

2006-140

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ХИРУРГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

На правах рукописи
УДК 615.832.97:616-089.843:591.461.1/2] 001.6.

АБДЫКЕРИМОВА КУЛМИРА БЕЛГОЖОЕВНА

**КРИОБИОХИМИЯ И МОРФОМЕТРИЯ
ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА**

14.00.27 – Хирургия

14.00.16 – Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Бишкек 2006

Работа выполнена в проблемной лаборатории клинической и экспериментальной хирургии Национального хирургического центра Министерства здравоохранения Кыргызской Республики.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Ашимов И.А.
доктор медицинских наук, профессор Тухватшин Р.Р.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук Мусаев А.И.
доктор медицинских наук, профессор Аралбаев Т.А.

Ведущая организация: Кыргызско-Российский Славянский университет им. Б.Н. Ельцина.

Защита диссертации состоится «14» февраля 2006 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д14.05.271 при Национальном хирургическом центре Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (720044, г. Бишкек, ул. 3-я Линия, д.25).

Автореферат разослан «В. январе» 2006 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук



А.А. Сопуев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Безусловно, проблема длительной консервации изолированных органов является одной из актуальных проблем трансплантологии [А.М.Белоус и соавт.,1987; Danielewicz R., Kwiatkowski A., Wszola M.,2001]. Проблема, прежде всего, заключается в том, что, несмотря на достигнутые успехи, даже наиболее современные и эффективные методы консервации пока не могут обеспечить длительного и эффективного сохранения функциональной активности изолированного донорского органа [Б.А.Константинов и соавт., 1993; Berardinelli L., Beretta C., Raiferi M.,2001].

На сегодня, почти единственное исключение составляет криоконсервация на фоне которой наступает полная обратимая остановка метаболизма в них [А.М.Голдовский, 1986; Corsini J., Hacker C., Varg S., 2004]. Указанный метод позволяет, по мнению ряда исследователей, практически неограниченное время хранить биологические объекты, с обеспечением их жизнеспособности и функциональной активности [В.И.Луговой,1985; Baust J.M., Vogel M.J., Van Buskirk R.,2001]. Однако, есть свои проблемы в криоконсервации и одно из них – это отсутствие четких критериев жизнеспособности биологических объектов на фоне замораживания органов [Н.В.Репин и соавт., 1983; Erkasap S., Ates E.,2000].

В указанном аспекте, определенную надежду ученые возлагают на криобиохимию и морфометрию, с помощью можно судить о глубинных механизмах влияния низких и сверхнизких температур на клетки и ткани, что, по их мнению, позволяют выявить глубину и тяжесть структурных повреждений в них [П.Ф.Литвицкий, 2003].

Другая проблема заключается в смягчении процесса холодовой агрессии при криоконсервации [Н.С.Пушкарь и соавт.,1984]. В этом аспекте, актуальность разработки криопротекторов обусловлена тем, что известные методы криоконсервации пока еще далеки от совершенства, именно по причине прямого холодового воздействия на структуры клеток и тканей [В.П.Скрипков и соавт.,1984]. В этом плане, некоторые авторы возлагают надежду на различные вещества направленного действия, обладающие защитным криопротекторным действием при криоконсервации [Danielewicz R., Kwiatkowski A., Wszola M.,2001].

Цель работы: Совершенствовать криопротекторную защиту почечного трансплантата в целях сохранения его жизнеспособности и функциональной активности, а, следовательно, профилактики реперфузионных его повреждений.

Задачи исследования:

1. Изучить биохимию почечного трансплантата после криоконсервации.

2. Провести сравнительный анализ результатов криофилактической эффективности глицерина и глицерина с добавлением препарата содержащего флавоноиды и смесь фенольных соединений.

3. Изучить морфометрическую картину почечного трансплантата при криопротекции глицерином и криопротекторным коктейлем (глицерин+препарат содержащего флавоноиды и смесь фенольных соединений).

Научная новизна: Установлен факт улучшения криопротекторной защиты почки при использовании криопротекторного коктейля, содержащего флавоноиды и смесь фенольных соединений.

Впервые проведён сравнительный морфометрический анализ структурных и функциональных изменений на уровне энзимных нарушений в почечных тканях на фоне криоконсервации.

Практическая значимость: Полученные данные могут быть использованы в лечебных учреждениях и центрах трансплантации, применяющие криоконсервированные органы и ткани.

Трансплантологам и криобиологам при криоконсервации почечного трансплантата целесообразно использование двухэтапного метода замораживания.

Экономическая значимость полученных результатов включает возможность получения медико-хирургической эффективности при использовании разработанных методов оценки жизнеспособности и модификаций способов криоконсервации почечного трансплантата в различных условиях.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

-Для оценки степени сохранности морфо-функциональных резервов почечного трансплантата, подвергнутых криоконсервации необходимо использовать методы криобиохимии и морфометрии.

-Для более эффективной криоконсервации почечного трансплантата целесообразно использовать в качестве криопротектора, наряду с глицерином, коктейль из флавоноидов и смеси фенольных соединений.

Личный вклад соискателя. Личное участие соискателя охватывает аналитическую проработку литературных источников, эксперименты, криопротекция почечного трансплантата различными криопротекторами, все разделы биохимических, гистоморфометрических исследований.

Апробация работы: Материалы диссертации доложены: на научном симпозиуме «Оценка и прогнозирование жизнеспособности почечного трансплантата» (Бишкек, 2001); на заседании Ассоциации хирургических обществ КР (2003); на конференции молодых учёных КГМА (2004); на конференции молодых учёных КГМИИПК (2004); на заседании научного

отдела НХЦ (2004); на заседании экспертной комиссии по предварительному рассмотрению диссертаций при НХЦ (2005).

