001) (рис. 4).

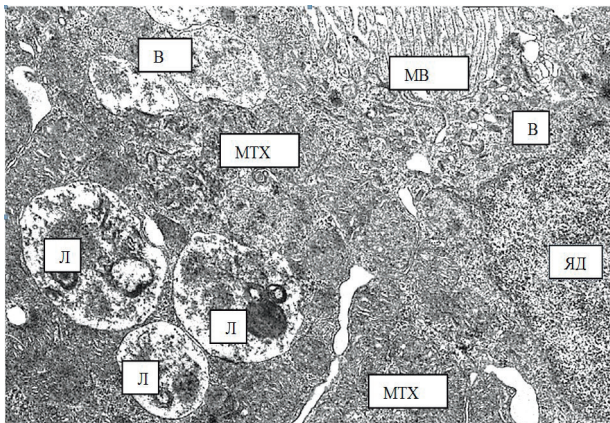
При электронно-микроскопическом исследовании в почках опытных крыс относительно аналогичных эпителиоцитов у контрольных животных (рис. 4) на апикальной поверхности эпителиоцитов ПИК корковых и юкстамедулярных нефронов наблюдаются очаговые разрушения микроворсинок щеточной каемки. В апикальной

части цитоплазмы данных клеток постепенно исчезают везикулы и пузырьки, при этом накапливаются крупные вакуоли и лизосомы, содержащие разнородной плотности матрикс и миелоноподобные фигуры, а также очагово разрушенные митохондрии (рис. 5).



МВ – микроворсинки; МТХ – митохондрии; В – везикулы; Яд – ядро

Рисунок 4. – Электронная микрофотография апикальной части эпителиоцита ПИК почки контрольной крысы. ×10000
 МВ - microvilli; МТХ - mitochondria; В - vesicles; Яд – nucleus
Figure 4. – Electron micrograph of the apical part of the epithelial cell PIC kidney control rats. ×10000



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

Рисунок 5. – Эпителиоцит ПИК почки крысы через 72 часа обтурационного супрадуоденального холестаза. Электронная микрофотография. ×10000
 Л - lysosomes; МТХ - mitochondria; МВ - microvilli; В - vesicles; ВК - vacuoles; ЯД - nucleus

Figure 5. – Epithelial cell pic rat kidney after 72 hours of obstructive supraduodenal cholestasis. Electronic micrograph. ×10000

На протяжении 10 суток экспериментального обтурационного супрадуоденального холестаза погибает 58,3% животных. У выживших опытных крыс в сыворотке крови в 25 раз возрастает концентрация общих желчных кислот ($p < 0,001$) (рис. 6). В этих условиях почки работают с повышенной нагрузкой по выведению данных веществ из организма, при этом концентрация общих желчных кислот в моче увеличивается в 109 раз ($p < 0,001$) (рис. 6).

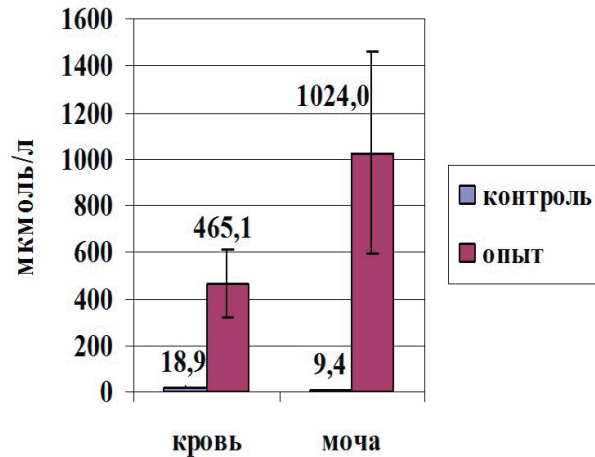
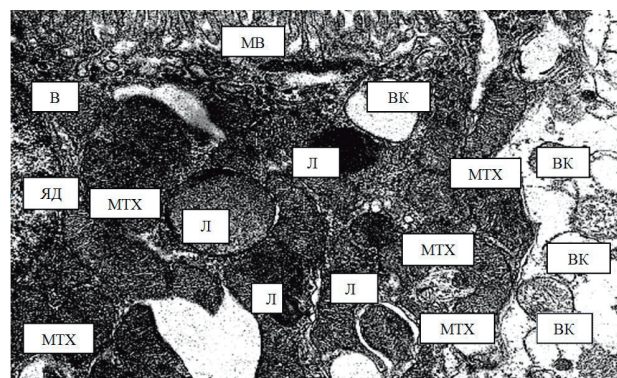


