© О.Н.Береснева, В.В.Барабанова, 1999
УДК 611.36.018+611.149]:616.61-008.64-092.9

О.Н.Береснева, В.В.Барабанова

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ И ВОРОТНОЙ ВЕНЫ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

O.N.Beresneva, V.V.Barabanova

FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEPATOCYTES AND PORTAL VEIN OF RATS WITH EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL FAILURE

Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

Исследовали влияние экспериментальной хронической почечной недостаточности на функциональную активность гепатоцитов и авторитмическую сократительную активность воротной вены крыс после нефрэктомии. Установлено, что нефрэктомия (1 мес) повышает активность ферментов сукцинат-, $НАДН_2$- и $НАДФН_2$-дегидрогеназ гепатоцитов, щелочной фосфатазы микрососудов печени и сократительную активность воротной вены. Через 2 мес после нефрэктомии наблюдалось снижение активности ферментов сукцинатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы в печени и функциональной активности гладкомышечных клеток воротной вены. Отмечается существенная роль паратиреоидного гормона (ПТГ) в формировании этих функциональных изменений.

Ключевые слова: хроническая почечная недостаточность, гепатоциты, воротная вена, паратиреоидный гормон, кальций.

ABSTRACT

The aim of the work was to investigate the effect of experimental chronic renal failure on the functional activity of hepatocytes and activity of spontaneous phasic contractions of the portal vein in rats after nephrectomy. It has been shown that nephrectomy (1 month) increases activity of succinate-, NAD-H_2 and NADP-H_2-dehydrogenase in hepatocytes, alkaline phosphatase of the liver microvessels and spontaneous contractions of the portal vein. Nephrectomy (2 months) was shown to decrease activity of succinate dehydrogenase and alkaline phosphatase in the liver and contractile activity of the vascular smooth muscle cells of the portal vein. PTH plays a substantial role in these functional changes.

Key words: chronic renal failure, hepatocytes, portal vein, parathyroid hormone, calcium.

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) — сложный симптомокомплекс, вызываемый неспособностью почек адекватно поддерживать гомеостаз в организме. При развитии ХПН нарушаются практически все виды обмена. Нет органа, который бы не вовлекался в патологический процесс. Безусловно, каждый больной приходит к ХПН «своим путем» в зависимости от специфики первоначального почечного заболевания.

Среди факторов, доминирующих в развитии ХПН, исключительное место занимает нарушение клеточного метаболизма кальция. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о нескольких формах участия кальция в патогенезе ХПН. Существенную роль в этом процессе может играть вызванная увеличением внутриклеточной концентрации кальция активация фосфолипаз, которая приводит к деградации фосфолипидов мембран и последующему нарушению функции мембран, проницаемости.

Почки имеют важное значение в обеспечении гомеостаза кальция, регулируя метаболизм кальцийрегулирующих гормонов. В нормальных условиях кальцитонин и паратиреоидный гормон (ПТГ) непрерывно фильтруются в почечных клубочках, поступают из ультрафильтрата в клетки проксимальных канальцев, гидролизуются до аминокислот, которые всасываются в кровь для нового синтеза. Кроме того, почка продуцирует активную форму витамина D_3, получая с кровью из печени прогормон. Положение резко меняется при выходе из строя час-

ти действующих нефронов, например, при ХПН. Уменьшение массы функционирующей паренхимы почки приводит к снижению фильтрации гормонов, в частности, ПТГ, меньшей скорости их инактивации и накоплению в крови [6].

ПТГ является одним из регуляторов гомеостаза кальция в организме, но повышение содержания его в крови приводит к необратимым изменениям функции различных органов [6]. Токсическое действие гормона реализуется через изменение распределения кальция в клеточных депо и цитозоле в результате увеличения проницаемости мембран для ионизированного кальция [3, 8].

Учитывая тот факт, что печени, наряду с почками, принадлежит ключевая роль в расщеплении молекулы ПТГ, как в норме, так и при патологии [4], определенный интерес представляет исследование функциональной активности гепатоцитов и воротной вены (ВВ) у животных с экспериментальной уремией. В доступной нам литературе встречаются лишь единичные данные, касающиеся функции клеток печени при развитии ХПН [5, 7, 8]. Так, установлено, что ХПН приводит к снижению синтеза mPHK для альбумина [9] и глюконеогенеза [2] в гепатоцитах крыс. Но, в целом, изменения функции гепатоцитов при заболеваниях почек изучены недостаточно. Использование модельных исследований, в частности, моделирование ХПН на животных открывает дополнительные перспективы как для всестороннего изучения клеточных механизмов формирования патологического процесса, так и в отношении отработки методов фармакологической коррекции на разных этапах развития патологии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы 90 самцов крыс линии Wistar, которым в два этапа (с интервалом в 1 нед) была выполнена билатеральная резекция $^5/_6$ массы почки. С целью сохранения надпочечников, перед резекцией почки декапсулировали. Контролем служили ложнооперированные животные. Крыс забивали на 14-, 30-, 60-е сутки после операции. Исследование выполняли на препаратах ткани печени и воротной вены.