Внедрения результатов исследования: Основные положения диссертации внедрены в экспериментальную практику Проблемной лаборатории клинической и экспериментальной хирургии (ПЛКиЭХ) НХЦ.

Публикации по теме диссертации: Опубликовано 15 научных работ, получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованных источников на 115 страницах компьютерного набора шрифтом Times New Roman, Кириллица (размер 14, интервал 1,5), а также приложения на 62 страницах. Библиографический указатель включает 169 источника, в том числе 91 из стран ближнего и 78 - из стран дальнего зарубежья. Иллюстраций 44, из них рисунков - 28, таблиц - 16.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на половозрелых беспородных собаках массой 7-14 кг, содержащихся на обычной диете вивария. Соблюдены все необходимые требования гуманного обращения с экспериментальными животными.

Нами проведены 3 серии экспериментов: 1-я серия - 10 собак, у которых проведены исследования почечного трансплантата на фоне обычной гипотермической перфузии. Гистозимологические исследования (ЛДГ, КФ, ЩФ, ДК) проведены совместно с м.и.с. Байсеркеевым З.Б. Полученные результаты служили контролем. 2-я серия - 10 собак, у которых исследования почечного трансплантата проводились на фоне криоконсервации с использованием в качестве криопротектора глицерина (I группа). 3-я группа - 10 собак, у которых исследования почечного трансплантата проводились на фоне криопротекции почки криопротекторным коктейлем (флавоноиды и смеси фенольных соединений) (II группа).

Методика эксперимента. Под наркозом обнажали левую почку. После новокаиновой блокады выделяли почечную артерию, вену и мочеточник. Внутривенно вводили 10 мг лазикса. На фоне форсированного диуреза удаляли почку, промывали ее охлажденным до 8-10°C раствором NaCl 0,9%-400мл+гепарин 5000 ЕД + папаверина гидрохлорид 2%-4мл+глицерин 15%-20мл и подключали к перфузионной установке (рис.2.).

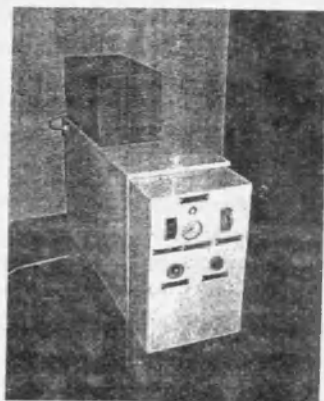
Перфузию проводили под постоянным давлением 50-55 мм.рт. ст., создаваемого столбом перфузата высотой 70 см, при непрерывной рециркуляции перфузата для тщательного перемешивания добавляемого в перфузат криопротектора.

Концентрацию криопротектора постепенно увеличиваем до 100%. Затем почку помещаем в специальную алюминиевую емкость, содержащую криопротектор и помещаем в аппарат для замораживания жидким азотом. Для криоконсервирования почек мы использовали двухэтапный метод замораживания, по методу разработанному в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Б.УССР.

Исследования выполнялись в 2 этапа: 1-й этап - охлаждение до -20°C , со скоростью 1°C в 1 мин; 2-й этап - до -196°C , быстрое погружение в жидкий азот. Для погружения органов и тканей при криоконсервации применяют алюминиевые, стальные или полимерные контейнеры соответствующей конструкции и специальное жидкоазотное холодильное оборудование. Почки в нашем эксперименте погружали в алюминиевые контейнеры.



А



Б

Рис.1. Криоаппараты для замораживания (А) и размораживания (Б)

Хранили замороженную в жидком азоте почку в течении 4-х суток. При этом использовались следующие портативные криоаппараты (рис.1): 1) для замораживания - Модель МЭЗГМ; 2) для размораживания - Модель МЭЗГМ.

Размораживание проводили до полного исчезновения льда. Размороженную почку промывали раствором NaCl 0,9%- 400мл+раствор гепарина 5000ЕД+глицерин 15%-10мл. Деглицеринизацию размороженной почки проводят с применением солевых или маннитно-солевых растворов.

Мы использовали раствор NaCl 0,9%-400мл + папаверин 2%-2мл+фуросемид 4 мл. Затем почку подключали для реперфузии, которую проводили в течении 1-го часа.

В качестве препарата, уменьшающего негативные последствия криоконсервации (а также способствующие ей) нами был проведен скрининг различных веществ. Из литературы известно, что в этом аспекте было проведено исследование очень многих веществ, при этом часть из них оказалась токсичными, другие малоэффективными.

Флавоидные и другие фенольные соединения содержат вещество Rgorolis, который представляет собой плотную, упругую массу зеленовато-бурого цвета, специфического запаха, нерастворимую в воде, но растворимого в спирте. В состав этого вещества входит смесь смол воска, эфирных масел, флавоинов, флавоноинов, производных коричневой кислоты, ацетоксибетулинола и др.

Нами проведено исследование препарата на такие показатели, как структура, консистенция, окисляемость (С), массовая доля воска, массовая доля механических примесей (%), массовые доли флавоидных и других фенольных соединений (%), йодное число (%), количество окисляемых веществ в cm^3 раствора окисления на 1 мг препарата.

Препарат для криоконсервирования готовили следующим образом. 50 грамм rgorolis растворялось в 200 мл этилового спирта. После чего раствор пропускали через бумажный фильтр. В полученном растворе вновь растворяли 50 гр. rgorolis (и так трижды).

Конечный продукт подвергался выпариванию. Сухой остаток «растворялся» в апиrogenной дистиллированной воде. В итоге конечная концентрация флавоидных и других фенольных соединений возросла до 36,7%, при этом произошло уменьшение доли воска и количества окисленных веществ без заметного изменения йодного числа.

