

УДК 616.61—008.9—089.843

Е. И. Цыбуляк, Н. М. Петрунь, Г. Г. Никулина, А. Т. Носов

ПОКАЗАТЕЛИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПОЧЕК, КОНСЕРВИРОВАННЫХ БЕСПЕРФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАММА-ОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

Приживляемость и функционирование трансплантата во многом зависит от сохранения жизнеспособности изолированного органа до операции, поэтому совершенствование способов консервации является одной из наиболее важных задач трансплантологии.

При пересадке донорской почки от трупа больным в терминальной стадии хронической почечной недостаточности наибольшее применение получили консервирующие солевые растворы интрацеллюлярного типа. Показано [3], что при длительной первичной тепловой ишемии и гипотермической консервации в специальных растворах в донорских почках происходят необратимые изменения, обусловленные нарушением целостности клеточных мембран и локализованных в них биохимических процессов.

Для профилактики ишемических повреждений и сохранения жизнеспособности изолированного органа представляется целесообразным использовать в составе консервантов стабилизаторы клеточных мембран. В этом плане наибольший интерес для исследователей представляет гамма-оксимасляная кислота, действие которой связано с предотвращением перекисного окисления липидов и накопления свободных радикалов, вызывающих нарушение проницаемости клеточных мембран, набухание и лизис субклеточных образований при развитии тепловой ишемии [6].

Для изучения влияния гамма-оксимасляной кислоты на жизнеспособность консервируемой донорской почки с учетом первичной тепловой ишемии проводили комплексные морфологические и биохимические исследования, включающие анализ электронномикроскопической структуры митохондрий, интенсивности процессов окислительного фосфорилирования при использовании в качестве субстратов окисления интермедиатов цикла Кребса и пировиноградной кислоты, активности окислительно-восстановительных ферментов.

Методика исследований

Проведено четыре группы исследований на 30 кроликах. В I группе почки, изолированные тотчас после забоя животного, перфузировали и помещали на 12 ч в гипотермический (+2°С) консервирующий раствор Шумакова по [6] без добавления гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК). Во II группе исследуемые изолированные почки подвергали действию тепловой ишемии, для чего их оставляли в трупе животного на 45 мин, поскольку ранее нами было установлено [3], что 45 мин первичная тепловая ишемия граничит с наступлением необратимых изменений в переживающем органе. Ишемические почки извлекали и консервировали в течение 12 ч в растворе Шумакова без ГОМК. В III и IV опытных группах условия были такими же, как и в I и II группах, за исключением того, что консервация почек производилась в растворе Шу-

макова с добавлением 8—10 мл 10% раствора ГОМК в расчете на 1 л. Контролем служили данные, полученные на свежеизолированных почках кроликов.

Ультраструктуру митохондрий изучали электронномикроскопически по общеизвестной методике Паллада с заливкой материала в эпоксидные смолы. Интенсивность окислительного фосфорилирования определяли в корковом слое почек с помощью газометрического метода [5]. Скорость процессов окисления и фосфорилирования выражали в $\mu\text{моль О}$ и Р в расчете на 1 мг сухого веса ткани за 30 мин инкубации при 37° С. Активность сукцинат-НАДФ-зависимой, изоцитрат- и α -кетоглутаратдегидрогеназ определяли по методу Нордмана в модификации [4] и выражали в $\mu\text{кг}$ диформазана, образовавшегося за 1 ч в расчете на 1 мг влажной ткани; активность малатдегидрогеназы — по [7] и выражали в $\mu\text{кмоль}$ субстрата за 1 мин в расчете на 1 мг влажной ткани; активность лактатдегидрогеназы — по [8] и выражали в $\mu\text{кмоль}$ субстрата за 1 мин в расчете на 1 мг влажной ткани. Полученные результаты обрабатывали статистически [2].

Результаты исследований и их обсуждение

В I группе опытов в клетках коркового слоя свежеизолированных почек, консервированных в растворе интрацеллюлярного типа без добавления ГОМК, отмечались явления выраженной гидропической дистрофии с набуханием митохондрий, просветлением их матрикса и очаговой десквамацией и вакуолизацией крист (рис. 1).

