

УРОЛОГИЯ

УДК: 611.61.018

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОЧКИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО СМОДЕЛИРОВАННОЙ ТЕПЛОВОЙ ИШЕМИИ ПРИ ОПЕРАТИВНОМ ВМЕШАТЕЛЬСТВЕ

*С. В. Попов, Р. Г. Гусейнов, А. Н. Горшенин, К. В. Сивак,
П. К. Яблонский, О. Н. Скрябин, Т. И. Виноградова*

Клиническая больница Святителя Луки Городского центра эндоскопической урологии и новых технологий, Российская Федерация, 194044, Санкт-Петербург, Чугунная ул., 46

В настоящее время лапароскопическая резекция почки является «золотым стандартом» радикального лечения больных на стадии опухолевого роста T_{1-2a}. Одним из самых значимых факторов при этом является тепловая ишемия почки, ведущая к ишемическому и реперфузионному повреждению органа. В этой связи актуален вопрос разработки оптимального комплекса нефронсберегающих технологий и создания наиболее эффективного алгоритма действий до, во время и после оперативного вмешательства, сопряженного с ишемией почки. Ключевой проблемой в рамках данного алгоритма является выбор интервала времени пережатия почечной артерии при лапароскопической операции, не приводящего к необратимым изменениям в структурной и функциональной организации почки. С этой целью было выполнено экспериментальное исследование для уточнения максимально «безопасного» времени тепловой ишемии почки.

Результаты экспериментального исследования с привлечением возможностей электронной микроскопии показали, что почечный эпителий сохраняет жизнеспособность через исследованные интервалы в 30 и 60 мин. тепловой ишемии и претерпевает необратимые изменения клеточной организации через 90 минут ишемии. Таким образом, «точка невозврата» для почечного эпителия находится за пределами часового интервала острой тепловой ишемии. В сочетании с использованием эффективных нефропротективных фармакологических средств это значительно расширяет возможности современной лапароскопической хирургии почки. Библиогр. 17. Ил. 8.

Ключевые слова: тепловая ишемия почки, электронная микроскопия, почечный клубочек, лапароскопическая резекция почки, синдром ишемии-реперфузии.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF KIDNEY DURING EXPERIMENTALLY MODELED THERMAL ISCHEMIA

S. V. Popov, R. G. Guseinov, A. N. Gorshkov, K. V. Sivak, P. K. Yablonskiy, O. N. Skryabin, T. I. Vinogradova
St. Luka Clinical Hospital, 46, Chugunnaya ul., St. Petersburg, 194044, Russian Federation

Nowadays the laparoscopic kidney resection is a “gold standard” for treatment of tumor stages T_{1-2a}. One of the most important factors is kidney thermal ischemia leading to ischemic and reperfusion damage. It's of current importance to elaborate a nephron-sparing complex and create an effective algorithm for preoperative, operative and post-operative periods. The key problem is a choice of time interval for renal artery clamping during operation, which will not cause irreversible structural and

functional kidney changes. The purpose of this experimental study is a detection of maximum safe time of ischemia with morphologic verification via electronic microscopy.

Study results show that kidney epithelium keeps vitality in 30 minutes and 60 minutes of ischemia. In 90 minutes it has irreversible cells damage (necrosis). Therefore "the point of no return" for kidney epithelium is beyond one hour interval of thermal ischemia. In combination with effective pharmacologic protection this fact expands the opportunities of modern laparoscopic surgery. Refs17. Figs 8.

Keywords: kidney thermal ischemia, electronic microscopy, malpighian tuft, ischemia reperfusion syndrome.

В последние годы рак почки занимает одно из ведущих мест по темпам роста среди онкоурологических заболеваний и составляет 3% от всех злокачественных новообразований. Резекция почки является «золотым стандартом» радикального лечения на стадии опухолевого роста T_{1-2a}. Одним из самых значимых факторов при этом является тепловая ишемия почки с формированием ишемического и реперфузионного повреждения.

Для уточнения максимального по продолжительности «безопасного» времени тепловой ишемии почки при проведении органосберегающих лапароскопических операций исследованы ультраструктурные изменения различных сегментов нефрона на разных сроках экспериментально вызванной тепловой ишемии почки (30 мин, 60 мин, 90 мин). Установлено, что наиболее чувствительной к ишемии областью нефрона является проксимальный почечный каналец. В канальцевом эпителии наблюдается ряд ультраструктурных изменений, выраженность которых нарастает по мере увеличения периода острой тепловой ишемии (от незначительного набухания щеточной каймы через 30 мин до некроза и фрагментации большей части эпителиоцитов через 90 мин). В дистальных отделах нефрона наблюдается обструкция просвета нефрона хлопьевидным материалом и клеточным детритом через 60 и 90 мин ишемии. Таким образом, по полученным нами данным, «точка невозврата», соответствующая необратимому повреждению эпителиальных клеток, для эпителия проксимального канальца находится между 60 и 90 минутами тепловой ишемии.

Ишемическое повреждение почки сопряжено с различными патологическими состояниями, включающими системные нарушения кровообращения, инфекции и интоксикации. Период острой ишемии неизбежно присутствует при лапароскопических оперативных вмешательствах, связанных с лигированием почечной артерии. Ишемический острый канальцевый некроз, сопровождающийся острой почечной недостаточностью, бывает финалом при шоке, эмболии почечной артерии, пережатии аорты, искусственном кровообращении и при воздействии нефротоксических веществ, в том числе некоторых лекарственных препаратов. Некроз и апоптоз канальцевых эпителиоцитов при ишемии приводит к их слипанию и блокированию клеточным детритом узкой части нисходящей петли Генле, вызывая обратное попадание фильтрата в интерстиций почек.

Продолжительность и эффективность восстановления функции почек зависит от тяжести и длительности острой ишемии и составляет, в среднем, несколько недель [1].

Клеточные механизмы повреждения эпителия почечных канальцев при тепловой ишемии исследовались неоднократно [2, 3]. Ишемическое повреждение и, в итоге, некроз эпителиальных клеток вызываются рядом факторов. В их число

входит истощение пула АТФ, приводящее к дисфункции важнейших ферментативных систем и многочисленных белков-транспортеров в клетках канальцевого эпителия. Следствием этого оказываются нарушение регуляции клеточного объема, набухание цитоплазмы и разрыв клеточной мембраны.

Второй существенный фактор ишемического повреждения клеток почечного канальца — нарушение метаболизма внутриклеточного кальция, происходящее вследствие прекращения работы Са-АТФаз в плазматической мембране и в мембранах эндоплазматической сети. Кальций является одним из важнейших внутриклеточных мессенджеров. При ишемии в клетках почечных канальцев наблюдается резкий рост внутриклеточной концентрации кальция, приводящий к активации протеаз, деполимеризации цитоскелета, утрате поляризации и гибели эпителиальных клеток.