Таким образом, необходимо отметить, что действие того или иного стабилизатора зависит от состояния биологического объекта перед замораживанием, природы самого стабилизатора, рН среды, генетического и метаболического состояния клеток, концентрации стабилизатора, наличия солей в среде, среды суспендирования, фракции лизосомальных ферментов.

Методы исследования. Изучена активность кислой фосфатазы (КФ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) калориметрическим методом по Боданскому, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) программированным методом на аппарате «Весман - Sinchroп Sx 4 delta». Методика определения диеновых конъюгатов (ДК) состоит из трех этапов. Первый этап-получение экстракта по Фольчу. Второй этап- определение общих липидов. Третий этап- определение ДК по Plazer. Методика определения активности супероксиддисмутазы (СОД) (Чумаков В.С., Осинская Л.Ф.,1977). Методика определения активности каталазы (Конвой В.Д., Лукошкин А.В., 1988). Морфологию и морфометрию изучали обычной световой микроскопией.

Результаты исследований. Задачей 1 главы является изучение сравнительной активности ряда органоспецифических ферментов почечного трансплантата после криоконсервации на фоне глицерина (I-группа) и криопротекторного коктейля (II-группа).

Как видно из рис. 3 (а), показатели активности ЛДГ в изучаемых группах эксперимента имеют разнонаправленный характер: резко повышенная активность в условиях криоконсервации на фоне глицерина и резко сниженный на фоне криопротекторного коктейля.

В этой связи, у нас нет основание говорить об отсутствие противоишемического эффекта криоконсервации с глицерином или без глицерина. Дело в том, что исследованиями наших сотрудников (З.Б.Байсеркеев, Ж.И.Ашимов, Р.А.Эгембаев) доказано, что даже традиционная холоддовая перфузия почек в достаточной степени обладает противоишемическим влиянием.

Как видно из рис.3 (б), после криоконсервации в обеих группах отмечается нарастание активности КФ. Вместе с тем, темп нарастания активности этого фермента при криопротекции глицерином более высокий, нежели чем при использовании нового криоконсерванта из смеси флавоноидов и фенольных соединений.

Было установлено, что после криоконсервации по модифицированной методике активность КФ возрастает на 23%. В то же время использование в качестве криоконсерванта глицерина приводит к значительной активности КФ, которая возрастает на 94%.

На наш взгляд, более высокая активность ферментов КФ при использовании глицерина не свидетельствует о полном и необратимом разрушении клеток. Однако, ясно, что это влечет за собой дискоординацию всей сложной системы энзимов, при этом происходит нарушение синхронности отдельных звеньев ферментативных процессов, что, конечно же, отразится на жизнеспособности почечного трансплантата.

Из всех ранее изученных ферментов наиболее устойчива к низким температурам ЩФ. Как видно из рис.4 (а), активность этого фермента в обеих группах эксперимента имеет тенденцию к снижению. Причем, темп снижения активности при использовании криопротекторного коктейля выше, нежели при использовании глицерина в качестве криопротектора.

Как видно из рис.4(б), активность ЛДГ после реперфузии увеличивается еще больше в сравнении с контролем и ее значением в до перфузионном этапе лишь в I-группе, тогда как во II-группе активность фермента практически не изменяется, оставаясь значительно ниже уровня нормы.

Исследованиями наших вышеуказанных сотрудников доказано, что даже через 60 мин после реперфузии на фоне традиционной холоддовой перфузии почечного трансплантата активность КФ возрастает лишь на 60%.

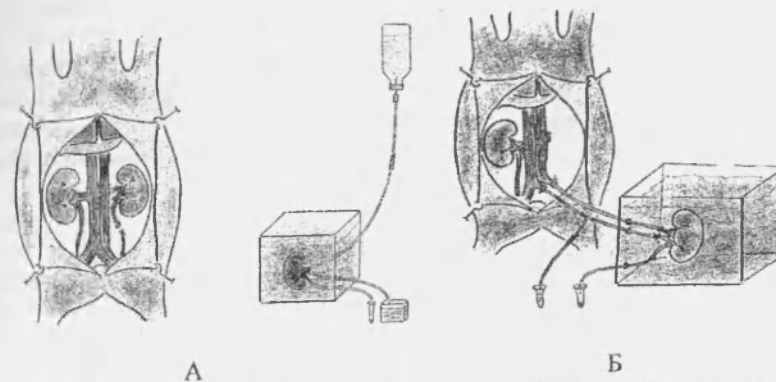


Рис.2.Нефрэктомия и перфузионная гипотермия (А), реперфузия почечного трансплантата после криоконсервации (Б).

