

2006 - 127

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ХИРУРГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР**

На правах рукописи
УДК 616-091.8:666-092.18:616-092.4:616-61:616-089.843.001.18 (043.3)

СУЛАЙМАНКУЛОВ РУСЛАН МЭЛИСОВИЧ

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОБИОХИМИЧЕСКАЯ
ОЦЕНКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ
ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА**

14.00.27 – хирургия

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.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Ашимов Исбек Ашимович

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор Калдыралиев Тургулбай Калдыралиевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор Чыгышбаев Шамить Мукашевич

доктор медицинских наук, профессор Кенжаев Мухамалжан Гуламович

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

Защита состоится «14» сентября 2006г. в 16⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.14.06.314 при Национальном хирургическом центре Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (720044, Бишкек, ул.3-я линия, 25).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального хирургического центра Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (720044, г. Бишкек, ул.3-я линия, 25).

Автореферат разослан «19» июля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.м.н., профессор



А.А.Сопуев

ПЕРЕЧЕПЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 1. АХО КР Ассоциация хирургических обществ Кыргызской Республики
- 2. ГП Гидрорекиси
- 3. ДК Диеновье коньюгаты
- 4. МДА Малоновый диальдегид
- 5. МЗ КР Министерство Здравоохранения Кыргызской Республики
- 6. НПС Пизкопоточная нефрузия
- 7. НХЦ Национальный хирургический центр
- 8. НККНТ Национальный центр кардиологии и терапии
- 9. ПЛЭКХ Проблемная лаборатория экспериментальной и клинической хирургии
- 10. ПО Пероксидаза
- 11. ПОД Перекисное окисление липидов
- 12. ТОКП Трансорганная кислородная нефрузия
- 13. ШО Шиффовы основания

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Даже на сегодня, несмотря на достижения современной медицины, злободневной клинической и теоретической задачей трансплантологии является своевременная, достоверная оценка и прогнозирование жизнеспособности почечного трансплантата для принятия своевременных лечебно-профилактических мер в до- и послеоперационном периоде.

Следует отметить то обстоятельство, что при заборе, консервации и трансплантации, почки неизбежно подвергнутся острой ишемии [А.П.Авцын и соавт., 1979; А.В.Барабаш, 1989; Рюег R.G., 1990; Yussim A. et al., 1994 и др.]. Между тем, ишемия является главным и постоянным неспецифическим фактором функциональной недостаточности почек во время и после ее трансплантации [А.В.Барабаш, 1989; В.И.Кирпатовский, 1979; Woolfson R.G. et al., 1994; Yussim A. et al., 1994 и др.]. Причиной ишемии почечного трансплантата является множество факторов, среди которых децетрализация органа, прекращение доступа кислорода и субстратов окисления и пр. [И.А.Ашимов и соавт., 1999; Л.В.Башкина, 1995; Sibley R.K. et al., 1985; Woolfson R.G. et al., 1994 и др.].

При перечисленных факторах, вследствие снижения синтеза и дегградации клеточных макроэргов, наступает торможение всех энергозависимых процессов в клетках [Р.З.Исмагилов и соавт., 1995; Рюег R.G., 1990 и др.]. Из-за низкой эффективности работы энергетического аппарата ишемизированных клеток, индуцируется процесс перекисного повреждения липидных структур клеточных мембран, приводящий к нарушению кислотно-щелочного и водно-электролитного обмена, нарушению микроциркуляции и затем вторичному ишемическому повреждению почечной ткани [И.А.Ашимов и соавт., 1999; Soifer V.E. et al., 1989].

Однако, относительно малоизученным остается вопрос о сравнительном использовании для оценки и прогнозирования жизнеспособности почечного трансплантата методов морфологии (гистоморфология, электронная микроскопия) и интенсивности тканевой перекисидации липидов [Г.Г.Авгандилов и соавт., 1975; А.Л.Микеладзе и соавт., 1974 и др.]. В указанном аспекте, весьма актуальной является структурно-функциональная оценка почечного трансплантата при его консервации, несмотря на множество научных исследований, касающихся изучения

интенсивности ПОЛ, уровня фосфолипидов, холестерина, морфологии почки, закономерностей трансформации тканей почки до и после ее трансплантации, оценки морфологического состояния почки при консервации [Л.В.Алексеевко и соавт., 1976; Nirsche N. et al., 1981].

Цель исследования: Изучить динамику биохимической и морфологической перестройки почечного трансплантата на светоптическом и ультраструктурном уровнях в зависимости от метода и срока его консервации для своевременной оценки его жизнеспособности, а также прогнозирования и профилактики реперфузионных повреждений.

Задачи исследования:

1. Выполнить гистоморфологическую оценку состояния почечного трансплантата в норме и при нарастающей ишемии в зависимости от срока и метода консервации в условиях гипотермической защиты;
2. Охарактеризовать сравнительную гистоморфологическую перестройку почечного трансплантата в условиях реперфузионно-холодовой консервации и при сочетании его с кислородной перфузией;
3. Оценить возможность использования интенсивности тканевой липидной перекисидации почечного трансплантата для оценки эффективности консервации в до и после реперфузионном периоде.

4. Оценить взаимосвязь патоморфологических и патобиохимических изменений для комплексной оценки состояния ткани почки в целях своевременного прогнозирования реперфузионных осложнений.

Научная новизна полученных результатов: впервые изучена возможность комплексного гистоморфологического и патобиохимического прогнозирования жизнеспособности почечного трансплантата в динамике и в зависимости от методов и сроков консервации трансплантата.

Выполнена гистоморфологическая оценка состояния почечного трансплантата в норме и в условиях различных методов перфузионно-холодовой консервации, в том числе использования кислородной перфузии.

Оценена возможность использования интенсивности тканевой липидной перекисидации почечного трансплантата для

оценки эффективности консервации в до- и после реперфузионном периоде.