Извлеченные при забое кусочки печени помещали в раствор 10% нейтрального формалина, заливали в парафин и изготавливали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, реактивом Шиффа. Препараты исследовали на светооптическом уровне.

Параллельно блоки ткани печени замораживали в жидком азоте и изготавливали срезы, на которых выявляли сукцинатдегидрогеназу (СДГ), лактатдегидрогеназу (ЛДГ) по Нахлассу и Зелигману, $НАДН_2$- и $НАДФН_2$-дегидрогеназы с помощью реакции с тетранитросиним тетразолием и щелочную фосфатазу (ЩФ) методом азосочетания. Активность ферментов оценивали количественно прямым фотоэлектрическим способом на цитоспектрофотометре (МЦФ-У2) в перинуклеарных участках цитоплазмы гепатоцитов и в эндотелии микрососудов печени (ЩФ). Статистическую обработку осуществляли по программе «САНТАД» для математической обработки гистоэнзимологических данных [1].

После забоя у крыс также выделяли фрагменты ВВ и использовали для исследования авторитмической сократительной активности в изометрическом режиме с помощью механотрона. Одновременно с записью на диаграммной ленте самописца Н-227-I осуществляли регистрацию и последующую обработку сократительной активности ВВ на ЭВМ.

В полученных при забое образцах крови определяли мочевину, ионизированный кальций, радиоиммунологическим методом с использованием ПТН-С-К-комплекса -содержание ПТГ (табл. 1).

Результаты обрабатывали статистически с помощью критерия Стьюдента и корреляционного анализа.

Таблица 1

Показатели ($\bar{X}$±m) биохимии плазмы крови крыс, подвергнутых нефрэктомии

Группа животных	Показатели		
	Мочевина (ммоль/л)	Ca^{2+} (ммоль/л)	ПТГ (пг/мл)
Контроль (n=25)	5,4±0,24	1,15±0,03	60,0±18,5
Нефрэктомия:			
14 дней (n=17)	16,9±5,22*	1,10±0,01	107,7±9,7*
30 дней (n=15)	16,0±4,27*	0,81±0,02*	104,2±8,4*
60 дней (n=19)	16,7±2,18*	0,74±0,03*	168,7±12,5*

* Различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой (p<0,01).

Примечание. n — количество исследуемых в группе животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Светооптическое исследование препаратов ткани печени крыс, подвергнутых нефрэктомии (НЭ), показало, что уже на 14-е сутки после операции в печени животных обнаруживается активация клеток Купфера. В 20% случаев наблюдается расширение синусоидов, увеличивается количество двуядерных гепатоцитов. В 10% случаев регистрируется венозное полнокровие

сосудов. В срок 30–60 дней после НЭ (n=20) в печени практически всех животных регистрируются венозное полнокровие и расширение синусоидов печени, белковая зернистая дистрофия (рис. 1). К данным изменениям присоединяются некрозы гепатоцитов, как моноцеллюлярные, так и мелкоочаговые, а местами — сливающиеся. В перипортальных зонах на фоне умеренного фиброза определяется выраженная лимфомоноцитарная инфильтрация.

Количественный гистоэнзимологический анализ активности ферментов в перинуклеарных отделах цитоплазмы гепатоцитов крыс в различные сроки после НЭ выявил существенные изменения (табл. 2). Уменьшение массы функционирующих нефронов вызывало снижение активности ЛДГ и повышение активности $НАДФН_2$- и $НАДН_2$-дегидрогеназ на 14-, 30-, 60-е сутки. Так, активность $НАДН_2$-дегидрогеназы на 60-е сутки превышала контроль, в среднем, на 133%, а $НАДФН_2$-дегидрогеназы — на 64%. Активность СДГ характеризовалась двухфазным характером изменений. На 14-е и 30-е сутки активность фермента повышалась (на 30-е сутки, в среднем, на 69%, по сравнению с контролем), а на 60-е — снижалась (в среднем, на 22%).