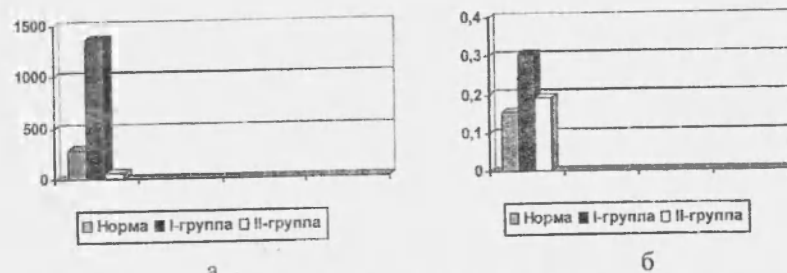


Рис. 3. Активность ЛДГ (а) и КФ (б) в норме и после криоконсервации

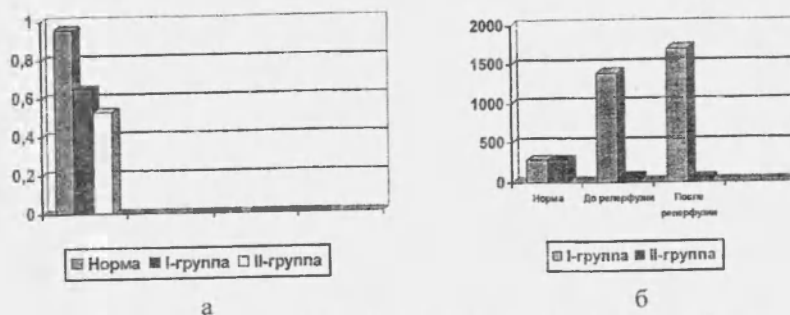


Рис. 4. Активность ЩФ (а) и ЛДГ (б) до и после реперфузии

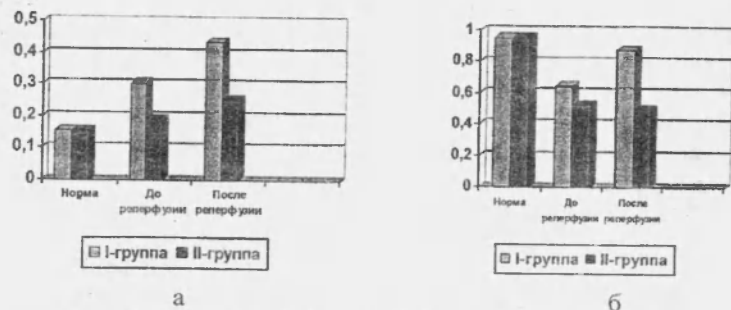


Рис. 5. Активность КФ (а) и ЩФ (б) до и после реперфузии

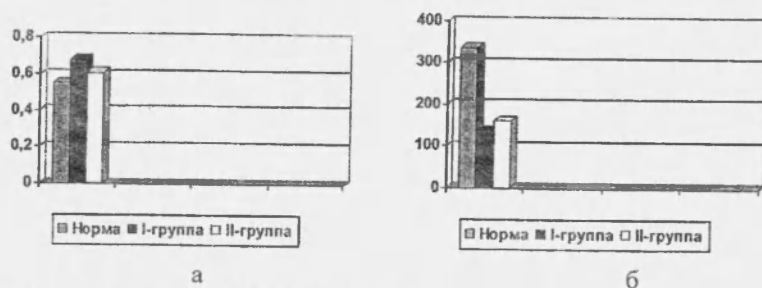


Рис. 6. Динамика ДК (а) и СОД (б) в норме и после криоконсервации

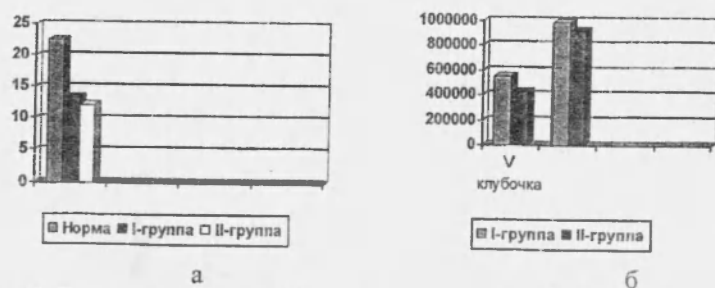


Рис. 7. Динамика катализазы (а) и соотношение объема (V) клубочка и капсулы (мкм)

В нашем примере после реперфузии ее активность возрастает на 175% в I-группе, а во II-группе на 52% (рис.5(а)).

Как видно из рис.5(б), активность ЩФ в обеих группах в до реперфузионном сроке будучи сниженным в сравнении с нормой после реперфузии приобретает разнонаправленный характер. В I-группе активность этого фермента повышается до уровня контрольного значения, а во II-группе, наоборот, умеренно снижается.

В целом, после консервации активность ЩФ уменьшается до 52,6%, а после реперфузии до 47,3%. Надо полагать, что использование препарата из смеси флавоноидов и смеси фенольных соединений позволило более значительно снизить активность лизосомального фермента – ЩФ и тем самым сохранить ткани (клетки) от разрушения.

Таким образом, изучение активности лизосомных гидролаз в клетках на этапах низкотемпературного консервирования дало возможность установить оптимальные условия криоконсервирования, позволяющие сохранить активность этих ферментов на уровне контрольных значений.

На наш взгляд, это, в свою очередь, косвенным образом свидетельствует о сохранности лизосомальных структур, являющихся криолабильными органидами, то есть снижает вероятность развития аутолитических процессов в клетке.

Повышение активности мембранно-связанной ферментной системы коррелирует с деструктивными изменениями мембран под влиянием альтерирующих агентов, что также может служить тестом на структурно-функциональную полноценность клеток до и после процесса криоконсервирования.

По нашим сведениям, флавоноиды обладают не только криопротекторным действием, но и влияют на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), о чем говорилось в предыдущих главах исследования.

Задачей третьей главы является изучение сравнительных данных по ПОЛ в почечном трансплантате после его криоконсервации на фоне глицерина (I-группа) и криопротекторного коктейля (II-группа).

Как видно из рис.6(а), содержание ДК в обеих исследуемых группах было выше нормы. Причем, в I-группе концентрация их было выше, чем во II-группе.

Итак, при использовании в качестве криоконсерванта глицерина наблюдается росту количества ДК, которые взаимодействуют с кислородом и образуют перекисные радикалы, способные повреждать мембраны клеток (через взаимодействие с фосфолипидами и образованием гидроперекисных липидов и новых фосфолипидных радикалов).

Как видно из рис.6(б), содержание СОД в обеих группах было значительно ниже, чем в контрольной группе. Причем, после

криоконсервации на фоне криопротекторного коктейля было выше, чем после криоконсервации на фоне глицерина.