Наконец, при ишемии-реперфузии наблюдается резкое усиление синтеза реактивных форм кислорода, вызывающих перекисное окисление липидов мембран и повреждающих ДНК эпителиальных клеток почки.

В целом, несмотря на результаты уже проведенных исследований, посвященных механизмам повреждения структур почки при тепловой ишемии, остаются актуальными вопросы разработки оптимального комплекса нефронсберегающих технологий и создания наиболее эффективного алгоритма действий до, во время и после оперативного вмешательства, связанного с ишемией почки. Ключевой проблемой в рамках данного алгоритма является определение интервала времени, в течение которого пережатие почечной артерии при лапароскопической операции не приводит к необратимым изменениям в структурной и функциональной организации почки. В связи с этим для настоящего исследования была поставлена задача экспериментально уточнить максимально возможный интервал «безопасного» времени тепловой ишемии почки с морфологической верификацией результатов методом электронной микроскопии.

Материал и методы

Создание тепловой ишемии почки в эксперименте

Эксперименты выполнены в лаборатории экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России на 16 конвенциональных кроликах-самцах породы «Шиншилла» с массой тела 2,6–2,7 кг, полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Рапполово» (Ленинградская область). Кролики содержались в стандартных условиях вивария. Пищевой рацион их соответствовал требованиям действующего Приказа Минздрава СССР № 1179 от 10 октября 1983 г. «Нормативы затрат кормов для лабораторных животных» и Правилам, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г. (со свободным доступом к воде). Исследования проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS N 123» и Правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»).

Анестезиологическое пособие включало: препарат для анестезии — золетил (золозепам + тилетамин, Вирбак СА, Франция) в дозе 25 мг/кг массы тела (внутривенно в краевую ушную вену); миорелаксант — рометар (ксилазин, Биовет, Чехия) в виде 2%-ного раствора (внутримышечно в объеме 1,0–1,5 мл). Операционную стадию наркоза контролировали с помощью галотан-кислородной смеси.

Для моделирования ишемии почки первым этапом выполняли срединную лапаротомию, далее тупым и острым путем осуществляли доступ к почке; выделяли и скелетировали почечную ножку на всем протяжении. Затем на почечную артерию накладывали микрососудистый зажим (с временным интервалом в разных сериях в 30, 60 или 90 мин, после чего производили забор образцов ткани почки для электронно-микроскопического исследования.

Электронная микроскопия

Материалом для электронно-микроскопического анализа служили небольшие (2–3 мм) образцы ткани почки, полученные от животных контрольной группы (без ишемии), а также от кроликов на сроках 30 мин, 60 мин и 90 мин тепловой ишемии почки (по 4 животных в каждом случае).

Немедленно после забора образцы фиксировались в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего промывались в 3 сменах фосфатного буфера. Далее выполнялась постфиксация кусочков в 1%-ном растворе тетроксид осмия на том же буфере, при той же температуре, что и на предыдущем этапе, в течение 1 часа. После фиксации объекты обезжизивались в серии растворов этанола возрастающей концентрации (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %), пропитывались ацетоном и заключались в эпоксидную смолу Эпон.

Для электронно-микроскопического исследования на ультрамикротоме Leica UC7 получали ультратонкие срезы толщиной 50–70 нм. Срезы помещались на медные сетки для электронной микроскопии. Сетки со срезами контрастировались в спиртовом растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронно-микроскопическое исследование срезов выполнено с помощью микроскопа JEOL JEM 1011. Цифровые электронные микрофотографии получены при использовании камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

Результаты

Ультраструктура почки в контрольных условиях

Микроанатомия почки, а также ультраструктурная организация нефрона в норме неоднократно и подробно описана в литературе [4]. Полученные нами результаты соответствуют этим данным, поэтому ниже мы приводим только очень краткое описание ультраструктуры основных отделов нефрона, необходимое для анализа морфологических изменений при тепловой ишемии.

В состав нефрона входят почечный клубочек, проксимальный каналец, тонкая часть петли Генле (тонкое нисходящее и тонкое восходящее колена), толстое восходящее колена петли Генле, дистальный каналец и собирательная трубка.

Почечный клубочек окружен Боуеновой капсулой, сформированной плотной базальной мембраной и выстланной плоским однослойным (париетальным) эпителием. Внутри Боуеновой капсулы находится клубочек кровеносных капилляров. Стенки капилляров выстланы фенестрированным эндотелием с диаметром фенестр более 100 нм. Снаружи эндотелий капилляров окружен тонкой базальной мембраной и прилегающими друг к другу отростками подоцитов. Между отростками подоцитов имеются щелевые диафрагмы размером 50–60 нм, закрытые тонкой пленкой. В перикапиллярном пространстве Боуеновой капсулы локализованы также электронно-плотные мезангиальные клетки (рис. 1 *a*).

Клетки проксимального почечного канальца характеризуются прежде всего присутствием массы микроворсинок (щеточной каймы) на их апикальной поверхности и мембранными складками на базальной поверхности. Эти структуры