Практическая значимость полученных результатов:

На основании своевременной диагностики ишемических повреждений почечного трансплантата, оценки его жизнеспособности на уровне поиска морфологического эквивалента функциональных изменений и функционального прогноза на практике трансплантации почки уже до операции можно предпринять меры физиологической защиты и тем самым предотвратить реперфузионные повреждения почечного трансплантата.

Экономическая значимость работы включает возможность получения медико-хирургической эффективности при использовании разработанных модификаций способов противоишемической защиты почечного трансплантата, снижения числа реперфузионных осложнений после его пересадки. Точная оценка и прогноз жизнеспособности почечного трансплантата дает экономическую выгоду посредством сокращения расходов на проведение всего комплекса подготовительных мер и непосредственно самой пересадки почки.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Канальцевая система нефрона более чувствительна к ишемии, чем почечный клубочек, а реакция эпителиальных элементов канальцев дистального отдела нефрона менее выражена, по сравнению с проксимальным. Уже на 60 мин наступают явления деструкции клеток, а на 120 мин - нарушения структуры и целостности митохондрий;

2. При низкопоточной перфузии (НПП) на 60 мин наступают изменения эпителиа нефрона и интерстиция, а спустя 120 мин - нарушение целостности энергопродуцирующих и белоксинтезирующих оргanelл, тогда как при трансорганной кислородной перфузии (ТОКП) выявляются обратимые изменения, затрагивающие извитые канальцы и в меньшей мере элементы клубочкового фильтра.

3. Патоморфологическая оценка при различных методах консервации тесно коррелирует с патобиохимической и дает возможность комплексной оценки жизнеспособности почечного трансплантата и профилактики его реперфузионных повреждений.

Личный вклад соискателя. Личное участие соискателя

охватывает аналитическую проработку литературных источников, все разделы гистоморфологических, электронномикроскопических и биохимических исследований, а также все эксперименты по модификации способов противоишемической защиты почечного трансплантата.

Апробация результатов исследования. Материалы исследования доложены на: заседаниях методического совета Проблемной лаборатории клинической и экспериментальной хирургии (ПЛКиЭХ) (1999, 2000); заседании Ученого совета Национального хирургического центра (НХЦ) (1999); научном симпозиуме «Оценка и прогнозирование жизнеспособности почечного трансплантата» (2001); заседании Ассоциации хирургических обществ Кыргызской Республики (АХОКР) (2002); заседании научного совета НХЦ (2005); заседании экспертной комиссии по предварительной защите диссертаций при НХЦ (2006).

Внедрения результатов исследования. Модификация ряда способов, в частности, «забора» и гипотермии почек, перфузии и трансорганной оксигенации почечного комплекса, реперфузии и аутооттрансплантации почки в эксперименте внедрены в экспериментальную практику ПЛКиЭХ НХЦ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано в печати 21 научная работа, оформлено 5 рационализаторских предложений.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 117 страницах компьютерного набора шрифтом Times New Roman, Кириллица (размер шрифта 14; интервал 1,5), состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, библиографический указатель включает 157 источников литературы, в том числе 119 из ближнего и 38 - дальнего зарубежья. Иллюстраций - 1 таблица и 34 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены на 40 взрослых беспородных собак обоих полов массой 5-25 кг, которые разделены на следующие серии:

1-я серия - изучение гистоморфологии почек осуществлялось на фоне ишемии почечного трансплантата в условиях малозффективной гипотермической бесперфузионной

консервации по Г. Д. Князеву и соавт. (1988) — у 8 собак и в условиях собственной модификации — у 2 собак;

2-я серия — изучение гистоморфологии почек осуществлялось на фоне низкопоточной гипотермической перфузии почечного трансплантата *in situ* по R. Renaldi-García (1975) — у 8 собак и в условиях собственной модификации — у 2 собак;

3-я серия — изучение гистоморфологии почек осуществлялось на фоне гипотермии почечного трансплантата и его интродной транспортанной перфузии по Г. А. Асояну (1975) — у 8 собак и в условиях собственной модификации — у 2 собак с последующей реперфузией с помощью подключения «бионасоса» по Ю. М. Лопухину (1969).

Эксперименты на животных выполнены согласно протоколу «Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных».

Методика эксперимента В 1-й серии эксперимента моделировалось состояние условного донора "с неболющимся сердцем" (No-Heart-Beating Donor). Выделяются и канюлируются нащипочные и подпочечные отделы брюшной аорты и вены, а также оба мочеточника. После заполнения брюшной полости физиологическим раствором ($t=1-4^{\circ}\text{C}$) канюли подсоединяли к патрубкам иерфузионного аппарата. В этих случаях почечный комплекс ставился в стерильной ложе. В последующем все исследования «условно изъятых из организма» почечного комплекса проводили в этих условиях (*in situ*) (рис. 1).

Во 2-й серии эксперимента моделировалось состояние условного донора с констатированной смертью мозга (Brain-Dead Donor). Гепаринизированным 0,9% раствором натрия хлорида комнатной температуры отмыается сосудистая система трансплантата от крови до появления прозрачной жидкости. Холодовую перфузию ($t=5-6^{\circ}\text{C}$) «условно изъятых» почечного комплекса проводили *in situ* со скоростью $170-200\text{ мл/мин}$ (рис. 2).

В 3-й серии эксперимента моделировалось состояние условного донора с констатированной смертью мозга (Brain-Dead Donor), находящегося в процессе «конденсации». После отмывания сосудистой системы трансплантата по наружной поверхности обе почки в 6-8 местах прокалывали иглой диаметром $0,5-1,0\text{ мм}$ на глубину 10 мм . Под давлением $30-40\text{ мм.рт.ст.}$

кислород с заданной влажностью входит в почку и пронизывает ткани насквозь, а избыточный кислород выходит через мелкие перфорационные отверстия на ее поверхности в окружающий почку физиологический раствор (рис. 3).