Стадия процесса свободнорадикального окисления, дающая активированные формы кислорода, контролируется разными формами фермента СОД, который дезактивирует кислородные радикалы. Образующиеся жирнокислотные радикалы, а также радикалы кислорода, могут инактивироваться антиоксидантами. В нашем примере в обеих исследуемых группах содержание СОД ниже нормы.

СОД вызывает диспропорционирование двух супероксид-радикалов на кислород и менее опасный H_2O_2 . Последний снова диспропорционируется на O_2 и H_2O гемосодержащей каталазой. При использовании флавоноидов и смеси фенольных соединений приводит к более низкому образованию перекисных радикалов и более активной работе антиоксидантной системы; хотя, в обоих случаях отличаются от нормальных показателей.

Как видно из табл. 7(а), содержание каталазы, как впрочем и содержание СОД было значительно ниже нормы. Однако, в отличие от СОД содержание каталазы в после криоконсервации снижается больше во II-группе.

Известно, что биологические мембраны весьма чувствительны к повреждающему действию низких температур. На основании имеющихся данных последовательность развития повреждений в мембранах схематически можно представить следующим образом.

Начальным звеном повреждений при охлаждении является лабильзация плазматической мембраны клетки вследствие изменения физико-химического состояния липидов, которые подвергаются структурно-фазовому переходу и латеральному разделению в плоскости мембраны. Это приводит к формированию дискретных зон и каналов утечки для ионов и воды, создающих деформационные нагрузки на мембрану.

Снижение концентрации биокатионов в клетке нарушает ее основные метаболические циклы, что дополняет дезинтеграцию формирующих элементов клетки, к числу которых, прежде всего, относится субмембранный ретикулум.

В наших экспериментах, в качестве контроля служила почка, прошедшая процесс криоконсервации жидким азотом и глицерином. В то же время, учитывая, что наша методика являлась стандартной мы свои показатели сравнивали не только с контрольной, но и результатами других авторов, использующих различные консерванты.

Наши морфологические исследования показали, что использование в качестве криоконсерванта глицерина приводит к значительным морфофункциональным изменениям ткани почек после размораживания. Ниже приводим наиболее характерные морфологические изменения в почечном комплексе.

Установлено, капсула почки расслоена и частично десквамирована от поверхности органа. Почечные тельца располагаются группами, большинство интенсивно базофильны, многоклеточны, некоторые фрагментированы. Как правило, капсулы почечных телец двухслойные, внутренняя стенка образована базальной мембранной и одним слоем плоских клеток.

Следует подчеркнуть, в большинстве случаев отмечается, что в просвете капсул встречаются хлопьевидные бесструктурные массы и единичные клетки белой крови. Следует также заметить, что выносящие сосуды спазмированы, эндотелий частично десквамирован, стенка гомогенизирована. Выносящие сосуды клубочков полнокровны, кровь в них часто гемолизирована.

Отмечено, что почечный эпителий в более чем в половине канальцев с признаками дистрофии (уплощение, деструкция, десквамация, пикноз и «выскальзывание ядер» в просвет канальца). Проксимальные канальцы тесно прилежат друг к другу, базальные мембраны их сохранены.

Вся сосудистая система почечного комплекса пуста. В юкстагломерулярной зоне вены несколько расширены, артериолы спазмированы. Здесь же встречаются почечные тельца в просвете капсул, которых вместо клубочка гомогенная эозинофильная бесструктурная масса (некроз клубочка).

Во многих препаратах эндотелий вен не идентифицируется. В этой зоне отмечаются признаки периваскулярного отека интерстиции. Канальцы мозгового слоя открыты частично, эпителий большинства канальцев десквамирован. В просвете некоторых канальцев лейкоциты. В почечной лоханке у большинства криоконсервированных почек отмечается скудный лейкоцитарный инфильтрат.

При использовании в качестве криоконсерванта препарата, содержащего раствор флавоноидов и фенольных соединений оказывает морфосохраняющее действие на замороженную точку. Ниже приводим сравнительные морфологические данные.

Нами установлено, что капсула почки тонкая, тесно прилежит к поверхности органа. Почечные тельца расположены группами вокруг собирательных трубочек. Клубочки имеют равномерно расширенные и кровенаполненные капиллярные петли. Капсула двухслойная, эпителий внутренней стенки плоский, клетки тесно прилежат друг к другу. В просвете отдельных капсул эритроциты.

На границе коркового и мозгового вещества отдельные клубочки содержат гемолизированную кровь. На границе коры и мозгового вещества единичные сосуды (артерии), окружены зоной периваскулярного отека. Приносящие и выносящие сосуды с четким плоским эндотелием, в просвете

немного гемолизированных эритроцитов. Сосуды более крупного калибра пусты, эндотелий четкий.

Установлено, почечный эпителий в большинстве канальцев сохранен, лишь в подкапсульной зоне небольшая группа канальцев с признаками дистрофии (десквамация клеток, пикноз и рексис ядер). Следует отметить, что в области сосочка большинство собирательных трубочек с десквамированным эпителием. В стенке лоханки скудный периваскулярный инфильтрат и группа рассеянных эритроцитов.

Таким образом, сравнение морфофункциональных изменений в почках при криоконсервации с использованием глицерина и препарата из флавоноидов и смеси фенольных соединений показывает значительные различия. Так, в частности при использовании глицерина нарушается структура капсулы почки, происходит фрагментация почечных телец, что проявляется появлением в просвете капсул патологического содержимого.

Морфометрия почек позволила выявить количественные изменения, происходящие в почках после криоконсервации криопротектором глицерином в сравнении с новым криопротекторным коктейлем, содержащем глицерин + флавоноиды и смеси фенольных соединений.