Рисунок 6. – Изменение концентрации общих желчных кислот в сыворотке крови и моче крыс через 10 суток от начала моделирования супрадуоденального обтурационного холестаза
Figure 6. - Change in the concentration of total bile acids in the blood serum and urine of rats after 10 days from the start of modeling supraduodenal obstructive cholestasis

Электронно-микроскопические исследования указывают на то, что в почках опытных крыс с десятисуточным супрадуоденальным холестазом происходят более тяжелые изменения в эпителиоцитах ПИК: наблюдается дезорганизация микроворсинок щеточной каемки, вакуолизация цитоплазмы, сопровождающаяся возникновением зон просветления и развитием острого отека, скопление лизосом, содержащих матрикс разнородной плотности, и изменения митохондрий, носящие разный характер (часть из них характеризуется просветленным матриксом, тогда как другая их часть – уплотненным матриксом с едва различимыми кристами) (рис. 7).



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

Рисунок 7. – Деструктивно измененные эпителиоциты ПИК почки крысы через 10 суток экспериментального супрадуоденального холестаза. Электронная микрофотография. ×10000

МТХ - mitochondria; МВ - microvilli; ВК - vacuoles; ЯД - nucleus; В - vesicles; Л - lysosomes

Figure 7. – Destructively altered epithelial cells of the PIC of a rat kidney after 10 days of experimental supraduodenal cholestasis. Electronic micrograph. ×10000

Таким образом, результаты наших исследований показали, что супрадуоденальный обтурационный холестаз приводит к нарушению внешнесекреторной функции печени, диффузии холевических метаболитов в биологические среды, эндогенной интоксикации, что инициирует возникновение тяжелых ультраструктурных изменений в эпителиоцитах ПИК нефронов, почечной, печеночно-почечной и полиорганной недостаточности. Одной из причин почечной патологии при холестазе является нарушение элиминации эндотоксинов [12]. Холатемия – наиболее показательный и чувствительный биохимический желчный маркер эндогенной интоксикации [13]. Дезорганизация и очаговое разрушение микроворсинок щеточной каемки в динамике экспериментального обтурационного холестаза являются следствием поражения ПИК [14-15]. Уменьшение количества пиноцитозных вакуолей у основания микроворсинок щеточной каемки эпителиоцитов ПИК корковых и юкстамедуллярных нефронов связано с угнетением реабсорбции белка в условиях почечной патологии [16]. Такая работа вакуолярного аппарата способствует потере белка. Наблюдаемое при поражении ПИК увеличение количества лизосом вызвано деструктивными процессами внутри выстилающих их эпителиоцитов, что в конечном итоге приводит к нарушению целостности лизо-

сомальных мембран и выходу лизосомальных ферментов в цитоплазму, вызывая вакуолизацию и отек цитоплазмы клеток, что заканчивается развитием фокального или тотального некроза клетки [16]. При этом выраженность данных изменений и летальность животных достигают своего максимума к десятым суткам супрадуоденального обтурационного холестаза.

Полученные результаты лягут в основу фундаментальных аспектов патогенеза полиорганных нарушений в динамике обтурационного внепеченочного холестаза.