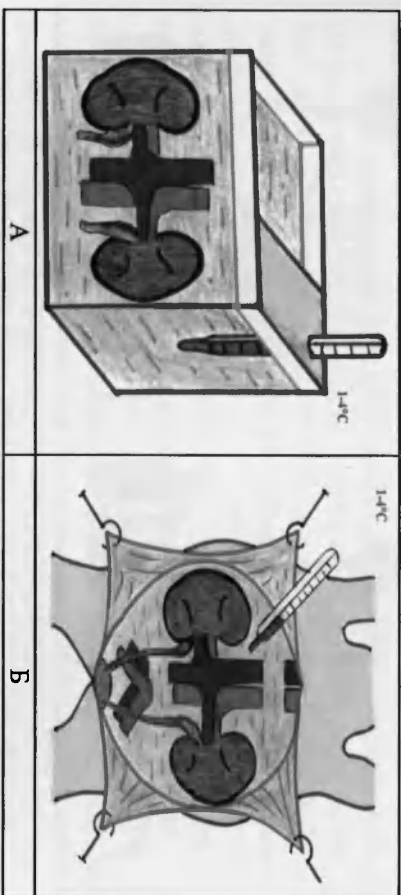


Рис. 1. Консервация изолированного почечного комплекса методом гиперфузионной гипотермии по Г. Князеву (А) и *in situ* — модификация (Б)

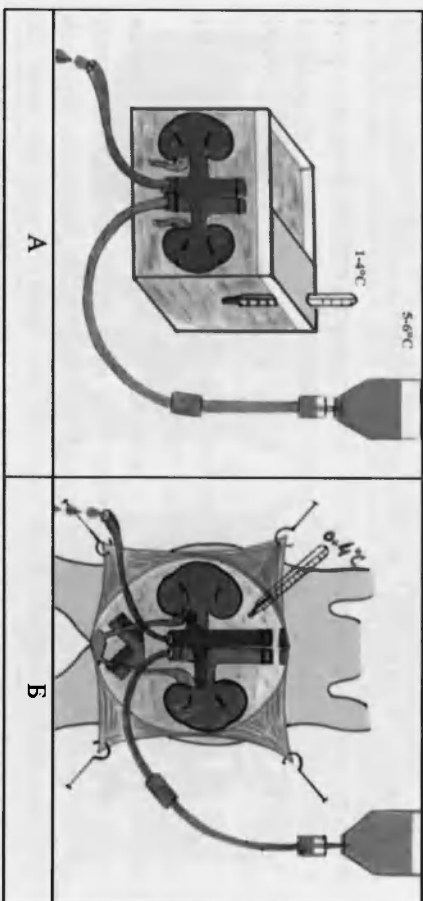


Рис. 2. Консервация изолированного почечного комплекса методом гипотермической перфузии по R. Renaldi-García (А) и *in situ* — модификация (Б)

При этом кислород, растворяясь в тканевых жидкостях, способствует оксигенации почечной паренхимы и снижает метаболические процессы ($t=2-4^{\circ}\text{C}$).

По истечении 2-х часовой консервации производилась реперфузия почечного комплекса по Ю. М. Лопухину (рис. 4). После

широкой лапаротомии, перевязывали и канюлировали аорту и нижнюю пологую вену сразу же по выходу их из диафрагмы. Кангли

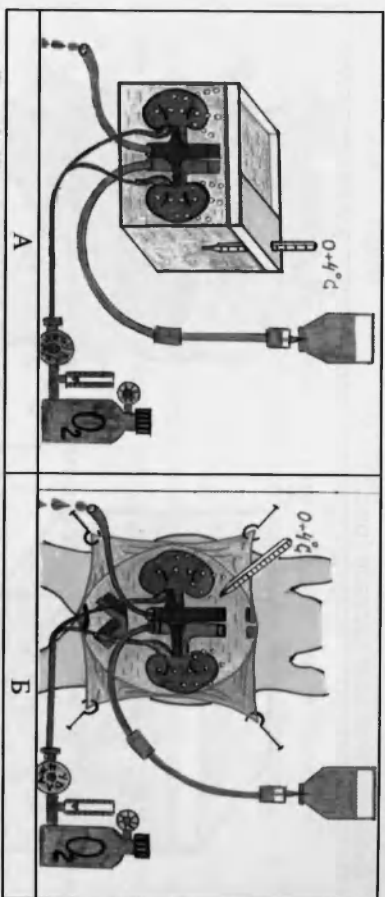


Рис. 3. Консервация изолированного почечного комплекса методом гипотермической перфузии с трансортанной газовой инфуфляцией по А.Г. Асояну (А) и in situ - модификация (Б)

почек 1-ой собаки консервированных по методике описанной выше и канюли животного являющегося «бионасосом» соединялись соответственно.

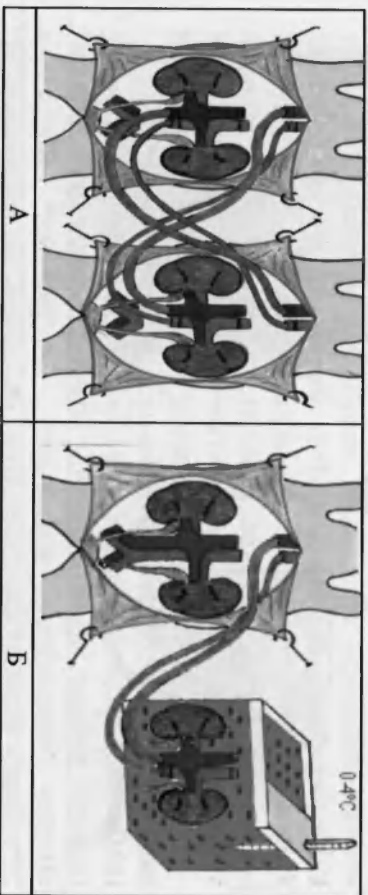


Рис. 4. Реперфузия почечного комплекса с помощью «бионасоса» (А) и in situ - модификация способа перекрестным подпочечником «бионасоса» (Б)

Методы исследования. Материалы для гистоморфологических и патобиохимических исследований получены у экспериментальных животных в виде биопсии фрагмента почечного трансплантата и забора оттекающей крови и перфузата на 1, 30, 60 и 120 минутах.