Было установлено, что при использовании только глицерина происходит увеличение объема клубочка на 27,9% по сравнению с новым препаратом. Это обусловлено застойными явлениями, происходящими в сосудистых клубочках и расширением капиллярных петель.

Замораживание ткани почки нарушает структуру капсулы и ее объем. По нашим данным объем капсулы при использовании нового препарата несколько ниже, чем при использовании только глицерина. В обоих случаях капсула почки местами расслаивается и десквамируется от поверхности органа. Но при использовании глицерина наблюдаются более выраженные ее разрушения с появлением периваскулярных инфильтратов, что и приводит к увеличению объема капсулы.

Наиболее наглядным подтверждением этих изменений является расчет соотношения объема клубочка и капсулы. При использовании нового соединения этот показатель достоверно меньше, чем при использовании только глицерина для криоконсервации.

Как видно из рис.7 (б), после криоконсервации на фоне различных способов криопротекции объем как клубочков, так капсулы почек у животных II-группы ниже, чем у животных I-группы.

Как видно при использовании криопротекторного коктейля удельный вес как почечных телец, так и измененных клубочков не изменяется, тогда как при использовании в качестве криопротектора глицерина удельный вес измененных клубочков возрастает в несколько раз.

Таким образом, по нашим данным, при использовании глицерина в качестве криоконсерванта происходит увеличение диаметра канальца, что обусловлено дистрофией его эпителия в форме десквамации и деструктивных изменений, тогда как при использовании новых соединений почечный эпителий сохраняет свою функциональную форму.

Цилиндрический каемчатый эпителий обладает высокой активностью ЩФ, участвующей в полном обратном всасывании глюкозы, а в цитоплазме клеток находятся лизосомы, содержащие протеолитические ферменты, способствующие обратному всасыванию белков. Митохондрии этих клеток с помощью сукцинатдегидрогеназы и других ферментов способствуют активному всасыванию электролитов.

Таким образом, количественное и качественное нарушение структуры проксимального канальца при использовании только глицерина приводит к нарушению реабсорбции углеводов, протеинов, электролитов, воды и других веществ.

Менее выраженные изменения происходят в дистальном отделе нефрона, в котором, как известно, происходит факультативная реабсорбция в кровь электролитов. Учитывая, что от дистальных канальцев зависят количество и концентрация выделяемой мочи через обратное всасывание электролитов и, вследствие этого, повышение осмотического давления крови утолщение цилиндрического эпителия приводит к уменьшению обратного всасывания воды из канальцев нефрона.

Подводя итог по данным морфометрии можно видеть, что удельный объем почечных телец при использовании только глицерина в процентном отношении имеет тенденцию к уменьшению ($P < 0,05$). Из этого объема удельный объем измененных клубочков в 4 раза больше при использовании глицерина, чем при использовании препарата из флавоноидов и смеси фенольных соединений.

Итак, в результате морфологического исследования изменений ткани почки под влиянием криогенного воздействия были выявлены основные процессы, протекающие в ней. Непосредственно после оттаивания ведущими были изменения со стороны внутриорганных почечных сосудов с признаками сунтирования почечного кровотока.

Обнаруживали некротические и дистрофические изменения в различных отделах нефрона с замещением необратимо поврежденной паренхимы соединительной тканью. Наблюдались признаки регенерации эпителия сохранившихся канальцев.

Результаты проведенных исследований подтвердили, что в механизме криоповреждения паренхимы почки играют роль не только прямое повреждение клеток в результате кристаллизации вне- и внутриклеточной воды, но и последующие нарушения внутривисочечной гемодинамики в

результате повреждения эндотелия и других компонентов сосудистой стенки.

Повышенная проницаемость стенки капилляров приводит к развитию периваскулярного отека интерстиции. В целом, в группе с использованием препарата из флавоноидов и смеси фенольных соединений, в основном, наблюдались изменения защитно-приспособительного характера на фоне локальной патологии.

ВЫВОДЫ

1. При криоконсервации на фоне глицерина наступает выраженный дисферментоз с дестабилизацией мембран лизосом и запловым выходом гидролитических ферментов, тогда как при использовании криопротекторного коктейля энзимопатия слабо выраженная. Коктейль способствует сохранности лизосомальных структур, а потому снижает вероятность развития аутолитических процессов в клетке, что позволяет рекомендовать ее в качестве эффективного криопротектора.

2. При криоконсервации на фоне глицерина нарушается структура капсулы почки, происходит фрагментация почечных телец, что проявляется появлением в просвете капсул патологического содержимого с дальнейшей ее организацией, тогда как криопротекторный коктейль оказывает морфосохраняющее действие на замороженную почку, сопровождается наименее выраженными повреждениями мембранных структур, что подтверждает криопротекторный ее эффект.

3. При криоконсервации на фоне глицерина наступают более выраженные морфологические нарушения, проявляемые в виде дистрофии, десквамации и даже деструктивных изменений капсулы, клубочков и канальцев, тогда как при использовании криопротекторного коктейля отмечаются наименьшие выраженные повреждения структурных элементов почек.

4. При криоконсервации на фоне глицерина отмечаются нарушения соотношения объема клубочка и капсулы, удельный вес почечных телец и измененных клубочков, тогда как при использовании нового соединения эти показатели подвержены наименьшим изменениям. Кроме того, после криоконсервации с использованием криопротекторного коктейля как диаметр, так и высота эпителия проксимального канальца была меньшими, чем при после криоконсервации на фоне глицерина.

5. При использовании глицерина в качестве криоконсерванта происходит увеличение диаметра канальца с нарушением реабсорбции углеводов, протеинов, электролитов, воды и других веществ, тогда как при использовании новых соединений почечный эпителий сохраняет свою

функциональную форму, а, следовательно, не сопровождается нарушением функциональных возможностей почечной функции в процессе реперфузии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Практическим врачам в клинической деятельности при криоконсервации почечного трансплантата целесообразно использование двухэтапного метода замораживания.