Проведенный корреляционный анализ показал наличие прямых корреляционных связей между активностью ферментов СДГ, $НАДФН_2$- и $НАДН_2$-дегидрогеназ гепатоцитов и содержанием мочевины крови животных ($r=0,41$, $p<0,05$; $r=0,45$, $p<0,01$; $r=0,65$; $p<0,01$, соответственно) и обратной корреляционной связи между активностью фермента ЛДГ ($r=-0,49$, $p<0,01$) и мочевиной крови.

Активность ЩФ в эндотелии микрососудов печени крыс повышалась на 14-е и 30-е сутки после НЭ (на 31,8% и 18,8%, соответственно) и снижалась на 60-е сутки, в среднем, на 33,4% (рис. 2).

Таблица 2

Активность ферментов ($\bar{X}\pm m$) гепатоцитов крыс, подвергнутых нефрэктомии

Ферменты	Контроль	Нефрэктомия		
		14 дней	30 дней	60 дней
ЛДГ	25,1±1,2 (n=15)	16,2±0,9* (n=8)	17,2±1,1* (n=10)	18,1±1,3* (n=9)
СДГ	19,1±0,8 (n=15)	26,2±0,9* (n=8)	31,5±1,0* (n=9)	14,3±0,9* (n=9)
$НАДН_2$-дегидрогеназа	19,8±0,6 (n=14)	39,8±0,5* (n=8)	44,7±0,8* (n=10)	45,0±1,0* (n=9)
$НАДФН_2$-дегидрогеназа	19,6±0,7 (n=15)	32,1±1,1* (n=8)	24,3±0,6* (n=10)	29,7±0,8* (n=9)

* $p<0,05$ — различия достоверны в сравнении с контролем.

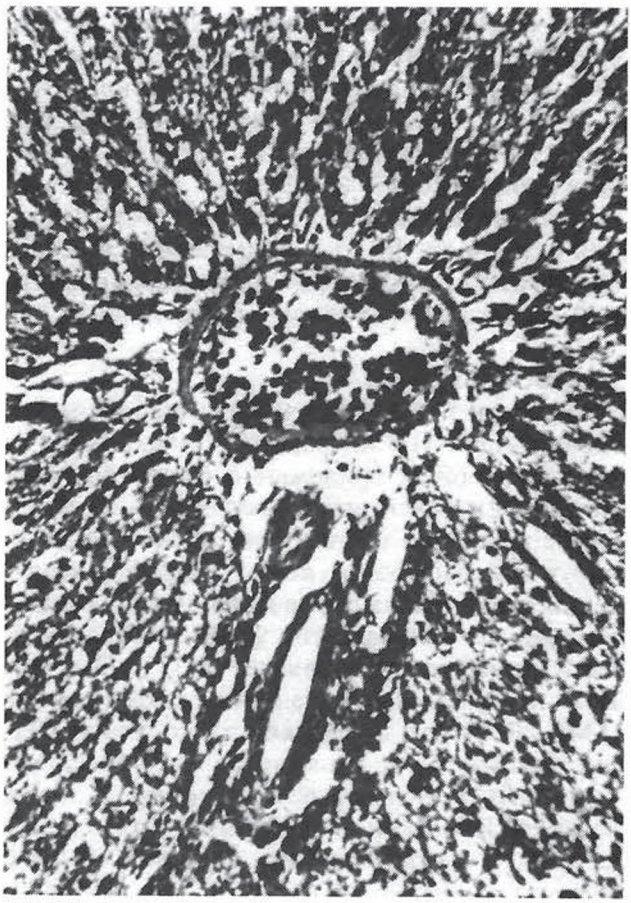

Рис. 1. Характер изменений в печени крыс на 30-е сутки после нефрэктомии: парез вен, агрегация эритроцитов и фибрина в их просветах.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Исследование авторитмической сократительной активности ВВ крыс, подвергнутых НЭ, выявило наличие двух фаз изменений сократительной активности. Через 14 дней после операции у животных сократительная активность ВВ изменялась незначительно. Но через