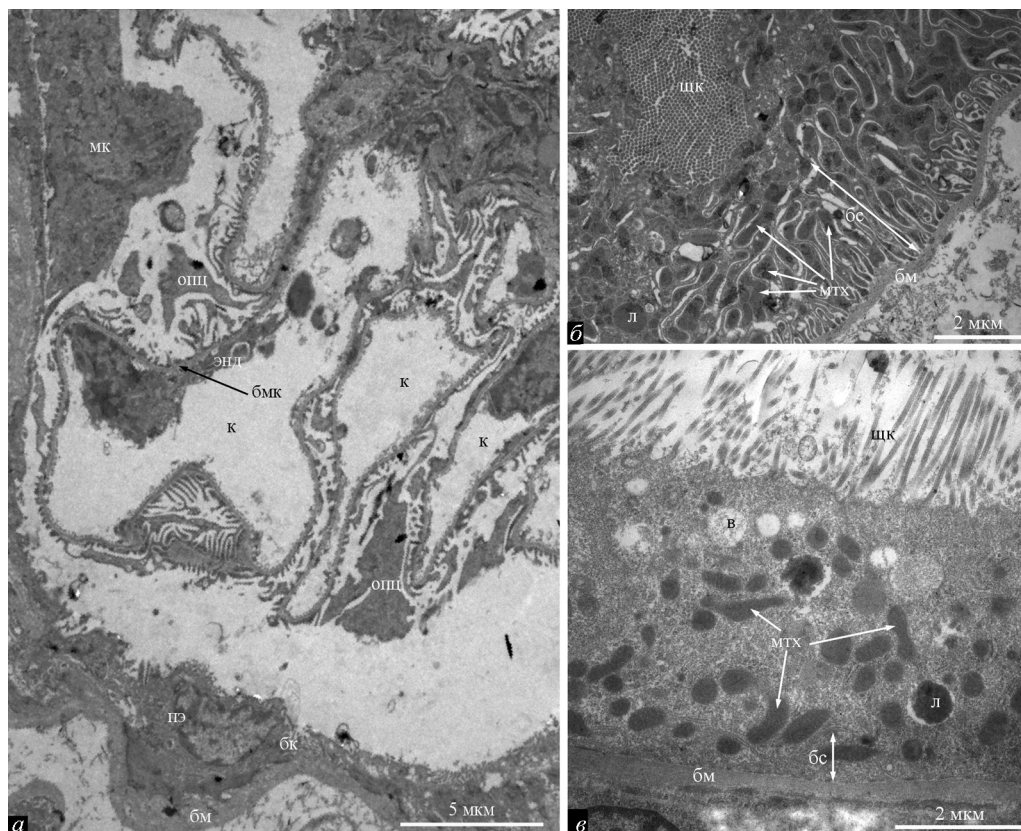


Рис. 1. Контроль. Ультраструктура почечного клубочка и проксимального канальца:

a — почечный клубочек; *б* — сегмент S1 проксимального канальца. Наблюдаются глубокие базальные складки, ассоциированные с крупными удлинненными митохондриями, щеточная кайма хорошо развита; *в* — сегмент S2 проксимального канальца. Глубина базальных складок значительно меньше чем в S1, щеточная кайма развита слабее, митохондрии меньше чем в S1 и имеют более округлую форму. Условные обозначения: *бк* — Боуенова капсула, *бм* — базальная мембрана, *пэ* — париетальный эпителий, *опц* — отростки подоцита, *к* — капилляры, *бмк* — базальная мембрана капилляра, *мк* — мезангиальная клетка, *щк* — щеточная кайма, *мтх* — митохондрии, *бс* — базальные складки, *л* — лизосомы, *в* — вакуоли.

обеспечивают увеличение площади клеточной поверхности, необходимое для локализации огромного количества мембранных транспортных белков. Апикальная область цитоплазмы содержит вакуоли различного размера. Базальные складки ассоциированы с многочисленными митохондриями. Высота эпителиального слоя и щеточной каймы, глубина базальной складчатости и размеры митохондрий варьируют в зависимости от сегмента проксимального канальца, однако вышеописанный общий план морфологической организации эпителиальных клеток прослеживается на всех участках проксимального канальца (рис. 1 б, в).

Тонкий отдел петли Генле представлен сильно уплощенными клетками, толщина которых в периферической части, в зоне межклеточных контактов, составляет всего 2–3 мкм. Клетки данной части нефрона характеризуются формированием небольших базальных складок, умеренным количеством мелких митохондрий в цитоплазме и выраженным развитием аппарата Гольджи, представленного многочисленными электронно-прозрачными везикулами и цистернами (рис. 2 а).

Клетки, выстилающие толстое восходящее колено петли Генле и дистальный извитой каналец, имеют сходную ультраструктуру. Это кубоидальные эпителиальные клетки высотой около 10 мкм. Базальная поверхность данных клеток формирует многочисленные глубокие складки, в которых располагаются крупные митохондрии, удлинённые до 4 мкм (рис. 2 б). На апикальной поверхности эпителиальных клеток дистальной части нефрона отсутствует щеточная кайма (можно обнаружить только отдельные низкие микроворсинки), что резко отличает ультраструктурную организацию данных клеток от клеток проксимального канальца.

Дистальный каналец продолжается связующим канальцем, открывающимся в собирательную трубку. Клеточная популяция эпителия собирательных трубок состоит из двух типов клеток, существенно различающихся по морфологической организации: основных и интеркалярных клеток (рис. 2 в). Более многочисленные основные клетки, осуществляющие реабсорбцию воды и натрия, имеют близкую к кубической форму, высотой 10–12 мкм. Для них характерна электронно-прозрачная цитоплазма, в которой неупорядоченно распределены митохондрии. В целом цитоплазма относительно бедна органоидами. Интеркалярные клетки, участвующие в регуляции системного кислотно-щелочного равновесия, имеют осмиофильную цитоплазму, заполненную массой электронно-плотных митохондрий. Резкие различия в электронной плотности позволяют легко идентифицировать две названные клеточные субпопуляции. Для интеркалярных клеток характерно присутствие большого количества везикул и вакуолей в апикальной зоне цитоплазмы [5].

Результаты 30-минутной тепловой ишемии

Результаты исследования ультратонких срезов после экспериментальной 30-минутной острой тепловой ишемии приводят к выводу о том, что при данном сроке отсутствия кровотока изменения клеточной организации невелики и затрагивают главным образом проксимальный почечный каналец. Наиболее выраженным морфологическим эффектом 30-минутной ишемии является частичное набухание микроворсинок щеточной каймы в виде небольших грушевидных утолщений на их концах (рис. 3 а, б). Стоит отметить, что, за исключением набухания концов, микроворсинки клеток проксимального канальца через 30 мин тепловой ишемии сохраняют свою нативную структуру. В частности, сохраняется целостность плазм-