Таблица 1

Активность окислительно-восстановительных ферментов в корковом слое изолированных почек кролика после тепловой ишемии и 12 ч гипотермической консервации в растворе Шумакова с добавлением гамма-оксимасляной кислоты

Исследуемые ферменты	Контроль	12 ч консервации в растворе Шумакова без ГОМК		12 ч консервации в растворе Шумакова с ГОМК	
		до тепловой ишемии	45 мин первичной тепловой ишемии	до тепловой ишемии	45 мин первичной тепловой ишемии
	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6
Изоцитратдегидрогеназа	$2,0 \pm 0,06$	$0,96 \pm 0,08^*$	$0,90 \pm 0,03^*$	$1,40 \pm 0,06^*$	$1,2 \pm 0,06^*$
α -кетоглутарат-дегидрогеназа	$2,2 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,08^*$	$0,90 \pm 0,08^*$	$2,1 \pm 0,15$	$1,90 \pm 0,1$
Сукцинатдегидрогеназа	$3,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1^*$	$1,90 \pm 0,2^*$	$3,0 \pm 0,25$	$2,9 \pm 0,11$
Малатдегидрогеназа	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,024 \pm 0,02^*$	$0,06 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,07$
Лактатдегидрогеназа	$0,28 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,06^*$	$0,26 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,09$

Примечание. * — статистически достоверно по сравнению с контролем.

Данные представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что активность митохондриальных ферментов α -кетоглутарат-, сукцинат- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в почечной ткани снизилась на 50—60 % по сравнению с нормой. Незначительно уменьшилась активность малатдегидрогеназы. Несмотря на угнетение большей части исследуемых ферментов, их активность, видимо, была достаточной для поддержания реакций аэробного превращения интермедиатов в цикле Кребса с утилизацией атомарного кислорода. Из табл. 2, содержащей показатели окислительного фосфорилирования, видно, что при добавлении в инкубационную среду таких субстратов окисления, как лимонная и α -кетоглутаровая кислоты, скорость поглощения кислорода гомогенатом ткани (ΔO) сохранялась на уровне контроля, а при добавлении янтарной, яблочной и пировиноградной кислот — несколько превышала

Уровень окислительного фосфорилирования в корковом слое изолированной почки
содержащем гамма-оксимасляную кислоту (ΔO и ΔP мкатамах)

Субстраты окисления кислоты	Статистические показатели	Контроль			12 ч консервации в до тепловой ишемии		
		ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O
	n						
Янтарная	M	0,26	0,65	2,50	0,31*	0,25*	0,90
	$\pm m$	0,02	0,04		0,03	0,01	
Лимонная	M	0,26	0,57	2,19	0,22	0,24*	1,0
	$\pm m$	0,01	0,02		0,02	0,02	
Яблочная	M	0,29	0,74	2,55	0,41*	0,25*	0,60
	$\pm m$	0,01	0,02		0,02	0,02	
α -кетоглутаровая	M	0,31	0,68	2,19	0,29	0,27*	0,90
	$\pm m$	0,03	0,02		0,03	0,02	
Пировиноградная	M	0,16	0,29	1,81	0,24*	0,13*	0,50
	$\pm m$	0,01	0,01		0,01	0,01	

Примечание. * — статистически достоверно по сравнению с контролем.

его. Вместе с тем значительно снижался процесс аккумуляции энергии, высвобождаемой при окислении, о чем свидетельствовали более низкие, чем в норме, показатели скорости убывания неорганического фосфора (ΔP) из инкубационной среды: ΔP была меньше контроля при использовании в качестве субстрата окисления сукцината на 38 %, цитрата — на 42 %, малата — на 34 %, α -кетоглутарата — на 40 % и пировата — на 45 %. Коэффициенты P/O имели значения в два раза ниже своих первоначальных, что позволило думать о снижении степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования и уменьшении энергетической эффективности утилизации кислорода в исследуемых почках. Гликолитические процессы при этом, видимо, не нарушались, о чем свидетельствовала довольно высокая активность лактатдегидрогеназы.