Для гистологического исследования брали почечный биоптат, размером 1,0x1,0 см, включающие капсулу, корковое вещество и часть мозгового вещества органа. Срезы толщиной в 5-8 мкм окрашивали гематоксилин-эозином.

Для проведения электронно-микроскопических исследований из коркового вещества почек вырезали кусочки размером около 1 мм³, которые помещали в 2,5%-ный р-р глицеральдегида на 1-1,5 часа. После отмывки в 0,1 М-фосфатном буфере кусочки тканей дополнительно фиксировали в 1%-ном растворе тетрахоксида осмия на фосфатном буфере (рН - 7,4) по Миллонику с последующим обезжелезиванием в спиртке восходящей крепости.

После дегидратации кусочки заливали в арадит. Срезы толщиной 20-40 нм, полученные на ультрагтоме, монтировали на сетки с подложкой из формвара. Дополнительно срезы окрашивали раствором свинца по Рейнльду. Просмотр и фототрафикование препаратов производили на электронном микроскопе ПЭМ-100 при ускоряющих напряжениях 75 и 80 кВ.

Исследования продолжков перекисного окисления липидов (ПОЛ) диеновых конъюгатов (ДК), гидроперекисей (ГП), шиффовых оснований (ШО) проводили спектрофотометрическим методом по Е.И. Львовской и соавт. (1991), малонового диальдегида (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой (В.Б. Гаврилов и соавт., 1987).

Достоверность различий рассчитывалась по критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования Микро- и ультраструктура тиземизированной почки собаки. Морфологическая картина изменений, происходящих в почечной паренхиме при консервации бесперфузионной гипотермией, в различные сроки показала, что на 30 мин на светомикроскопом уровне не обнаружено каких-либо значительных изменений.

Ультраструктура ткани почки отличается от таковой в контрольной группе лишь незначительными изменениями внутриклеточных структур нефроцитов: проксимальных канальцев, выстлавшихся в неравномерном утолщении базальной мембраны, увеличении расстояния между соседними складками базального лабиринта.

В некоторых митохондриях наблюдалось снижение электронно-оптической плотности матрикса и расширение крист.

Цитоплазма эпителиальных клеток извитой части сегмента просветлена, хроматин ядер агрегирован маргинально.

К 60 мин консервации, явления деструкции клеток становятся более выраженными. На электронограммах определяется выраженное увеличение в объеме эндотелиальных клеток, изменения их ядра, набухание гиалоплазмы, отек оргanelл свидетельствующие о парабитотических процессах. Набухание распространено вплоть до периферии клеток, содержащей поры.

Ультрамикроскопические изменения подцеллюлитов обнаруживаются уже на 30 мин и захватывают, прежде всего, недискулы и их «подшвы». Последние утолщаются и приобретают иной, чем в норме, рельеф профилей на ультратонких срезах.

Изучение ультраструктуры почек клубочков в более поздние сроки показало, что наиболее выраженные изменения подцеллюлитов отмечаются на 60-120 мин и заключаются в признаках их внутриклеточного отека, вакуолизации цитоплазмы, начальных признаках жировой дистрофии, нарушении структуры и целостности митохондрий.

При дальнейшем углублении гипотермии явления деструкции клеток проксимального отдела усугублялись и достигали максимума к 120 мин консервации. Более всего процесс затрагивал митохондрии, которые теряли свою нормальную структуру, набухали и в последствии вакуолизировались. Нарушение ультраструктурной организации апикального отдела выражалось в слушивании микроворсинок, образовании большого количества лизосом. Базальная мембрана претерпевала значительные изменения — от утолщения на 30 мин, до расщепления и фрагментации на 120 мин.

Дегенеративные процессы к 2 часам консервации достигали максимума и определялись светооптически явлениями белковой зернистой и жировой дистрофии. Ядро увеличивается в размерах и приобретает причудливые очертания, края ядра изрезаны, хроматин распределен неравномерно в виде глыбок, наблюдается карнопикноз и карioreксис.

Изменения в дистальном отделе нефрона при гипотермии во многом аналогичны тем, которые были описаны для проксимальных канальцев. Однако, как нами уже указывалось, реакция эпителиальных элементов дистального отдела была менее выраженной, по сравнению с проксимальным.

Результаты проведенных исследований показали, что при охлаждении в нефроне происходят сложные ультраструктурные изменения, развитие которых приводит к изменениям всех клеточных оргanelл. Суть этих изменений заключается в мембранной дезорганизации оргanelлов, отеке цитоплазмы и последующей жировой и белковой дистрофии нефроцитов.

К числу наиболее реактивных и динамичных оргanelлов следует, прежде всего, отнести митохондрии, изменения которых выявляются раньше всего, на самых первых этапах развития патологического процесса.

Электронно-микроскопические данные ультраструктурных изменений нефроцитов канальцев проксимального и дистального отделов нефрона, а также элементов клубочкового фильтра свидетельствуют о том, что эти изменения менее выражены в дистальных отделах, чем в проксимальных. Элементы клубочка более устойчивы к действию гипоксии при низкой температуре, чем клетки канальцевого эпителия.

Анализ результатов общеморфологических и электронно-микроскопических исследований проведенных в динамике свидетельствуют о том, что при гипотермической протекции различные отделы канальцев нефрона изменяются в разной степени. Эти изменения зависят от сроков гипотермии. Максимальный срок сохранности клеточных элементов нефрона, при гипотермической безперфузионной консервации, по данным наших исследований, находится в пределах 60 мин.

Микро- и ультраструктура почечного трансплантата в условиях низкотемпературной гипотермической перфузии. Оценивая данные гистоморфологического исследования почек животных II группы, консервированных низкотемпературной гипотермической перфузией необходимо отметить, что структурные изменения, происходящие в трансплантате, схожи с таковыми в I группе. Но глубина и сроки выявления изменений, от которых зависит жизнеспособность клеток и всего органа, различны.