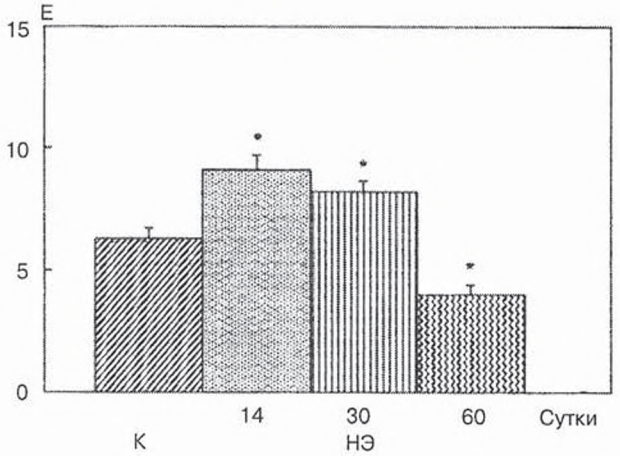

Рис. 2. Активность щелочной фосфатазы в эндотелии микрососудов печени крыс после нефрэктомии.

Е — активность фермента в относительных единицах оптической плотности; звездочки — различия достоверны ($p<0,01$) в сравнении с контролем.

1 мес после НЭ, наряду с увеличением частоты сокращений, регистрировалось увеличение общей амплитуды фазно-тонических сокращений и площади под кривой сокращений за 1 мин (характеризует выполняемую веной работу), по сравнению с контролем. Через 2 мес после НЭ отчетливо выявлялось снижение сократительной активности ВВ, т. е. отмечалось снижение общей амплитуды фазно-тонических сокращений и выполняемой веной работы (рис. 3).

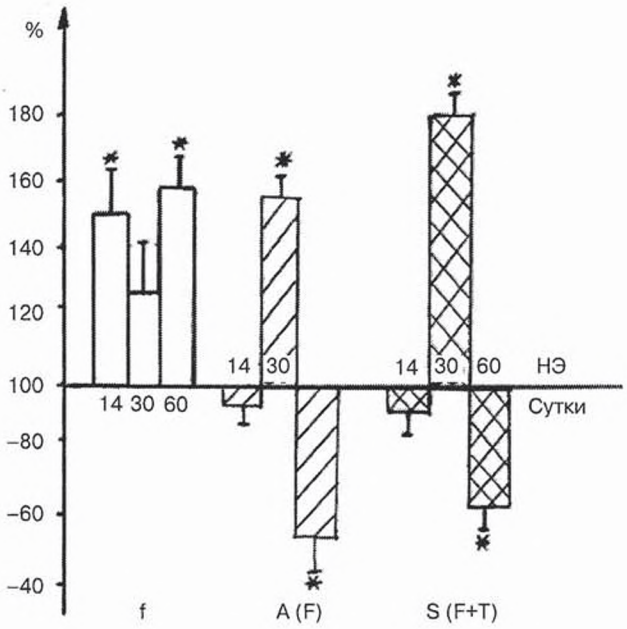

Рис. 3. Изменение частоты (f), амплитуды фазных сокращений [A(F)] и площади под кривой сокращений [S(F+T)] воротной вены за 1 мин у крыс, подвергнутых нефрэктомии.

Звездочки — различия достоверны ($p<0,01$) в сравнении с контрольными величинами, принятыми за 100%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поиски путей коррекции метаболических сдвигов при ХПН направлены прежде всего на выявление точек приложения физиологически активных и токсических факторов, поступающих в кровь при уменьшении массы функционирующей паренхимы почек. Среди основных регуляторов обмена ионов кальция в организме, оказавшихся при развитии уремии нефротоксинами, интерес представляет ПТГ. Действие ПТГ на гепатоциты, гладкомышечные клетки (ГМК) ВВ, как и на клетки других тканей, осуществляется через влияние на проницаемость клеточных мембран, увеличение входа ионов кальция. Изменение содержания цитозольного кальция в клетках сосудов и печени, в свою очередь, существенно влияет на их функциональную активность: вызывает первоначальную активацию ферментов СДГ, $НАДФН_2$- и $НАДН_2$-дегидрогеназ гепатоцитов, увеличивает сократительную активность ВВ. Последующее снижение (к 2 мес после НЭ) сократительной активности ГМК ВВ и активности СДГ гепатоцитов может быть следствием нарушения энергетической функции клеток, утилизации энергии. Очевидно, причиной этих нарушений являются процессы, происходящие в митохондриях вследствие перегрузки последних ионами кальция, приводящей к нарушению энергетической продукции. Именно избыток ионов кальция в митохондриях лежит в основе токсического действия ПТГ на клетки различных тканей. Последовательность процессов, которые приводят к росту уровня ионизированного кальция в гепатоцитах и сосудах при ХПН, представлена на схеме.