2. Для оценки степени сохранности морфо-функциональных резервов почечного трансплантата, подвергнутых криоконсервации необходимо использовать методы криобиохимии и морфометрии.

3. Для более эффективной криоконсервации почечного трансплантата целесообразно использовать в качестве криопротектора, наряду с глицерином, коктейль из флавоноидов и смеси фенольных соединений.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Абдыкеримова К.Б., Омуралиева Э.Т., Касымбеков Т.М. О роли криоконсервации в трансплантологии.// Центрально-Азиатский медицинский журнал.- Бишкек, 2002.-С.167-169.

2. Байсеркеев З.Б., Эргешев К.М., Ашимов Ж.И., Абдыкеримова К.Б. Гистоэнзимологический профиль почечного трансплантата при консервации методом гипотермической перфузии с трансорганической газовой инсuffляцией и реперфузии.// Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы.- Сб.научн.трудов. – Бишкек, 2002.- С.43-47.

3. Эргешев К.М., Байсеркеев З.Б., Омуралиева Э.Т., Мамажусупов Н.А., Абдыкеримова К.Б. Сравнительная энзимологическая оценка интактной и ишемизированной почек в режиме гипотермической защиты с введением оксигенированной фторуглеродной эмульсией.// Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы.- Сб.научн.трудов. – Бишкек, 2002.- С.73-76.

4. Эгенбаев Р.Т., Байсеркеев З.Б., Эргешев К.М., Омуралиева Э.Т., Абдыкеримова К.Б. Сравнительная гистоэнзимологическая оценка эффективности различной антиоксидантной протекции почечного трансплантата.// Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы.- Сб.научн.трудов. – Бишкек, 2002.- С.89-92.

5. Эгенбаев Р.Т., Зурдинов А.З., Сулайманкулов Р.М., Абдыкеримова К.Б., Омуралиева Э.Т. Сравнительное изучение процессов ПОЛ почечного трансплантата в условиях фармакологической защиты.// Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы.- Сб.научн.трудов. – Бишкек, 2002.- С.92-95.

6. Сулайманкулов Р.М., Кадыралиев Т.К., Ашимов Ж.И., Абдыкеримова К.Б. Морфологические и патобиохимические изменения

почечного трансплантата при консервации методом гипотермической перфузии с трансорганный газовой инсуффляцией кислорода с последующей реперфузией. // Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы. - Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.122-126.

7. Абдыкеримова К.Б. Криоконсервация - результативное направление в консервации трансплантатов. // Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы. - Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.127-128.

8. Абдыкеримова К.Б. Понятие о крионике. // Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы. - Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.129-130.

9. Абдыкеримова К.Б., Омуралиева Э.Т., Сулайманкулов Р.М., Эргешов К.М., Байсеркеев З.Б. Актуальность выбора криопротектора. // Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы. - Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.130-133.

10. Омуралиева Э.Т., Абдыкеримова К.Б., Сулайманкулов Р.М., Эргешов К.М., Эгенбаев Р.Т., Байсеркеев З.Б. Характеристика распространенности различных фенотипов у основных этнических групп в Кыргызстане и методические основы организации службы тканевого типирования. // Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы. - Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.148-150.

11. Омуралиева Э.Т., Тойматов С.Ш., Мамакеев К.М., Абдыкеримов К.Б., Байсеркеев З.Б. Структура причин смертности и проблемы трансплантации органов в Кыргызской Республике. // Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.148-150.

12. Омуралиева Э.Т., Мамакеев К.М., Абдыкеримов К.Б., Байсеркеев З.Б., Касымбеков Т.М. Стратегия организации службы тканевого типирования в Кыргызстане. // Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.150-153.

13. Абдыкеримова К.Б., Тухватшин Р.Р., Эгенбаев Р.Т., Сулайманкулов Р.М. Влияние препарата из смеси флавоноидов и фенольных соединений на кислую и щелочную фосфатазы почки при ее криоконсервации. // Медицинский журнал Казахстана. - Бишкек, 2004. - С.113-117.

14. Сулайманкулов Р.М., Эгенбаев Р.Т., Абдыкеримова К.Б. Морфобioхимическая оценка и прогнозирование жизнеспособности почечного трансплантата при консервации методом гипотермической трансорганный газовой перфузии. // Хирургия Кыргызстана. - Бишкек, 2004. - С.133-137.

15. Абдыкеримова К.Б., Тухватшин Р.Р. Методика очистки и обогащения криоконсервантов флавоноидными соединениями. // Курорты

Кыргызстана в новом тысячелетии. Матер. междунар. симп. Бишкек, 2004. - С.190-196.

16. Природный криопротектор патент №791 от 30 июня 2005г., выданный Кыргызпатентом (соавт. Р.Р.Тухватшин, И.А.Ашимов).

РЕЗЮМЕ

диссертации Абдыкеримовой К.Б. «Криобиохимия и морфометрия почечного трансплантата» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.00.27-хирургия и 14.00.16 – патологическая физиология.

Ключевые слова: почечный трансплантат, перфузия, реперфузия, криоконсервация, гистоморфометрия, криопротектор, анабиоз, жидкий азот.

Объект исследования: Беспородные собаки.

Целью исследования: Совершенствовать криопротекторную защиту почечного трансплантата в целях сохранения его жизнеспособности и функциональной активности, а, следовательно, профилактики реперфузионных его повреждений.

Методы исследования: активность ЛДГ, КФ, ЩФ, СОД, ПОЛ, каталазы, световая гистоморфометрия.

Полученные результаты и их новизна.