Так на 30 мин консервации, на светооптическом и ультраструктурном уровнях, не было обнаружено сколь либо значимых изменений структуры почки.

На 60 мин изменения затрагивали, в основном, эпителий нефрона и интерстицию, и заключались в умеренно выраженных явлениях отека. Электронно-микроскопическое исследование

подтверждает наличие признаков отека, что выражалось в набухании оргanelл, микроворсинок щеточной каемки клеток проксимальных канальцев, набухание базальной мембраны.

После 120 мин консервации отмечено усиление отека и начало деструктивно-дистрофических явлений, проявляющиеся в нарушении целостности энергопродукующих и белоксинтезирующих оргanelл.

Анализируя морфологические изменения паренхимы почки консервированной низкопоточной гипотермической перфузией можно отметить, что изменения клеточных элементов нефрона и их ультраструктуры, менее выражены, чем при бесперфузионной холодовой консервации, а пределы сохранности структурных компонентов клеток нефрона, по данным наших исследований, ограничены сроком в 60-120 мин.

Микро- и ультраструктура почечного трансплантата в условиях гипотермии с трансорганиной кислородной инкубацией и после его реперфузии. Анализ морфологических изменений нефрона после 2-х часовой консервации почки трансорганиной газовой инкубацией кислородом по Г.А.Асояну с низкопоточной перфузией в условиях гипотермической защиты показал, что на светоптическом уровне выявляются обратимые изменения, затрагивающие извитые канальцы и в меньшей мере элементы клубочкового фильтра. Это выражалось в дистрофических изменениях эпителиоцитов, отеке эндотелиальных клеток клубочков (Г.А.Асоян, 1990).

Электронно-микроскопически подтверждаются явления отека эндотелия клубочков, изменение формы и размеров большинства оргanelл. Подоциты претерпевают схожие изменения, отражающиеся в утолщении и изменении формы педикул, неравномерном увеличении и трансформации оргanelл, особенно митохондрий.

Таким образом, почки животных IV группы претерпевают менее выраженные морфологические изменения при тех же сроках консервации, чем почки собак двух других основных групп.

При реперфузии почек, консервированных по Г.А.Асояну, с помощью «бионасоса» по Ю.М.Допухину повреждения, нанесенные ишемией во время консервации, становятся явными.

Так на 30 мин реперфузии выявляется спазм артериол, в извитых канальцах нефрона дистрофия эпителия. Явления

ангиоспазма и вазодилатации оказываются обратимыми сами по себе, однако не следует забывать, что связанные с ними очаговые нарушения поставки питательных веществ могут приводить к необратимым очаговым повреждениям структуры почек.

К 60 мин повреждения становятся явными. В связи с этим значительно увеличивается глубина деструктивных изменений и обширность поражения паренхимы почек по сравнению с аналогичными сроками консервации. Основное выражение это находит в различных деструктивных изменениях элементов фильтрационно-реабсорбционных барьеров почки.

При исследовании различных отделов канальцевых компонентов нефрона наиболее выраженные изменения были обнаружены в эпителии проксимального отдела.

Включенные в кровообращение почки с 2-х часовым сроком реперфузии обнаруживают признаки нарушения микроциркуляции в органе, свидетельством чего являются стаз крови и лейкоцитарные тромбы в просветах артериол и капилляров, выраженный отек всей почечной ткани.

Электронно-микроскопически эндотелий клубочка сравнительно интактен. Просвет капилляров сужен. Эпителий проксимальных канальцев набухший, митохондрии увеличены, щеточная каемка гомогенизирована.

Состояние процессов перекисного окисления липидов мембранных структур почечного трансплантата в условиях низкопоточной гипотермической перфузии. Анализ процессов перекисидации липидов, в различные сроки консервации показал, что происходит достоверная эскалация содержания первичных продуктов ПОЛ. Так содержание ДК в перфузате увеличивалось - на 30 мин в 3 раза, на 60 мин в 3,7, а на 120 - в 4,1 раза по сравнению с исходными данными, ГП - на 30 мин в 1,2 раза, на 60 мин - в 2, а на 120 - в 2,3 раза (табл. 1).

Плавное, незначительное повышение содержания первичных продуктов ПОЛ в первые 30 мин консервации, по-видимому, объясняется компенсаторно-приспособительными реакциями клетки, когда на фоне понижения обмена веществ при гипотермии, не происходит значительной активации процессов свободнорадикального окисления и используются эндотенные запасы кислорода и макроэргических соединений.

Дальнейшее нарастание значений связано с активацией

процессов ПОЛ к 60 мин, происходящих в мембранных образований клеточных структур, которые к 120 мин достигают максимальных дифр. Эти данные напрямую коррелируют с данными, полученными при гистоморфологическом исследовании, где доказано нарушение структуры клеточных мембран и органоелл.

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ в перфузате в условиях низкотемпературной гипотермической перфузии

Продукты ПОЛ	1 мин (исходное)	30 мин	60 мин	120 мин
ДК	0,42	1,26 ± 0,13*	1,55 ± 0,16*	1,70 ± 0,19*/***
ГП	0,06	0,07 ± 0,007	0,12 ± 0,01*/**	0,14 ± 0,02*/***
МДА	2,31	1,07 ± 0,25*	0,63 ± 0,12*/**	0,87 ± 0,25*
ШО	0,021	0,019 ± 0,0036	0,026 ± 0,0046	0,031 ± 0,0062

Примечание: * - $P < 0,05$ в сравнении с 1 мин (P_1),

** - $P < 0,05$ в сравнении с предыдущим сроком (P_1),

*** - $P < 0,05$ при сравнении 30 мин с 120 мин (P_2).

Изменение уровня ШО, являющихся конечным продуктом, происходит в сторону небольшого понижения на 30 мин – в 1,1 раз по сравнению с контрольными данными, повышения на 60 мин – в 1,2, а на 120 – в 1,5 раза.