Во II серии опытов в корковом слое почек после 45 мин первичной тепловой ишемии и последующей 12 ч гипотермической консервации в растворе Шумакова без добавления ГОМК, происходили более грубые деструктивные изменения. На электронограмме митохондрий видны нарушенные наружные и внутренние оболочки, вакуолизация и фрагментация крист, резкое просветление матрикса (рис. 2). Биохимические данные, будучи созвучными с морфологическими, подтверждали представление, что переживание изолированной почкой первичной тепловой ишемии в значительной степени снижает эффективность гипотермической консервации. Со стороны исследуемых НАД-зависимых ферментов отмечалось угнетение малатдегидрогеназной активности на 50 % по сравнению с контролем, а также более низкий уровень изоцитрат- и α -кетоглутаратдегидрогеназы по сравнению с I группой. Сукцинатдегидрогеназа тоже была в значительной степени подавлена по сравнению с нормой, однако, в отличие от НАД-зависимых дегидрогеназ, уровень ее был более высокий, чем в консервированных почках I группы, не претерпевавших действия первичной тепловой ишемии.

Таблица 2

кролика после тепловой ишемии и 12 ч консервации в растворе Шумакова, О и Р на 1 мг сухого веса ткани за 30 мин при 37 °С)

растворе Шумакова без ГОМК			12 ч консервация в растворе Шумакова с ГОМК					
45 мин тепловой ишемии			до тепловой ишемии			45 мин тепловой ишемии		
ΔО	ΔР	Р/О	ΔО	ΔР	Р/О	ΔО	ΔР	Р/О
	6			6			6	
0,34	0,18*	0,51	0,30	0,57	1,66	0,29	0,48*	1,65
0,01	0,02		0,03	0,05		0,01	0,01	
0,15*	0,17*	1,13	0,32*	0,54	1,72	0,30*	0,44*	1,46
0,01	0,01		0,02	0,01		0,06	0,01	
0,28	0,19*	0,68	0,35	0,63*	1,90	0,29	0,47*	1,63
0,02	0,01		0,09	0,06		0,01	0,01	
0,19*	0,27*	1,92	0,26	0,51*	2,00	0,41*	0,67	1,58
0,03	0,02		0,08	0,03		0,01	0,01	
0,22*	0,08*	0,25	0,26	0,33	1,91	0,20	0,34*	1,75
0,02	0,02		0,05	0,01		0,05	0,02	

Как показано [1, 5], активизация сукцинатдегидрогеназы имеет важное компенсаторное значение для органов при неблагоприятных условиях. Прежде всего, это связано с использованием эндогенной янтарной кислоты, которая, благодаря высокой скорости окисления, дает больший энергетический выход по сравнению с НАД-зависимыми субстратами, поддерживая тем самым энергетический потенциал клетки. Все это согласуется с полученными нами данными, характеризующими дыхательную активность ткани при наличии разных субстратов окисления. Так, при использовании янтарной кислоты скорость поглощения кислорода тканью достоверно превышала исходный уровень. Показатели ΔО при аэробном превращении НАД-зависимых субстратов окисления — лимонной, яблочной, α-кетоглутаровой и пировиноградной кислот были ниже, чем при использовании сукцината, и по сравнению с I группой имели тенденцию к еще большему понижению.

Аналогично с I группой, во II группе опытов в ишемических почках, консервированных без ГОМК, фосфорилирующая способность утрачивалась скорее, чем окислительная. ΔР по своей величине составила всего лишь 30 % нормы. Коэффициенты Р/О, хотя и были значительно ниже контрольных, но по сравнению с I группой динамика их отличалась разнонаправленностью, а именно: при использовании в качестве субстратов окисления сукцината и пирувата отношение Р/О уменьшалось, а при использовании лимонной, яблочной и α-кетоглутаровой кислот — повышалось. Можно предположить, что повышение Р/О было связано с необходимостью более «жесткой» экономии кислорода при гипоксии и более высокой энергетической эффективностью использования его в процессах окислительного фосфорилирования на разных стадиях превращения интермедиатов в цикле Кребса. Параллельно происходило снижение скорости гликолиза, о чем свидетельствовало уменьшение лактатдегидрогеназной активности почти в два раза по сравнению с нормой. Таким образом, все это свидетельствовало

о том, что переживание донорской почкой первичной тепловой ишемии и гипотермической консервации в растворе Шумакова без ГОМК в значительной степени снижает ее биоэнергетические возможности, а следовательно и жизнеспособность.