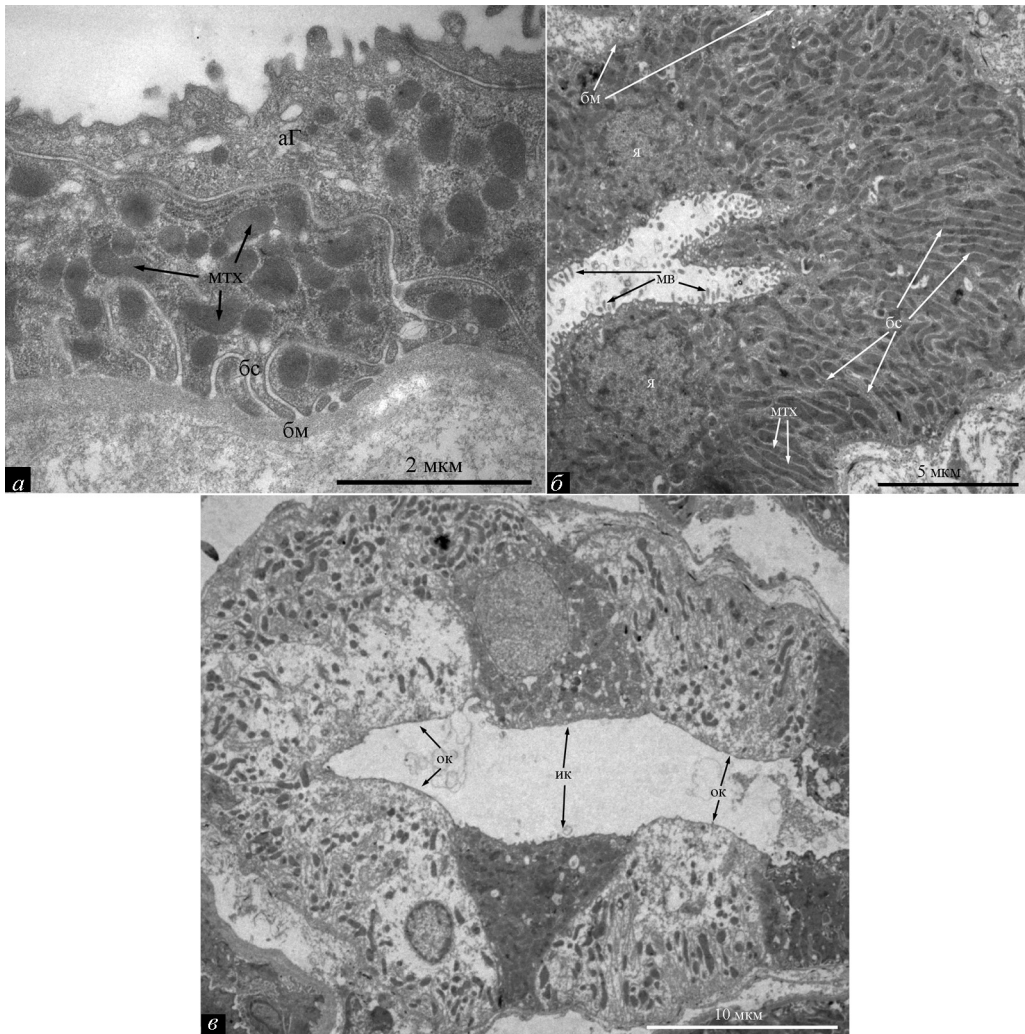


Рис. 2. Контроль. Ультраструктура дистальных сегментов нефрона:

а — тонкий отдел петли Генле; б — дистальный каналец; в — собирательная трубка. Условные обозначения: мтх — митохондрии, бс — базальные складки, аГ — аппарат Гольджи, бм — базальная мембрана, мв — микроворсинки, ик — интеркалярные клетки, ок — основные клетки.

матической мембраны микроворсинок и актинового цитоскелета в их основании (рис. 3 а). Ультраструктура органоидов цитоплазмы эпителиоцитов проксимального канальца на данном сроке ишемии не претерпевает существенных изменений по сравнению с контрольными условиями (рис. 3 б).

Ультраструктурная организация клеток дистального почечного канальца и собирательной трубки через 30 мин тепловой ишемии в целом также существенным образом не меняется по сравнению с контрольными условиями. Однако в некоторых случаях нами отмечено появление хлопьевидного материала средней электронной плотности в просвете дистальных канальцев и собирательных трубок (рис. 3 в, г).

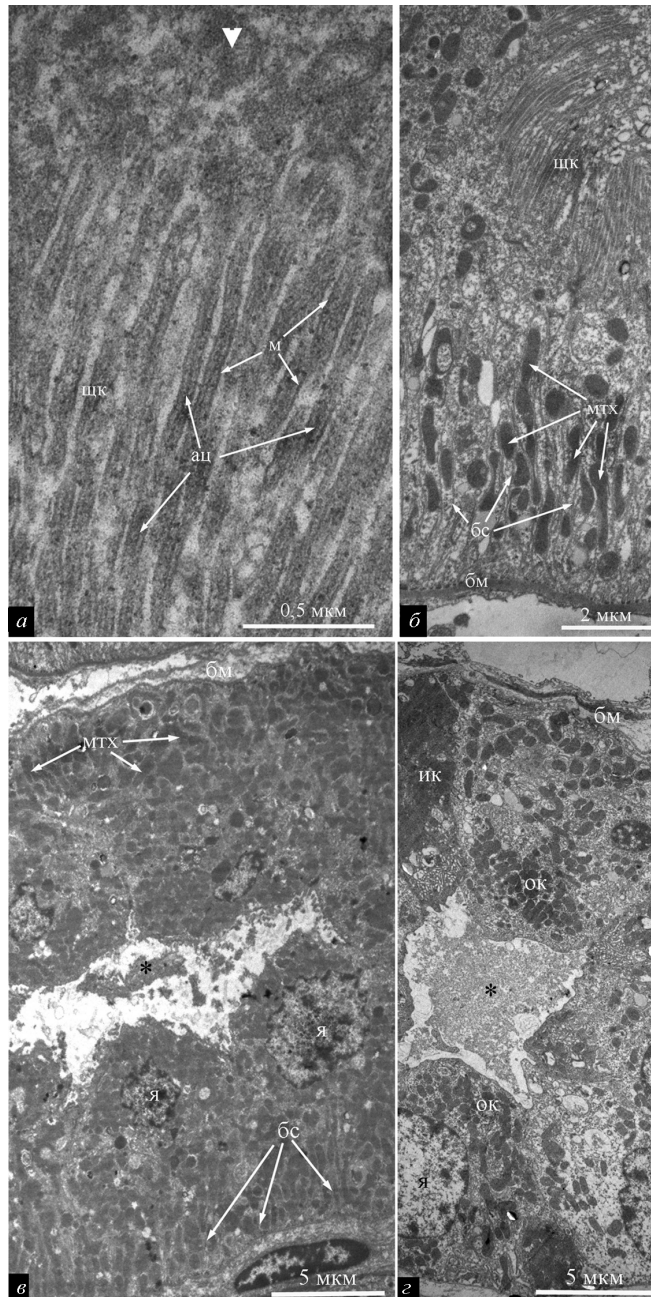


Рис. 3. 30 минут тепловой ишемии. Ультраструктура отделов нефрона:

а — проксимальный каналец. Видны грушевидные утолщения на концах микроворсинок щеточной каймы (голова стрелки); б — проксимальный каналец. Ультраструктура органоидов цитоплазмы эпителиальных клеток; в — дистальный каналец; г — собирательная трубка. Звездочка — хлопьевидные отложения в просвете дистального канальца и собирательной трубки. Условные обозначения: м — мембраны микроворсинок щеточной каймы, ац — актиновый цитоскелет микроворсинок щеточной каймы, щк — щеточная кайма, мтх — митохондрии, бс — базальные складки, бм — базальная мембрана, я — ядра эпителиальных клеток, ик — интеркалярные клетки, ок — основные клетки.