Понижение уровня конечных продуктов на 30 мин связано с протективным действием гипотермии на структуру клетки, путем подавления процессов ПОЛ. Но увеличение содержания ШО на 60 и тем более на 120 мин свидетельствуют об активации процессов и усиленном разрушении липидного слоя биомембран.

По иному ведет себя процесс изменения промежуточного продукта – МДА – от резкого понижения на 30 мин в 2,2 раза, на 60 – в 3,7 раза от исходного значения и до полного подъема в 1,4 раза относительно 60 мин значения.

Падение уровня МДА на 30 мин объясняется защитным действием гипотермии на клеточные мембраны. Продолжающиеся понижение содержания промежуточного продукта, по-видимому, связано с пологим действием гипотермии в сочетании с перфузией, когда продукты жизнедеятельности клеток, не задерживаются в органе, а вымываются с перфузатом.

Но предел защитного действия гипотермии неуклонно

приближается к 60 мин, после чего происходит перелом и неизбежная эскалация процессов перекисления липидов биологических мембран клетки к 120 мин.

Таким образом, анализируя данные морфологического и биохимического исследования можно с уверенностью сказать, что признаки деструктивно-дистрофических изменений, доказанных морфологически находят в прямой зависимости от уровня процессов перекисного окисления липидов, и достигают максимума при консервации гипотермической перфузией 120 мин.

Состояние процессов перекисного окисления липидов мембранных структур почечного трансплантата в условиях гипотермии с трансорганной кислородной инсуффляцией и после его реперфузии. Процессы ПОЛ в ткани почки экспериментальных животных в 4 группе протекали неодинаково (табл. 2). Так первичные продукты перекисидации плавно повышались, для ДК – от 0,54 до 0,82, для ГП – от 0,09 до 0,14 отн.ед. Подобно вели себя и конечные продукты (ШО) – плавная эскалация от 0,014 на 1 мин и до 0,017 отн.ед. к 120 мин реперфузии.

Таблица 2

Содержание продуктов ПОЛ в перфузате в условиях гипотермии с трансорганной кислородной инсуффляцией и после его реперфузии

Прод-ты ПОЛ	1 мин (исходное)	30 мин	60 мин	120 мин
ДК	0,54 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,65 ± 0,04*	0,82 ± 0,06*/**/***
ГП	0,09 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,1 ± 0,007	0,14 ± 0,01*/**/***
МДА	1,45 ± 0,14	1,33 ± 0,13	1,45 ± 0,18	1,34 ± 0,21
ШО	0,014 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,017 ± 0,002*/***

Примечание: * - $P < 0,05$ в сравнении с 1 мин (P_1),

** - $P < 0,05$ в сравнении с предыдущим сроком (P_1),

*** - $P < 0,05$ при сравнении 30 мин с 120 мин (P_2).

Вторичные продукты (МДА) волнообразно изменялись от 1,45 на 1 мин к 1,33 на 30 мин и повторное повышение до исходных значений к 60 мин до 1,45, с последующим снижением до 1,34 нмоль/мл к 120 мин.

Плавное повышение начальных и конечных продуктов объясняется незначительной активацией процессов ПОЛ, вследствие того, что при реперфузии повреждения, нанесенные гипоксией за время консервации, становятся явными. Это предположение подтверждается как гистоморфологически, так и

электронно-микроскопически.

Волнообразное изменение цифр промежуточных продуктов на примере МДА, по-видимому, объясняется следующим. Снижение уровня на 30 мин обусловлено активным подавлением процессов ПОЛ эндогенными антиоксидантами, поступающими с кровью.

К 60 мин происходит истощение антиоксидентальной способности крови, что и обуславливает эскалацию до исходных цифр. К 120 мин процессы перекисидации приходят к баглансу вследствие того, что образование свободных радикалов уже не происходит, а те, что образовались в процессе консервации, нейтрализованы или вымыты из органа током крови.

На наш взгляд, плавное повышение начальных и конечных продуктов объясняется незначительной активацией процессов ПОЛ, вследствие того, что при реперфузии повреждения, нанесенные гипоксией за время консервации, становятся явными. В частности, волнообразная динамика концентрации промежуточных продуктов, по-видимому, объясняется активным подавлением процессов ПОЛ эндогенными антиоксидантами, поступающими с кровью. Уже на 60 минуте постепенно наступает истощение антиоксидентальной способности крови, а к 120 минутам процесс перекисидации стабилизируется.

ВЫВОДЫ

1. Канальцевая система нефрона более чувствительна к ишемии, чем почечный клубочек, а реакция эпителиальных элементов канальцев дистального отдела нефрона менее выражена, по сравнению с проксимальным. На 60 мин наступают явления деструкции клеток (увеличение в объеме эндотелиальных клеток, изменения их ядра, набухание гиалоплазмы, отек органелл), а на 120 мин - признаки внутриклеточного отека, вакуолизации цитоплазмы, начальных проявлений жировой дистрофии, а также нарушенной структуры и целостности митохондрий.

2. При НПП максимальный срок сохранности клеточных элементов нефрона находится в пределах 60-120 минут. На 60 мин наступают изменения эпителия нефрона и интерстиция (отек, набухание органелл, микроворсинок щеточной каемки, клеток проксимальных канальцев, базальной мембраны). После 120 мин отмечено усиление отека и начало деструктивно-дистрофических

явлений (нарушение целостности энергопродукующих и белоксинтезирующих органелл).

3. При ТОКП во все сроки исследования выявляются обратимые изменения, затрагивающие извитые канальцы и в меньшей мере элементы клубочкового фильтра (дистрофические изменения эпителиоцитов, отек эндотелиальных клеток клубочков, изменение формы и размеров органелл, подоцитов). Почка претерпевает менее выраженные морфологические изменения при тех же сроках консервации, чем почка собак при НПП.