В III серии опытов в свежеизолированных почках после консервации в растворе Шумакова с добавлением ГОМК изменения ультраструктуры митохондрий носили несущественный характер и были аналогичны описанным нами ранее для почек I группы — свежеизолированных и консервированных без ГОМК. Отмечалась высокая ферментативная активность почечной ткани. Сукцинат-, α -кетоглутарат и малатдегидрогеназа колебались в пределах контроля, а изоцитратдегидрогеназа лишь немного снижалась по сравнению с ним. Окислительное фосфорилирование характеризовалось таким же, как и в норме, уровнем окисления и фосфорилирующей способностью ткани, которая сохранялась на высоте контроля при использовании янтарной, лимонной и пировиноградной кислот, а при использовании яблочной и α -кетоглутаровой — была заметно больше по сравнению с почками I группы, консервированными без ГОМК. Сопряженность процессов окисления и фосфорилирования также была более прочной в III группе по сравнению с I группой. Активность лактатдегидрогеназы соответствовала норме, что в определенной мере указывало на отсутствие патологических изменений гликолиза.

Как и следовало ожидать, в IV группе в почках, подвергнутых действию первичной тепловой ишемии, после консервации с ГОМК наблюдалось снижение биоэлектрических показателей по сравнению с наблюдаемыми в почках III группы, также консервированных с ГОМК, но не подвергнутых ишемии. Это выражалось прежде всего меньшей интенсивностью фосфорилирования, уменьшением коэффициента Р/О и тенденцией к убыванию активности окислительно-восстановительных ферментов.

Однако при сравнении с ишемическими почками II группы, консервированными без ГОМК, эти изменения были не столь существенны. А именно, в IV группе по сравнению со II группой показатели ΔP были больше на 60—70 %, а степень сопряженности Р/О в отдельных случаях — на 50 %. Повышение активности изоцитрат- и сукцинат дегидрогеназ в среднем составило 30 %, а малат- и α -кетоглутаратдегидрогеназ — 50 %. Лактатдегидрогеназная активность соответствовала норме, в то время, как во II группе она была ниже на 42 %.

Описанные биохимические изменения в почках IV группы согласовались с данными электронномикроскопических исследований, которые подтвердили сохранность структур митохондриального аппарата, где отмечались лишь очаговая деструкция и некоторая их вакуолизация (рис. 3).

Выводы

1. Сохранение изолированных почек в растворе Шумакова без добавления ГОМК сопровождается угнетением биоэнергетических процессов и основных окислительно-восстановительных ферментов цикла Кребса.
2. При переживании органом первичной тепловой ишемии снижается эффективность гипотермической консервации.
3. Добавление гамма-оксимасляной кислоты способствует улучшению консервирующих свойств раствора Шумакова, что выражается в стабилизации интенсивности процессов окислительного фосфорилиро-

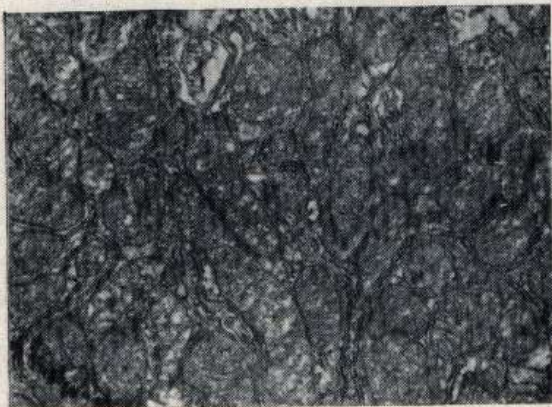


Рис. 1. Электронограмма коркового слоя почек кролика после 12 ч консервации в растворе Шумакова без добавления гамма-оксимасляной кислоты.