Результаты 60-минутной тепловой ишемии

Ультраструктурные изменения канальцевого эпителия почки после 60-минутной тепловой ишемии затрагивают главным образом проксимальный почечный каналец (как и после вышеописанной 30-минутной ишемии). Однако выраженность этих патологических изменений клеточной организации значительно больше, чем

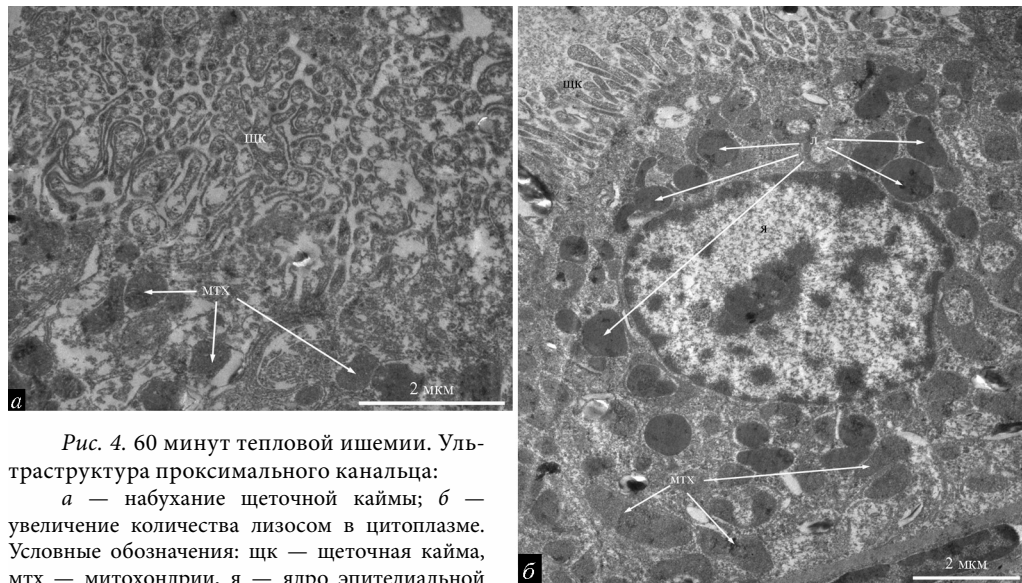


Рис. 4. 60 минут тепловой ишемии. Ультраструктура проксимального канальца:

а — набухание щеточной каймы; *б* — увеличение количества лизосом в цитоплазме. Условные обозначения: шк — щеточная кайма, мтх — митохондрии, я — ядро эпителиальной клетки, л — лизосомы.

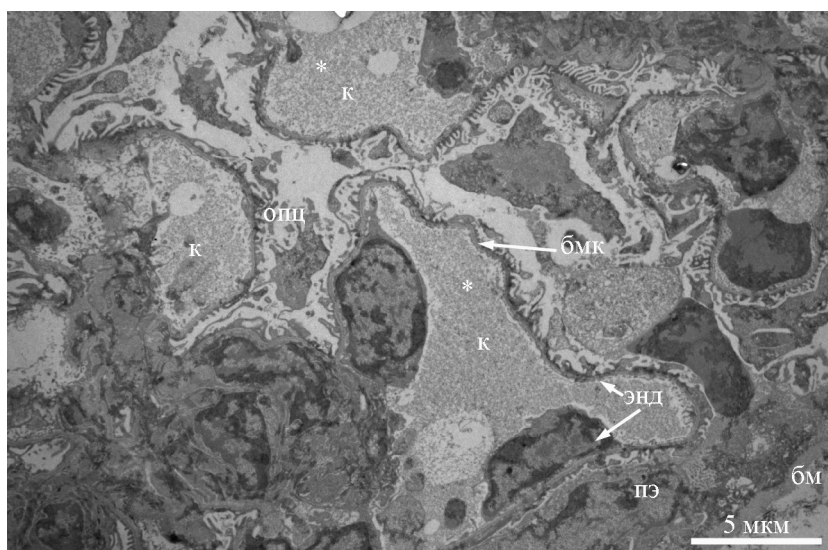


Рис. 5. 60 минут тепловой ишемии. Ультраструктура почечного клубочка.

Звездочка — отложения в просвете капилляров. Условные обозначения: бм — базальная мембрана, пэ — париетальный эпителий, опц — отростки подоцита, к — капилляры, бмк — базальная мембрана капилляра, энд — эндотелий капилляра.

при 30 минутах тепловой ишемии. В частности, набухание микроворсинок щеточной каймы наблюдается не только на концах, но и по всему объему микроворсинок. Пучки микрофиламентов в основаниях микроворсинок в основном деполимеризованы. На ультратонких срезах видоизмененные микроворсинки выглядят преимущественно округлыми пузыревидными структурами диаметром до 0,3 мкм (рис. 4а). В просвете многих проксимальных канальцев через 60 мин тепловой ишемии обнаруживаются хлопьевидные отложения. Обращает на себя внимание заметное возрастание количества лизосом в цитоплазме клеток проксимального канальца (рис. 4б). По-видимому, это может быть связано с активацией процессов аутофагии органоидов, поврежденных гипоксией.

Влияние 60-минутной ишемии на ультраструктурную организацию других сегментов нефрона обнаруживается слабее, чем в проксимальном канальце. В частности, в клубочках наиболее выраженным результатом 60-минутной ишемии является заполнение просвета капилляров агрегированным гомогенным материалом. Нужно отметить, что при этом ультраструктура клеток, формирующих клубочек (эндотелий, подоциты), не претерпевает каких-либо очевидных (глубоких) изменений (рис. 5).

В собирательных трубках через 60 мин тепловой ишемии обнаруживается значительное набухание основных клеток, нередко приводящее к частичному или полному закрытию просвета собирательной трубки (рис. 6а). Набухание клеток, очевидно, является результатом нарушения функционирования АТФ-зависимой системы регуляции клеточного объема. В некоторых случаях в апикальной области цитоплазмы возникают крупные вакуоли диаметром до 3 мкм. В просвете со-

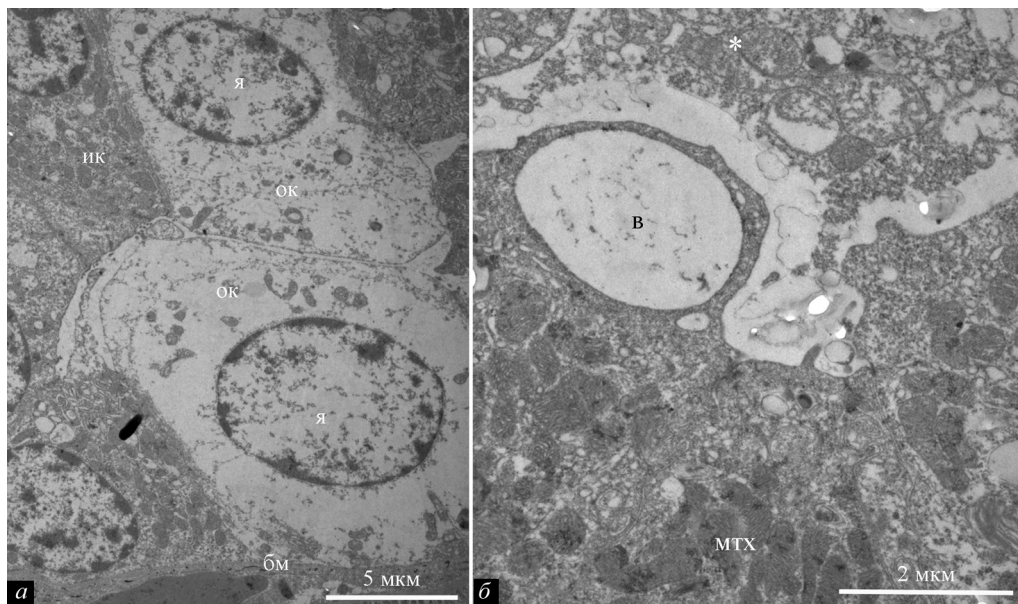


Рис. 6. 60 минут тепловой ишемии. Ультраструктура собирательной трубки:

а — набухание основных клеток, закрытие просвета собирательной трубки; б — вакуоль в апикальной области цитоплазмы, клеточный дебрис в просвете собирательной трубки (звездочка). Условные обозначения: бм — базальная мембрана, ик — интеркалярные клетки, ок — основные клетки, я — ядра эпителиальных клеток, mtx — митохондрии, в — вакуоль.

бирательной трубки встречается хлопьевидный материал, агрегированный с клеточным дебрисом — разрушенными мембранными органоидами, митохондриями и т. п. (рис. 6 б).

Таким образом, несмотря на ряд ультраструктурных изменений, большинство эпителиальных клеток различных отделов нефрона после 60 мин тепловой ишемии в целом выглядит жизнеспособными. Так, сохраняются ассоциация клеток с базальной мембраной и целостность эпителиального слоя. Поддерживается целостность плазматической мембраны и мембран клеточных органоидов (ядра, митохондрий, структур лизосомального компартмента). Хроматин в ядрах также сохраняет свою нативную структуру.

Результаты 90-минутной тепловой ишемии

Результаты 90-минутной тепловой ишемии почки, в отличие от таковых после менее продолжительной ишемии, демонстрируют необратимые морфологические изменения эпителиальных клеток проксимального канальца. На ультратонких срезах обнаруживается резко выраженное набухание канальцевого эпителия, затрагивающее как щеточную кайму, так и собственно цитоплазму клеток. Цитоплазма становится электронно-прозрачной (рис. 7 а). В клетках часто встречаются крупные вакуоли (рис. 7 б). Цитоскелет в значительной мере деполимеризован. Во многих случаях наблюдается картина разрыва плазмолеммы и выхода фрагментов некротизированной клетки в просвет проксимального канальца с обнажением соответствующего участка базальной мембраны (рис. 7 в, г).

Клетки дистальных участков нефрона обнаруживают большую устойчивость к повреждающему действию 90-минутной ишемии, чем проксимальных. В частности, клетки тонкого отдела петли Генле (рис. 8 а) и собирательных трубок (рис. 8 б) через 90 минут ишемии не имеют каких-либо катастрофических ультраструктурных изменений. В данных отделах нефрона при 90-минутной ишемии, как и при менее значимых сроках тепловой ишемии, отмечены частичное закрытие просвета канальца, появление в просвете хлопьевидных агрегатов и компонентов клеточного детрита. Наблюдается также обструкция околоканальцевых капилляров плотными сгустками эритроцитов.

Обсуждение результатов

Органосберегающая лапароскопическая техника операций на почке, впервые введенная в практику в 1992 г. [6], завоевывает все более широкую популярность. Очевидными преимуществами данного вида вмешательства, по сравнению с традиционной нефрэктомией, являются малая инвазивность, минимальная кровопотеря, ранняя реабилитация в послеоперационном периоде и повышение качества жизни в отдаленном периоде [7].

Факторы привлекательности органосберегающей тактики:

1. Увеличение числа опухолей почек, диагностируемых на ранних стадиях опухолевого роста, локализованных как на периферии, так и в любом другом сегменте.
2. Рост выживаемости больных на ранних стадиях заболевания после органосохраняющих операций.

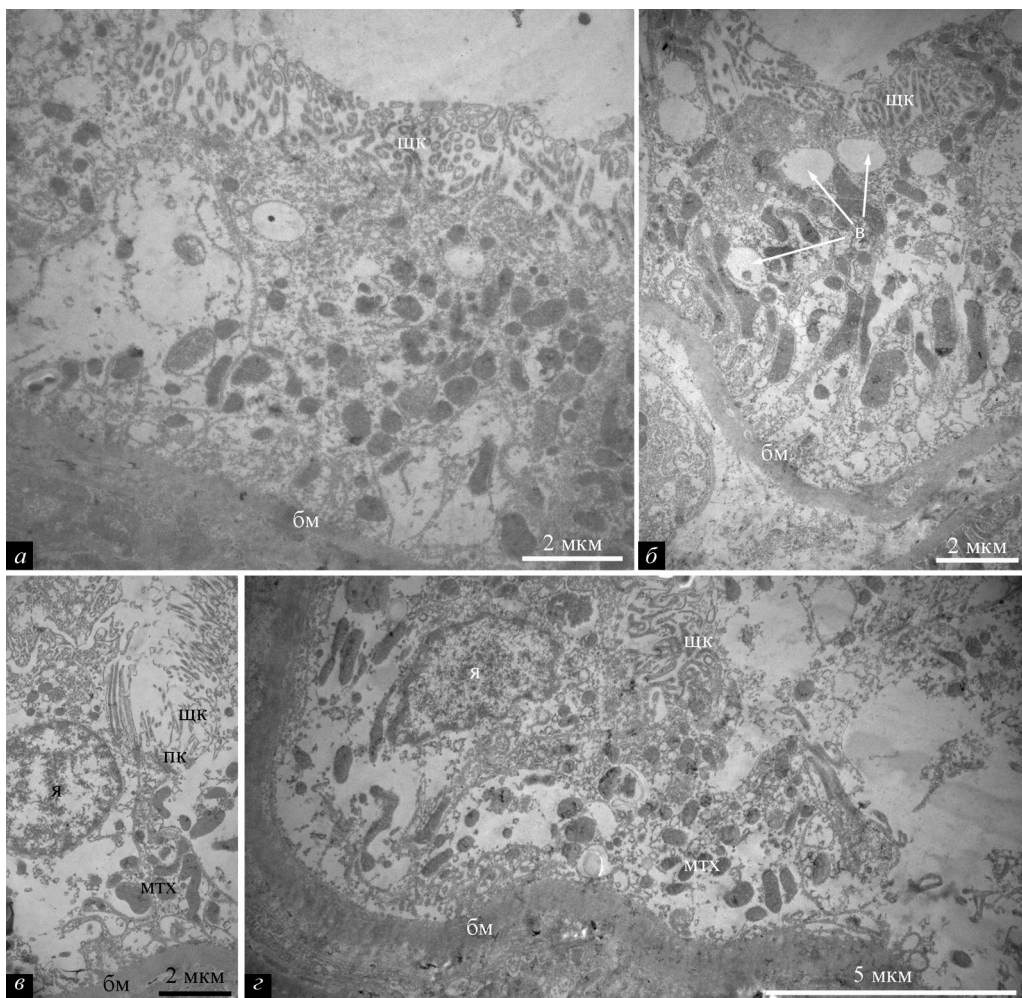


Рис. 7. 90 минут тепловой ишемии. Ультраструктура проксимального канальца:

а — общий вид клеток; *б* — вакуолизация цитоплазмы; *в, г* — некротизированные эпителиальные клетки, освобождающиеся в просвет почечного канальца. Условные обозначения: бм — базальная мембрана, шк — щеточная кайма, мтх — митохондрии, пк — плотный контакт, я — ядра эпителиальных клеток, в — вакуоли.

3. Опухоли, размерами менее 4 см, зачастую оказываются доброкачественными, в связи с чем проведение нефрэктомии в этих случаях не оправдано.

4. Проработанность оперативной техники органосохраняющих операций, что позволяет свести к минимуму число осложнений или избежать их полностью.

5. Наличие четких критериев для расширения показаний к выполнению органосохраняющих операций при опухолях почки в стадии опухолевого роста T1b (экстраренальный рост и наличие четкой капсулы).

Нужно подчеркнуть, что одним из ключевых моментов в ходе выполнения лапароскопической операции является временное прекращение кровотока в оперируемой почке, т. е. пережатие почечной артерии. При этом длительность ишемии — важнейший фактор, определяющий прогноз восстановления функции почки.

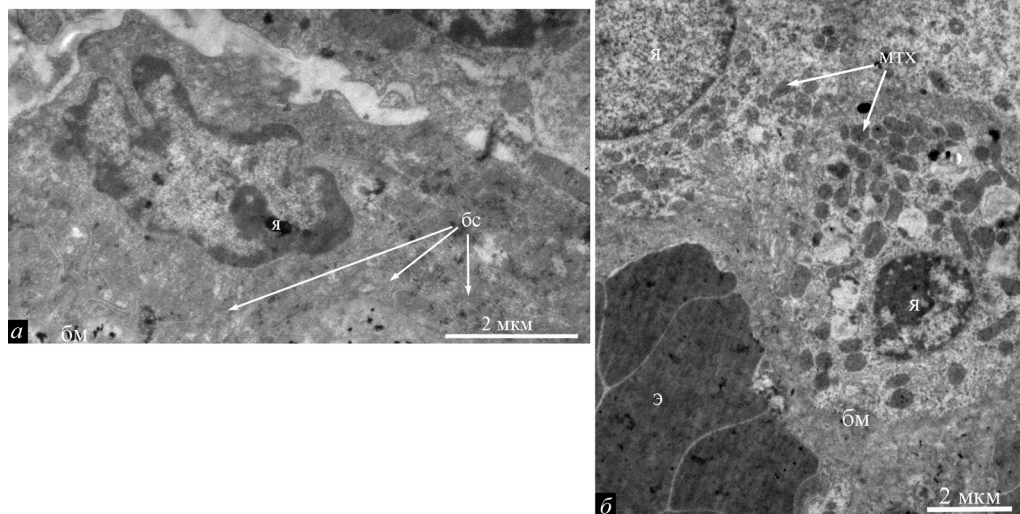


Рис. 8. 90 минут тепловой ишемии. Ультраструктура дистальных сегментов нефрона:

а — тонкий отдел петли Генле, *б* — собирательная трубка. Звездочка — клеточный дебрис в просвете собирательной трубки. Условные обозначения: бс — базальные складки, бм — базальная мембрана, я — ядра эпителиальных клеток, э — эритроциты, мтх — митохондрии, ик — интеркалярные клетки, ок — основные клетки.

По единому мнению исследователей, 20–30-минутная тепловая ишемия в ходе операции является приемлемой и не представляет существенной угрозы для нарушения фильтрационной функции почек [8, 9, 10]. В отношении более продолжительных сроков ишемического стресса мнения расходятся. В то время как одни авторы считают превышение вышеназванного периода времени тепловой ишемии почки абсолютно недопустимым и фатальным для ее функции [11], другие полагают возможным увеличение этого интервала до 55–60 минут, что, разумеется, значительно расширяет возможности оперирующего хирурга [12].

В нашем исследовании мы проанализировали ультраструктурную организацию почки через 30 мин, 60 мин и 90 мин ишемии. Полученные нами результаты показывают, что при экспериментально вызванной тепловой ишемии почки в клетках эпителия нефрона наблюдается ряд ультраструктурных изменений, выраженность которых увеличивается по мере возрастания периода острой тепловой ишемии.

По нашим данным, наиболее чувствительной к ишемии частью нефрона является проксимальный почечный каналец. По-видимому, это связано с тем, что мембрана клеток проксимального канальца содержит наибольшее среди всех сегмен-

тов нефрона количество АТФ-зависимых транспортных белков. Ишемия вызывает быстрое истощение пула АТФ в данных клетках, результатом чего оказываются их осмотическое набухание, фрагментация митохондрий, разборка цитоскелета с последующим нарушением целостности плазматической мембраны и некроз клеток. В целом клетки проксимального канальца сохраняют жизнеспособность через исследованные нами интервалы в 30 и 60 мин тепловой ишемии. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными в литературе гистологическими и ультраструктурными наблюдениями [13, 14]. Через 90 мин ишемии значительная часть эпителиоцитов проксимального канальца претерпевают необратимые изменения клеточной организации (некроз). Следовательно, необратимое повреждение дифференцированных эпителиальных клеток для эпителия проксимального канальца происходит между 60 и 90 мин ишемии.

Клетки других сегментов нефрона менее чувствительны к ишемическому шоку, чем клетки проксимального канальца. Даже через 90 мин тепловой ишемии большинство клеток канальцевого эпителия дистальных сегментов нефрона не обнаруживает морфологических признаков необратимых патологических изменений и клеточной гибели. Наиболее выраженными изменениями в петле Генле, дистальном канальце и собирательной трубке оказываются закупорка просвета канальца набухшими телами эпителиальных клеток, хлопьевидными агрегатами и клеточным детритом, а также агрегация эритроцитов в перитубулярных кровеносных капиллярах. Хлопьевидные агрегаты в просвете нефрона, очевидно, являются агломерациями полимеризованного белка Тамма—Хорсфалла, секретируемого в толстом отделе петли Генле и способного к образованию гелей при изменении уровня натрия в моче [15]. Обструкция нефронов наряду с гибелью канальцевых клеток безусловно является существенным фактором в снижении функциональных характеристик почки при остром ишемическом стрессе. Формирование сгустков эритроцитов в капиллярах является дополнительным препятствием для быстрого восстановления нормальной гемодинамики в почке при прекращении ишемического стресса и вносит свой вклад (совместно с синтезом реактивных форм кислорода) в клеточную гибель при постишемической реперфузии почки.