4. Анализ процессов перекисного окисления липидов отражает изменения в белково-липидном слое мембран клетки и коррелирует с изменениями, подтвержденными на морфологическом уровне.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На основании своевременной диагностики ишемических повреждений почечного трансплантата, оценки его жизнеспособности на уровне поиска морфологического эквивалента функциональных изменений и функционального прогноза на практике трансплантации почки уже до операции можно предпринять меры физиологической защиты и тем самым предотвратить реперфузионные повреждения почечного трансплантата.

2. В процессе консервации для оценки состояния почечного трансплантата ранним и высокоинформативным является гистоморфологическая диагностика, которая имеет несомненное преимущество перед функциональными методами исследования и дает возможность судить о степени сохранения структурной целостности и функциональной полноценности почечного трансплантата.

3. В результате сравнительной оценки микро- и ультраструктуры почки независимо от способа перфузионной защиты в ишемизированной почке глубина структурно-функциональных нарушений выражена в достаточной большой степени. Для эффективной профилактики реперфузионных повреждений ишемизированных почек желателен использовать методику ТОКП.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Концепция организации и функционирования трансплантологической службы в Кыргызстане в переходный период // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.185-204. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
2. Трансплантология: Проблемы селекции доноров (сообщение №1) // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.204-218. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
3. Трансплантология: Проблемы селекции доноров (сообщение №2) // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.218-233. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
4. Трансплантология: Проблемы селекции доноров (сообщение №3) // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.234-245. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
5. Трансплантология: Проблемы селекции доноров (сообщение №4) // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.245-258. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
6. Трансплантология: Проблемы селекции донорских органов (сообщение №1) // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.258-268. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
7. Трансплантология: Проблемы селекции донорских органов (сообщение №2) // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.269-278. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
8. Трансплантология: Проблемы селекции донорских органов (сообщение №3) // В кн.: Проблемы трансплантологии / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 1999. - С.279-292. (соавт. И.А.Ашимов, Т.А.Акматов).
9. Сравнительная энзимологическая оценка интактной и ишемизированной почки в режиме гипотермической защиты с ретроградной кислородной инфузией // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности,

- перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С. 66-71. (соавт. К.М.Эрешов, Ж.И.Ашимов).
10. Сравнительное изучение процессов перекисного окисления липидов почечного трансплантата в условиях фармакологической защиты // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.92-96. (соавт. Р.Т.Эренбаев, А.З.Урдинев).
 11. Морфологическое и ультраструктурное строение нормальной почки собаки // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.96-108.
 12. Свободно-радикальные процессы в норме и при патологии // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.108-114.
 13. Морфологические изменения ночечного трансплантата при консервации методом безперфузионной гипотермии // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.114-118. (соавт. Т.К.Кадырбаев, Р.Т.Эренбаев).
 14. Морфологические и патобioхимические изменения почечного трансплантата при консервации методом перфузионной гипотермии // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.118-122. (соавт. И.А.Ашимов, Э.Т.Омуралиева).
 15. Морфологические и патобioхимические изменения почечного трансплантата при консервации методом гипотермической перфузии с трансорганной газовой инфузией кислородом с последующей реперфузией // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.122-127. (соавт. Т.К.Кадырбаев, К.Б.Абдыкеримова).
 16. Актуальность выбора криопротектора // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. - Бишкек, 2002. - С.130-134. (соавт. К.Б.Абдыкеримова, Э.Т.Омуралиева).
 17. Характеристика распротранненности различных фенотипов у основных этнических групп в Кыргызстане и

Методические основы организации службы тканевого типирования // В кн.: Трансплантология в Кыргызстане: проблемы, трудности, перспективы / Сб. науч. трудов. – Бишкек, 2002. – С.148-150. (соавт. Э.Т.Омуралиева, К.Б.Абдыкеримова).

18. Медицинский проект «Трансплантация» // журнал «Хирургия Кыргызстана». – 1999. - № 2. – С.7-20. (соавт И.А.Ашимов, Р.Т.Эгенбаев).

19. Морфобихимическая оценка и прогнозирование жизнеспособности почечного трансплантата при консервации методом гипотермической трансорганичной газовой перфузии // журнал «Хирургия Кыргызстана» – 2004. - № 2. – С. 134-139. (соавт Р.Т.Эгенбаев, К.Б.Абдыкеримова).

20. Гистохимическая оценка почек в период 2-х часовой тепловой ишемии и холодовой консервации с применением фармакологических средств // журнал «Хирургия Кыргызстана». – 2004. - № 2. – С. 139-142. (соавт Р.Т.Эгенбаев, Г.К.Кадыралиев).

21. Влияние препарата из смеси флавоноидов и фенольных соединений на кислую и щелочную фосфолазы печени при криоконсервации // журнал «Медицинский журнал Казахстана». – 2004. - № 2-3. – С. 113-117. (соавт К.Б.Абдыкеримова, Р.Р.Тухватшиной).

РЕЗЮМЕ

диссертации Сулайманкулова Р.М. на тему: «Патоморфологическая и патобихимическая оценка и прогнозирование жизнеспособности почечного трансплантата» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.27 – хирургия

Ключевые слова: почечный трансплантат, гипотермическая консервация, перфузия, реперфузия, световая и электронная микроскопия, перекисное окисление липидов.

Цель исследования: Изучить динамику морфологической перестройки почечного трансплантата на светоптическом и ультраструктурном уровнях в зависимости от метода и срока его консервации для своевременной оценки его жизнеспособности, а также гипотермизации и профилактики реперфузионных повреждений.

Методы исследования: Материалы для патоморфологических и патобихимических исследований

получены у экспериментальных животных в виде биопсии фрагмента почечного трансплантата и забора оттекающей крови и перфузата на 1, 30, 60 и 120 минутах. Проводили микроскопию и электронно-микроскопическое исследование почечных биоптатов. Изучены процессы тканевого перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты и шиффовы основания спектрофотометрическим методом, малоновый диальдегид по реакции с тиобарбитуровой кислотой).