Выводы

1. Экспериментальный обтурационный супрадуоденальный холестаз сопровождается резким увеличением концентрации общих желчных кислот в тканях внутренней среды организма и, как следствие, эндогенной интоксикации, приводящей к тяжелым ультраструктурным изменениям в эпителиоцитах ПИК корковых и юкстамедуллярных нефронов, гепаторенальному синдрому и полиорганной недостаточности.

2. Выраженность ультраструктурных изменений в канальцевом аппарате нефронов и летальность животных в условиях супрадуоденального обтурационного холестаза достигают своего максимума к десятым суткам эксперимента.

References

- Gonzalez-Correa JA, De La Cruz JP, Martin-Auriales E, Lopez-Egea MA, Ortiz P, Sanchez de la Cuesta F. Effects of S-adenosyl-L-methionine on hepatic and renal oxidative stress in an experimental model of acute biliary obstruction in rats. *Hepatology*. 1997;26(1):121-127. doi: 10.1002/hep.510260116.
- Kucuk C, Sozuer EM, Ikizceli I, Avsarogullari L, Keceli M, Akgun H, Muhtaroglu S. Role of oxygen free radical scavengers in acute renal failure complicating obstructive jaundice. *Eur. Surg. Res.* 2003;35(3):143-147.
- Betrosian AP, Agarwal B, Douzinas EE. Acute renal dysfunction in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2007;13(42):5552-5559. doi: 10.3748/wjg.v13.i42.5552.
- Kashaeva MD, Ibekenov OT, Butrimova SSh. Metody dokazatelnoj mediciny v vyjavlenii faktorov narusheniya funkcion pochechek pri mehanicheskikh zheltuhah. *Bulleten Volgogradskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii medicinskih nauk i Administracii Volgogradskoj oblasti*. 2007;(3):33-34. (Russian).
- Bekbauov SA, Lipnitskij EZh, Kotovskij AE, Istratov VG. Sovremennye podhody diagnostiki i lecheniya pechenochno-pochechnoj nedostatochnosti u bolnyh mehanicheskoi zheltuhoh [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).
- Kizyukevich LS. Reaktivnye izmeneniya v pochkah pri jeksperimentalnom holestaze. Grodno: GrSMU; 2005. 239 p. (Russian).
- Kizyukevich LS, Turevsky AA, inventors; Grodno State Medical University, assignee. Sposob modelirovaniya ostrogo pankreatita. BY patent 5398. 2003 Sept 30. (Russian).
- Kizyukevich LS, Kizyukevich DL, Ambrushkevich YuG, inventors; Grodno State Medical University, assignee. Sposob modelirovaniya poliorgannoj nedostatochnosti u krysa v jeksperimente. BY patent 14567. 2010 Aug 30. (Russian).
- Sudzhyan AV, Rozanova NB. Ocenka metabolicheskikh narushenij u hirurgicheskikh bolnyh. *Vestnik Akademii medicinskih nauk SSSR*. 1991;(7):27-29. (Russian).
- Kamyshnikov VS. Spravochnik po kliniko-biohimicheskoj laboratornoj diagnostike. Vol. 2. Minsk: Belarus; 2000. 462 p. (Russian).
- 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.
- Zvjaginceva TD, Chernobaj AI. Vnutripechenochnyj holestaz: ot patogeneza do lechenija. *Ukrainskij medicinskij zhurnal*. 2012;89(3):79-83. (Russian).
- Kizyukevich LS, Kuznetsov OYe. Komponenty zhelchi kak biohimicheskie markery jendogennoj intoksikacii v dinamike jeksperimentalnogo podpechenochnogo holestaza In: Nadolnik LI, executive editor. *Sovremennye problemy biohimii* [Current problems in biochemistry]. Sbornik nauchnyh statej. Grodno: JurSaPrint; 2016. Pt. 1; p. 143-148. (Russian).
- Endon H, Sakai F. Significance of urinary proteins and enzymes in renal disease. *Jap. J. Pharmacol.* 1980;30(Suppl):33.
- Cavanagh DM, Spaziani E. Effects of endotoxin on renal function and tubular enzyme activity. *Circ. Shock*. 1989;27(4):342-343.
- Plotkin VJa. O vozmozhnoj roli proksimalnyh kanalcev pochki v patogeneze glomerulonefrita. *Terapevticheskij arhiv* [Therapeutic archive]. 1980;52(12):76-79. (Russian).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Кизюкевич Леонид Стефанович, канд. мед. наук, доцент; Гродненский государственный медицинский университет / Grodno State Medical University; e-mail: kizyukevichl@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8274-0787