Нужно отметить, что эпителий нефрона имеет значительный регенерационный потенциал, направленный на восстановление эпителиальных клеток после ишемии. В частности, в литературе недавно была описана популяция малодифференцированных клеток-предшественников в составе проксимального канальца [16]. Эти клетки локализуются преимущественно в базальной области эпителиального слоя, имеют сниженный уровень метаболизма по сравнению со зрелыми эпителиоцитами и, следовательно, более устойчивы к ишемическому стрессу. Повидимому, именно их деление служит источником восстановления эпителиального пласта и замещения некротизированных клеток. Кроме того, существуют предположения о возможной дедифференцировке и последующем активном митотическом делении зрелых эпителиальных клеток, выживших при ишемическом стрессе [17].

Таким образом, по нашим ультраструктурным данным, «точка невозврата» для почечного эпителия находится за пределами часового интервала острой тепловой ишемии. В сочетании с использованием эффективных нефропротективных фармакологических средств это значительно расширяет возможности современной органосохраняющей лапароскопической хирургии почки.

References

1. Desai M., Gill I., Ramani A., Spaliviero M., Rybicki L., Kaouk J. *The impact of warm ischaemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. BJU Int.* 2005. Vol. 95, pp. 377–383.
2. Weinberg J.M. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int.*, 1991, vol. 39, pp. 476–500.
3. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J. Amer. Soc. Nephrol.*, 2006, vol. 17, pp. 1503–1520.
4. Vinnichenko L. N. Comparative ultrastructure of nephron. *J. Nauka*, 1980. 136 p.
5. Verlander J.W. Normal ultrastructure of the kidney and lower urinary tract. *Toxicol. Pathol.*, 1998, vol. 26, pp. 1–17.
6. Winfield H. N., Donovan J. F., Godet A. S., Clayman R. V. Laparoscopic partial nephrectomy: initial case report for benign disease. *J. Endourol.*, 1993, vol. 7, p. 521–526.
7. Gill I. S., Matin S. F., Desai M. M., Kaouk J. H., Steinberg A., Mascha E., Thornton J., Sherief M. H., Strzempkowski B., Novick A. C. Comparative analysis of laparoscopic versus open partial nephrectomy for renal tumors in 200 patients. *J. Urol.*, 2003, vol. 170, pp. 64–68.
8. Gill I. S., Colombo J. R. Jr., Moinzadeh A., Finelli A., Ukimura O., Tucker K., Kaouk J., Desai M. Laparoscopic partial nephrectomy in solitary kidney. *J. Urol.*, 2006, vol. 175, pp. 454–458.
9. Porpiglia F., Renard J., Billia M., Musso F., Volpe A., Burrini R., Terrone C., Colla L., Piccoli G., Podio V., Scarpa R. M. Is renal warm ischemia over 30 minutes during laparoscopic partial nephrectomy possible? One-year results of a prospective study. *Eur. Urol.*, 2007, vol. 52, pp. 1170–1178.
10. Thompson R. H., Lane B. R., Lohse C. M., Leibovich B. C., Fergany A., Frank I., Gill I. S., Blute M. L., Campbell S. C. Every minute counts when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy. *Eur. Urol.*, 2010, vol. 58, pp. 340–345.
11. Becker F., Van Poppel H., Hakenberg O. W., Stief C., Gill I., Guazzoni G., Montorsi F., Russo P., Stöckle M. Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy. *Eur. Urol.* 2009. 56: 625 – 635.
12. Bhayani S. B., Rha K. H., Pinto P. A., Ong A. M., Allaf M. E., Trock B. J., Jarrett T. W., Kavoussi L. R. Laparoscopic partial nephrectomy: effect of warm ischemia on serum creatinine. *J. Urol.*, 2004, vol. 172, pp. 1264–1266.
13. Donohoe J. F., Venkatachalam M. A., Bernard D. B., Levinsky N. G. Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations. *Kidney Int.*, 1978, vol. 13, pp. 208–222.
14. Tirapelli L. F., Barione D. F., Trazzi B. F. M., Tirapelli D. P. C., Novas P. C., Silva C. S., Martinez M., Costa R. S., Tucci S. Jr., Suaid H. J., Cologna A. J., Martins A. C. P. Comparison of two models for evaluation histopathology of experimental renal ischemia. *Transplant. Proc.*, 2009, vol. 41, pp. 4083–4087.
15. Wangsiripaisan A., Gengaro P. E., Edelstein C. L., Schrier R. W. Role of polymeric Tamm—Horsfall protein in cast formation: Oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int.*, 2001, vol. 59, pp. 932–940.
16. Hansson J., Hultenby K., Cramnert C., Pontén F., Jansson H., Lindgren D., Axelson H., Johansson M. E. Evidence for a morphologically distinct and functionally robust cell type in the proximal tubules of human kidney. *Hum. Pathol.*, 2014, vol. 45, pp. 382–393.
17. Humphreys B. D., Czerniak S., Dirocco D. P., Hasnain W., Cheema R., Bonventre J. V. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, pp. 9226–9231.

Статья поступила в редакцию 28 января 2016 г.

Контактная информация:

Попов Сергей Валерьевич — доктор медицинских наук, профессор; doc.popov@gmail.ru
Гусейнов Руслан Гусейнович — врач уролог; rusfa@yandex.ru
Горшенин Андрей Николаевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;
angorsh@yahoo.com
Сивак Константин Владимирович — заместитель директора по научной работе, кандидат биологических наук; kvsivak@gmail.com.
Яблонский Петр Казимирович — доктор медицинских наук, профессор; piotr.yablonskii@mail.ru
Скрябин Олег Николаевич — доктор медицинских наук, профессор; scrubabin_55@mail.ru
Виноградова Татьяна Ивановна — доктор медицинских наук, профессор;
vinogradova@spbniif.ru

Popov Sergey V. — MD, Professor; doc.popov@gmail.ru
Huseynov Ruslan G. — urologist; rusfa@yandex.ru

Gorshenin Andrey N. — PhD, Senior researcher; angorsh@yahoo.com
Sivak Konstantin V. — PhD, Deputy Director for Science; kvsivak@gmail.com
Jablonski Peter K. — MD, Professor; piotr.yablonskii@mail.ru
Skryabin Oleg N. — MD, Professor; scrubabin_55@mail.ru
Vinogradova Tatiana I. — PhD, Professor; vinogradova@spbniif.r