Полученные результаты и их новизна. Установлено, что канальцевая система нефрона более чувствительна к ишемии, чем почечный клубочек, а реакция эпителиальных элементов канальцев дистального отдела нефрона менее выражена, по сравнению с проксимальным. Уже на 60 мин наступают явления деструкции клеток, а на 120 мин - нарушения структуры и целостности митохондрий.

При НПП на 60 мин наступают изменения эпителия нефрона и интерстиция, а спустя 120 мин - нарушение целостности энергопродуцирующих и белоксинтезирующих оргanelл, тогда как при ТОКП во все сроки исследования выявляются обратимые изменения, затрагивающие извитые канальцы и в меньшей мере элементы клубочкового фильтра.

Область применения: трансплантология, хирургия, урология, нефрология.

Библиография: 157 источников. Иллюстрации – 1 таблица, 34 рисунка.

14.00.27 - хирургия адистиги боюнча медициналык илимдеринин кандидатты даражасын жактоо үчүн «Бейрек трансплантатынын жашап кетишин гистозьезимологиялык баалоо жана болжолдоо

«Бейрек трансплантатынын жашоо жөндөнүүлүгүнүн патоморфологиялык, патобихимиялык баа берүү жана болжолдоо» темасы боюнча Сулайманкулов Руслан Мамисовичтин

диссертациясына

КЫСКАЧА КОРТУНДУСУ

Жандоочу сөздөр: бейрек трансплантанты, гипотермиялык консервация, перфузия, реперфузия, жарык жана электрондук микроскопия, липиддердин перекисстик кычкылдалышы.

Изилдөөнүн максаты: бөйрөк транспланттыннын жашоо жөндүүлүгүнө убагында баа берүү жана реперфузиондук жаракаттарды прогноздоп, профилактика жүргүзүү үчүн, жарыкоптуккалык жана ультрасруктурдук дэнгээлдеги консервациянын мөөнөтү жана методуна жараша морфологиялык кайра куруусунун динамикасын изилдөө.

Изилдөөнүн методдору: патоморфологиялык жана патофизиологиялык изилдөөлөр үчүн материалдар эксперименттик жаныбарлардан бөйрөк органдарынын биопсия фрагменттери жана бөйрөк каны түрүндө 1-, 30-, 60- жана 120-минуталарда алынган. Бөйрөк биоптаттарынын микроскопиясы жана электрондук микроскопиялык изилдөө жүргүзүлгөн. Ошондой эле липиддердин тжандык перекисстик кычкылдануу процесстери аныкталган (диендик конъюгаттар жана шифтик негиздер спектрофотометрдик метод боюнча, ал эми малондук диальдегиддин тиобарбитурдук кислота менен жүргөн реакция боюнча).

Алынган жыйынтыктар жана алардын жакшылыгы: изилдөөлөрүнүн негизинде нефрондун каналчалар системасы бөйрөк түйүнө караганда ишемия оорусуна азыраак чалдыгуусу аныкталган. Ал эми нефрондун дисталдык бөлүгүнүн каналчаларынын эпителиалдык элементтеринин рекакциясы, проксималдууга салыштырмалуу азыраак байкалды. Изилдөө көрсөткөндөй, 60-минутунда эле клеткалардын бузулуу процесси башталат, ал эми 120-минутасында митохондриялардын түзүлүшүнүн жана бүтүндүгүнүн бузулуусу башталат.

НПП учурунда, 60-минутадан кийин нефрондун эпителиинде жана интерстицида өзгөрүүлөр жүрүп, 120-минутадан кийин энергия бөлүп чыгаруучу жана белок синтездөөчү оргanelлалардын бүтүндүгү бузулат.

Ал эми ТОКПда изилдөөнүн бардык мөөнөттөрүндө кайра кайтуугу өзгөрүүлөр жүрдү. Бул өзгөрүүлөр каналчаларга жана азыраак денгээлде түйүнө филтринин элементтерине тасир этет.

Колдонуу областтары: трансплантология, хирургия, урология, нефрология.

Библиография: 157 маалымат булактары; иллюстрациялар: 1 таблица, 34 сүрөт.

RESUME

Of the dissertation "Pathomorphological and pathobiochemical estimation and prognosis of livability of kidney transplant" by Ruslan Ivelsovich Sulaimankulov, for the scientific degree of Candidate of Medicine on the specialty 14.00.27 - "Surgery"

Key words: kidney transplant, hypohelmic conservation, perfusion, reperfusion, optical and electronic microscope, lipid peroxidation.

Purpose of the research: to study the dynamic of morphological reconstruction of kidney transplant at the critical and ultrastructural level depending on the method and terms of its conservation for timely estimation of its livability and for predicting and preventing reperfusional damages.

Methods of research: Materials: for pathomorphological and pathobiochemical survey were taken from the experimental animals through biopsy of a part of kidney transplant and collecting reflow blood and perfusate at 1st, 30th, 60th and 120th minutes. Microscopy and electronic microscopy of the kidney biopsies was also held. Processes of lipid peroxidation in the patterns were studied (diethenoid conjugates and Schiff bases were studied through spectrophotometric research, malonic dialdehyde was studied through its reaction with thiobarbituric acid).

Obtained results and their newness: It was found out that capillary system of a nephron is more sensible ischemia to than the marginalian tuft, and the reaction epithelial elements of the capillary of the distal part of the nephron is less intense than that of proximal part. At the 60th minute the signs of cells destruction appear, and at 120th minute damages of structure and mitochondrial integrity start.

At the low-level perfusion at 60th minute the changes of the nephron's epithelium and interstitium start, and in 120 minutes the integrity of energy producing and protein synthesing organelles becomes damaged. With the trans-organic oxygenic perfusion during all the terms of research irreversible changes of spiral tubule and, to less extend, elements of marginalian tuft were observed.

Field of application: transplantology, surgery, urology, nephrology.

Bibliography: 157 sources. Illustrations: Table, 34 pictures.