Набухание митохондрий. Просветление матрикса. Очаговая дискомплексация и вакуолизация крист. $\times 10\ 000$.



Рис. 2. Электронограмма коркового слоя почки кролика после 45 мин первичной тепловой ишемии и 12 ч консервации в растворе Шумакова без гамма-оксимасляной кислоты.

Выраженные деструктивные изменения митохондриального аппарата. Разрушение мембран и крист митохондрий. Резкое просветление матрикса. $\times 16\ 000$.

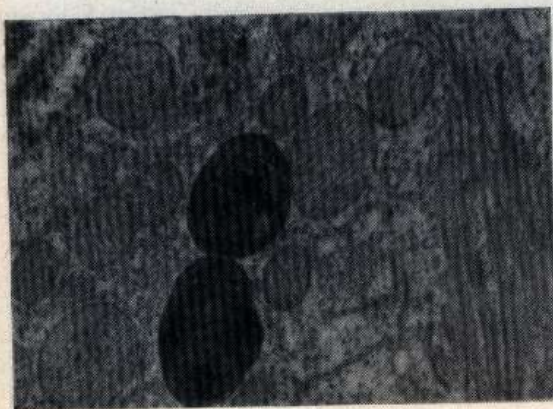
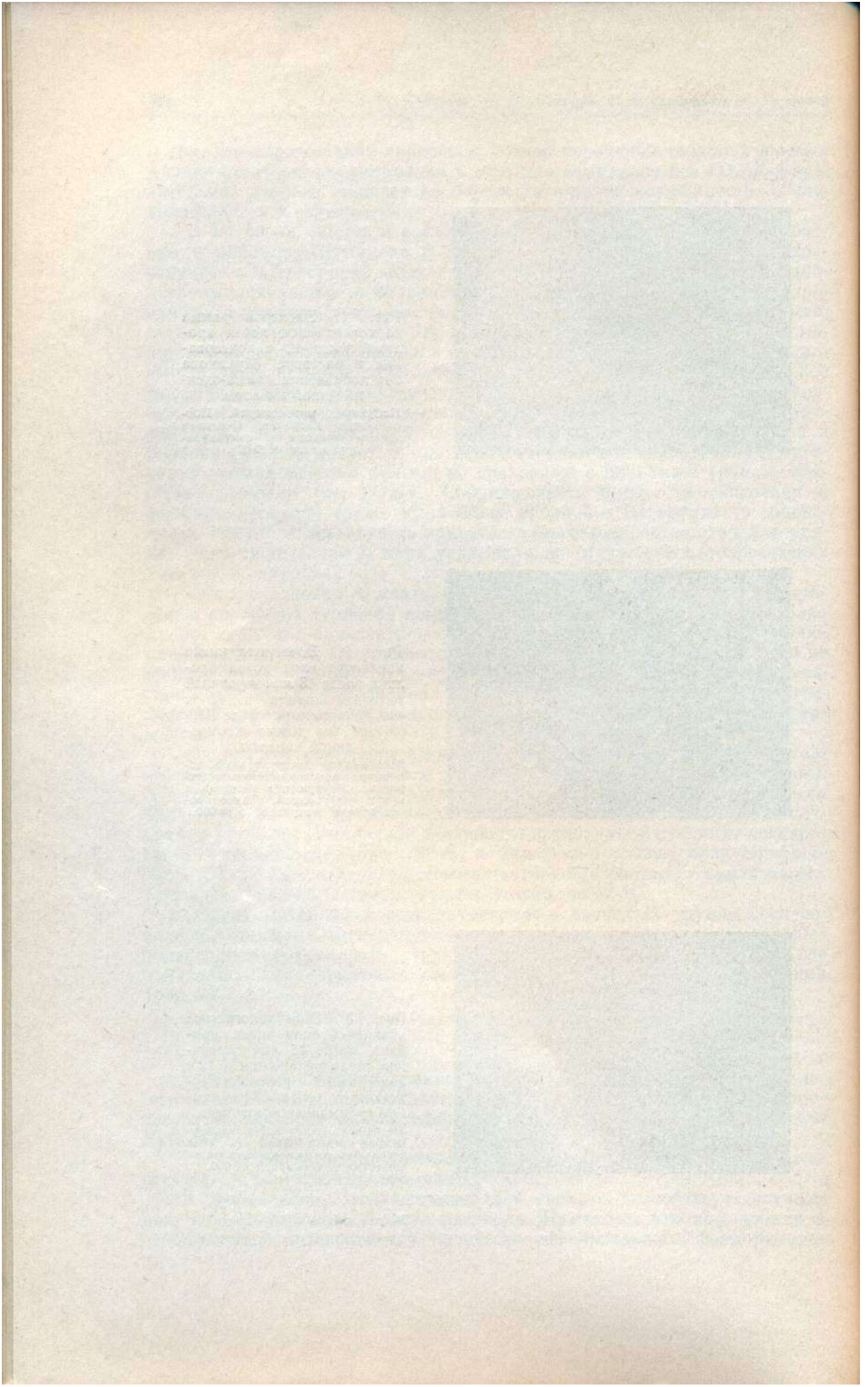