Показатели активности ЛДГ в изучаемых группах эксперимента имеют разнонаправленный характер - резко повышенная активность в условиях криоконсервации на фоне глицерина и резко сниженный на фоне криопротекторного коктейля. Активность ЩФ в обеих группах эксперимента имеет тенденцию к снижению. Причем, темп снижения активности при использовании криопротекторного коктейля выше, нежели при использовании глицерина в качестве криопротектора. Содержание ДК в обеих исследуемых группах было выше нормы, а СОД в обеих группах было значительно ниже. При использовании глицерина нарушается структура капсулы почки, происходит фрагментация почечных телец. Морфометрия почек позволила выявить количественные изменения, происходящие в почках после криоконсервации криопротектором глицерином в сравнении с новым криопротекторным коктейлем содержащем глицерин + флавоноиды и смеси фенольных соединений.

Рекомендации по использованию: разработанный и изученный криопротекторный коктейль при криоконсервации почечного трансплантата рекомендован для практического здравоохранения.

Область внедрения: трансплантология, криобиология.

14.00.27- хирургия жана 14.00.16 – патологиялык физиология адистиктери боюнча «медициналык илимдердин кандидаты» илимий даражасына жакталуучу «Бөйрөк трансплантаттын криобиохимиясы жана морфометриясы» аттуу К.Б.Абдыкеримованын диссертациясына

КОРУТУНДУ

Негизги сөздөр: бөйрөк трансплантаты, перфузия, реперфузия, криоконсервация, гистоморфометрия, криопротектор, анабиоз, суюк азот

Изилдөө объекти: тукумсуз иттер.

Изилдөөнүн максаты: Бөйрөк трансплантатынын жашоо жөндөмүн жана ишмердигин тыгыздатуу максатында анын криопротектордук коргонуусун мындан ары да жакшыртуу, ошону менен анын реперфузиондук жаракаттануусунун алдын алуу.

Изилдөө ыкмалары: көрсөтүлгөн ЛДГ, КФ, ЩФ, СОД, ПОЛ химиялык кошулмалардын ыкчамдыгы, каталаздар жана жарыктын гистоморфометриясы.

Жетишкен натыйжалар, алардын жаңылыгы.

Эксперимент өткөрүлгөн топтордо дегидрогенез лактатынын (ЛДГ) ыкчамдыгынын көрсөткүчтөрү ар кыл тараптуу болуп чыкты. Глицериндин негизинде криоконсервация шартында – өтө жогорку ыкчамдуулук байкалды, ал эми криопротектордук коктейлдин негизинде – өтө төмөн ыкчамдуулук байкалды. Ошол эле учурда фосфотаза кычкылдыгынын (ЩФ) ыкчамдуулугу эксперимент жүргүзүлгөн топтордо азайууга алып келди. Мисалы, криопротектордук коктейлди пайдаланганда ыкчамдуулуктун азайуу баскычы жогору болуп, ал эми глицеринди криопротектордун ордуна пайдаланганда ал көрсөткүч төмөндөгөн. Изилдөө жүргүзүлгөн эки топто тең ДК көрсөткүчү нормадан жогору болгон, ал эми супероксидесмутаза (СОД) эки топто тең нормадан төмөн болгон. Глицеринди колдонгондо бөйрөктүн капсуласынын түзүлүшү бузулуп, бөйрөк денечелердин бөлүнүүсү жүрөт. Бөйрөктүн морфометриясы сан жагынан болгон өзгөрүүлөрдү байкоого мүмкүндүк берди. Бөйрөктөгү ал өзгөрүүлөр криопротектор катары глицеринди пайдаланганда жана глицерин+флавоноид, ошондой эле фенолдук кошулмалардын аралашмасы менен жаңы криопротектордук коктейлди салыштырганда байкалды.

Колдонуучу үчүн сунуштар: бөйрөк трансплантаттын криоконсервациясы үчүн иштелип чыгып жана изилденген криопротектордук коктейл практикалык саламаттыкты сактоодо колдонуу үчүн сунушталган.

Колдонуу чөйрөсү: трансплантология, криобиология.

RESUME

of dissertation of Abdykerimova K.B.
“Cryobiochemistry and morphometry of renal transplant”
for competition of academic degree of candidate of medical science
on specialties 14.00.27 – surgery and 14.00.16 – pathologic physiology.

Key words: renal transplant, perfusion, reperfusion, cryopreservation, histomorphometry, cryoprotector, anabiosis, liquid nitrogen.

Subject of research: Outbred dogs.

Aim of research: Improve cryoprotective protection of renal transplant with a view to preserve its vitality and functional activity and, therefore, prophylaxis of its reperfusion damages.

Methods of research: Activity of lactate dehydrogenase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, superoxide dismutase, lipid peroxidation, catalases, light histomorphometry.

Obtained results and its novelty

Indices of activity of lactate dehydrogenase in the studied groups of experiment have different directional character – abruptly increased activity in the conditions of cryopreservation against the background of glycerin and abruptly reduced against the background of cryoprotective cocktail. Activity of alkaline phosphatase in both groups of experiment has the tendency to reduction. Moreover, rate of activity's reduction upon using cryoprotective cocktail is higher than upon using glycerin as a cryoprotector. Content of diene conjugate in both studied groups was above normal and superoxide dismutase in both groups was much lower. Upon using glycerin the structure of renal capsule is disturbed, fragmentation of renal corpuscles is happened. Morphometry of kidneys allowed to reveal quantitative changes, occurring in kidneys after cryoconservation with cryoprotector, glycerin in comparison with new cryoprotective cocktail, containing glycerin + flavonoids and mixtures of phenol compounds.

Recommendations on use: developed and studied cryoprotective cocktail for cryoconservation of renal transplant is recommended for practical public health.

Field of introduction: transplantology, cryobiology.