Повышение активности ЩФ в микрососудах печени, отмеченное нами в период гиперактивности ГМК ВВ, свидетельствует об активации трансэндотелиального транспорта. Возможно, в этот период повышается проницаемость сосудистой стенки и для воды, что приводит к развитию стаза и сладжа с последующим появлением микротромбов. Так как микротромбы обнаружены не только в системе портальной вены, но и печеночной, можно полагать, что при экспериментальной ХПН в печени крыс развиваются генерализованные нарушения гемодинамики. В период снижения трансэндотелиального транспорта и авторитмической сократительной активности ВВ количество микротромбов в сосудистом русле печени

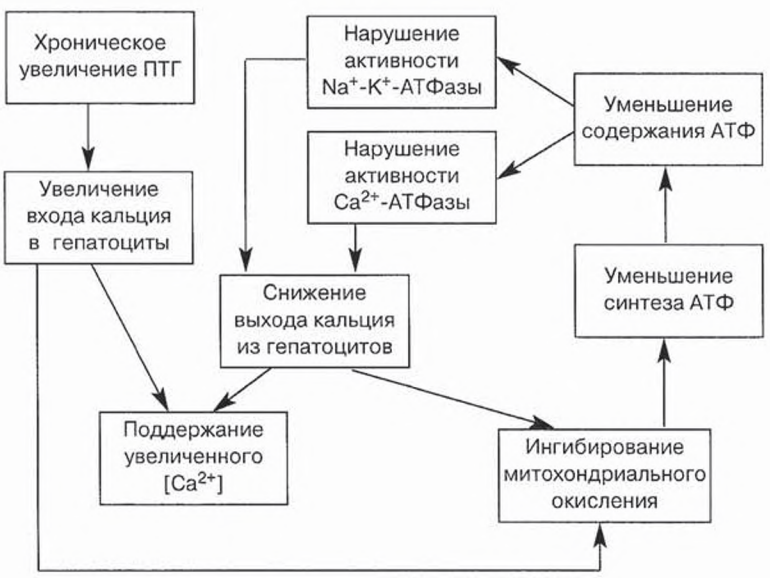

Схема процессов, приводящих к повышению базального уровня цитозольного кальция в гепатоцитах крыс с ХПН и вторичным гиперпаратиреозом.

возрастает. Не исключено, что появление микротромбов обусловлено прямым стимулирующим влиянием ПТГ на образование фибрина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что экспериментальная ХПН сопровождается существенным нарушением клеточной регуляции кальция в гепатоцитах и ГМК ВВ, приводя к стабильному увеличению уровня ионизированного кальция. Этот эффект опосредован повышением содержания ПТГ крови. Учитывая факт повышения концентрации ПТГ в крови при развитии ХПН, мы полагаем, что гормону принадлежит существенная роль в регуляции функциональной активности ВВ и гепатоцитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Равкин И.А. Некоторые методы математической обработки гистоэнзимологических данных // Введение в количественную гистохимию ферментов / Т.Б.Журавлева, Р.А.Прочуханов.—М.: Медицина, 1978.—С. 184–196.

2. Cans N., Catelloni F., Fontaine E. et al. Isolated rat hepatocytes metabolism is affected by chronic renal failure // Kidney Int.—1995.—Vol. 47.—P. 1522–1527.

3. Cheung J.J., Bonventre J.V., Malis C.D., Jeaf A. Calcium and ischemic injury // New Engl. J. Med.—1986.—Vol. 314, № 26.—P. 1670–1676.

4. Daugaard H. Metabolism of N-terminal and C-terminal parathyroid hormone fragments by isolated perfused rat kidney and liver // Endocrinology.—1994.—Vol. 143, № 3.—P. 1373–1381.

5. Klin M., Smogorzewski M., Ni Z. et al. Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: Role of the secondary hyperparathyroidism // J. Clin. Invest.—1996.—Vol. 97.—P. 2167–2173.

6. Massry S., Godstein D. Role of parathyroid hormone in uremic toxicity // Kidney Int.—1978.—Vol. 8.—P. 39–42.

7. Massry S.G., Klin M., Ni Z. et al. Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats // Kidney Int.—1995.—Vol. 48.—P. 1324–1331.

8. Massry S.G., Smogorzewski M. Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver // Kidney Int.—1997.—Vol. 52, Suppl.62.—P. S5–S7.

9. Yamanchi A., Imai E., Noguchi T. et al. Effect of chronic renal failure on the level of albumin messenger RNA // Metabolism.—1989.—Vol. 38.—P. 421–424.

Поступила в редакцию 14.09.99 г.