Рис. 3. Электронограмма коркового слоя почек кролика после 45 мин первичной тепловозой ишемии и 12 ч консервации в растворе Шумакова с добавлением гамма-оксимасляной кислоты.

Умеренно выраженная гипертрофия митохондрий за счет отека без выраженных дистрофических изменений. $\times 16\ 000$.



вания, активности ферментов и сохранности структуры митохондриального аппарата, что особенно отчетливо проявляется при консервации почек, подвергнутых действию тепловой ишемии.

Литература

1. Кондрашова М. Н. Выяснение и наметившиеся вопросы на пути исследования регуляции физиологического состояния янтарной кислотой.— В кн.: Терапевтическое действие янтарной кислоты. Пушино, 1976, с. 8—30.
2. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований — Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1960, № 4, с. 76—85.
3. Петрунь Н. М., Мацуй В. И., Носов А. Т., Никулина Г. Г., Цыбуляк Е. И. Сопоставление морфологических и биохимических показателей жизнеспособности почки донора в различные сроки первичной тепловой ишемии.— Урология и нефрология, 1977, № 4, с. 63—67.
4. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. Активность некоторых дегидрогеназ цикла Кребса в мозге, печени и почках.— Вестник ЛГУ, 1969, 21, Биология, в. 4, с. 112—116.
5. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи.— М., 1962.— 250 с.
6. Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Штенгольд Е. Ш., Крылова А. И., Филиппов П. Я. Безперфузионный метод консервации почек с помощью специального раствора.— Хирургия, 1974, № 9, с. 114—118.
7. Wacker W. S. C., Ulmer D. D., Vallec B. L. Metalloenzymes and myocardial infarction II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum.— New. Eng. J. Med., 1956, 255, p. 449—456.
8. Wroblewski F., La Due J. S. Lactic dehydrogenase in blood.— Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 90, N 1, p. 210—213.

Киевский институт урологии

Поступила в редакцию
1.III 1978 г.

E. I. Tsibulyak, N. M. Petrun, G. G. Nikulina, A. T. Nosov

BIOENERGETIC STATE OF ISOLATED KIDNEYS CONSERVED BY NONPERFUSED METHOD WITH γ -HYDROXYBUTYRIC ACID APPLICATION

Summary

The electron-microscopic mitochondrial structure, intensity of the oxidative phosphorylation processes, malate, succinate, isocitrate, α -ketoglutarate and lactate dehydrogenase activities were studied in the cortical layer of isolated rabbit kidneys after 45 min ischemic period and 12-hour conservation in an intracellular type solution with γ -hydroxybutyric acid and without it. It is shown that bioenergetic figures were the highest at cases when the solution containing γ -hydroxybutyric acid was used for conservation.

Institute of Urology, Kiev