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was performed without external funding.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about authors:

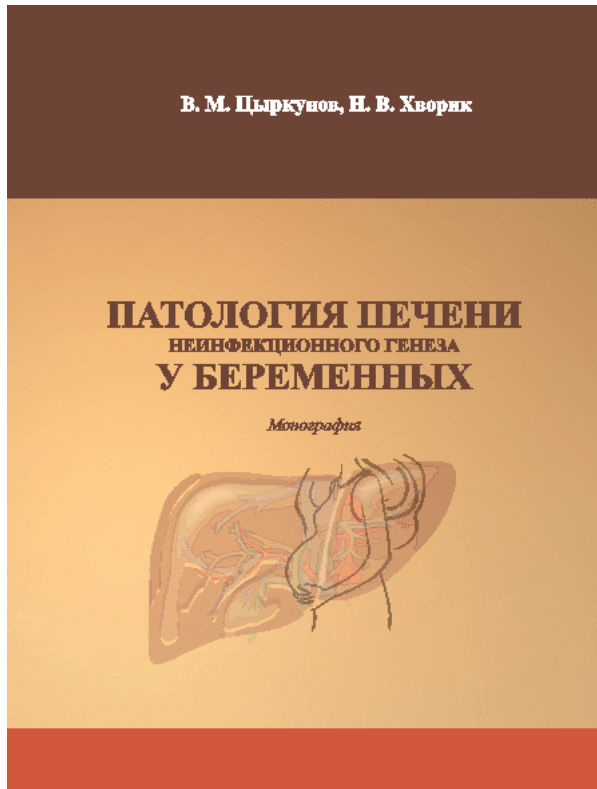
Kizyukevich Leonid, PhD (Medicine), Associate Professor; Grodno State Medical University; e-mail: kizyukevichl@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8274-0787

Поступила: 31.08.2019

Принята к печати: 18.10.2019

Received: 31.08.2019

Accepted: 18.10.2019



Цыркунов, В. М. Патология печени неинфекционного генеза у беременных : монография / В. М. Цыркунов, Н. В. Хворик ; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет". – Гродно : ГрГМУ, 2018. – 234 с. : рис., табл. – Библиогр.: с. 207-234. – ISBN 978-985-595-056-2.

В монографии представлены результаты зарубежных публикаций и собственных исследований по проблеме неинфекционной патологии печени

у беременных. Рассмотрены факторы риска возникновения гепатопатологии, основные клинические проявления, особенности диагностики с учетом гестационного процесса, времени возникновения и характера течения поражения печени. Раскрыты причины формирования основных клиничко-патогенетических синдромов, определяющих характер поражения печени у беременных в III триместре, в основе которых находятся нарушения липидного обмена, стероидпродуцирующей функции плаценты и гормонального фона. Представлены критерии оценки степени тяжести неинфекционных поражений печени у беременных, характеризующие выраженность основных патогенетических синдромов (цитоллиза, холестаза, гипербилирубинемии, их сочетаний) и алгоритм ведения беременных в III триместре, позволяющий выбрать оптимальную тактику ведения беременности. Содержатся данные о причинах и взаимосвязи нарушенной адаптации новорожденных от матерей с неинфекционной патологией печени.

Монография может быть использована врачами акушерами-гинекологами, терапевтами, гастроэнтерологами, инфекционистами, врачами общей практики, студентами медицинских вузов.