© Баринов Е.Ф., Карасьов І.В.

УДК 616-001.017-07-089

МЕТАБОЛІЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ АДАПТАЦІЙНИХ РЕАКЦІЙ НЕФРОНІВ ПІСЛЯ ТЕРМІЧНОЇ ТРАВМИ ШКІРИ

Е.Ф.Баринов, І.В.Карасьов

Кафедра гістології (зав. – проф. Е.Ф.Баринов) Донецького державного медичного університету ім. М. Горького

Використання функціональних навантажувальних проб у нефрології є досить рутинним підходом у тих випадках, коли необхідно оцінити ступінь функціональної повноцінності нирок. У цьому зв'язку найменш вивченим залишається метаболізм нефронів, що забезпечує реалізацію адаптаційних реакцій. Очевидно, що з'ясування механізмів, які підтримують енергозабезпечення і біосинтез у клітинах нефрону, дозволить не тільки прогнозувати перебіг захворювань нирок, але й окреслити шляхи удосконалення медикаментозної терапії. Особливо актуальна така постановка питання в ситуаціях, пов'язаних з розвитком поліорганної недостатності після тяжких термічних травм шкіри. Тривале порушення функції нирок і не зовсім зрозумілі саногенетичні механізми потребують детального аналізу метаболізму нефронів з урахуванням індивідуальної реактивності організму.

Мета дослідження. З'ясувати на основі гістоензимохімічного дослідження характер метаболічного забезпечення адаптаційних реакцій нирки після термічної травми шкіри, відтвореної в щурів з різною адренореактивністю організму.

Матеріал і методи. *Експериментальні дослідження виконані на 63 щурах-самцях лінії Вістар масою 280-310 г з різним станом індивідуальної реактивності організму, яку оцінювали визначенням in vitro сенситивності α_2-адренорецепторів тромбоцитів після інкубації з мезатоном (1-100 мкМ). На підставі отриманих даних виділили дві групи тварин зі зміненою реактивністю – гіперреактивні (2-га група, n=23) і гіпореактивні (3-тя група, n=27) та групу нормореактивних тварин. Як контроль досліджували інтактних щурів (n=13) з відповідним станом реактивності організму. Експериментальним тваринам під наркозом моделювали термічну травму шкіри площею 20-25% від загальної поверхні тіла. Через 1 міс після опіку шкіри водяну депривацію відтворювали 30 щурам, яких залишали без води на 24 години. Метаболізм нефронів досліджували до і після функціонального навантаження за допомогою цитохімічних методів виявлення активності на кріостатних зрізах (7±1 мкм) таких ферментів: сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1, СДГ), альфа-гліцерофосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.8, α-ГФДГ), анаеробної (КФ 1.1.1.27, $ЛДГ_м$) і сумарної лактатдегідрогенази (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49, Г-6-ФДГ), мітохондріальної і цитоплазматичної малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37, МДГ-НАД; 1.1.1.40, МДГ-НАДФ), мітохондріальної і цитоплазматичної глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2, ГДГ-НАД, ГДГ-НАДФ), НАД•Н- (КФ 1.6.99.3) і НАДФ•Н-діафорази (КФ 1.6.2.5) [1]. Для контролю частину зрізів інкубували при відсутності субстратів у середовищі. Кількісну оцінку продукту гістохімічних реакцій проводили в 4 ділянках нирки за визначенням Pfaller (зовнішня і внутрішня кіркова речовина – 1-ша і 2-га зони, зовнішня і внутрішня смужка зовнішньої мозкової речовини – відповідно 3-тя і 4-та зони) денситометрією зрізів на мікроскопі Olympus і виражали в умовних одиницях оптичної щільності. Отриманий цифровий матеріал обробляли статистично з використанням методів варіаційної статистики.*

Результати дослідження та їх обговорення. Реакція клітин дистальних звивистих канальців (ДЗК) нефронів 1-ї і 2-ї зони на водну депривацію виявлялася інтенсифікацією гліколізу (більш вираженою в юкстамедулярних нефронах) – сумарна активність ЛДГ зростала відповідно на 30,05±1,04% і 53,41±2,17% ($p<0,05$) порівняно зі значеннями до навантаження. Підвищення відношення $\Delta ЛДГ/\Delta ЛДГ_м$ може свідчити про переважну активацію аеробної фракції ЛДГ. Збере-

ження відношення НАД•Н-ДГ/СДГ у ДЗК 1-ї групи підтверджує оптимальність сполучення гліколізу і циклу трикарбонових кислот (ЦТК), а отже – ефективність функціонування адаптаційних реакцій клітин даного канальця нефронів. Внаслідок недостатньої активації НАД•Н-ДГ у клітинах ДЗК 2-ї зони нирки додаткове постачання субстратів у дихальний ланцюг забезпечував приріст α-ГФДГ (на 29,03±1,63% у порівнянні з фоновими значеннями), що випереджало накопичення НАД•Н у цитоплазмі і перешкоджало гальмуванню гліколізу. Варто підкреслити, що при збереженні активності піридинових дегідрогеназ ЦТК на рівні вихідних значень енергозабезпечення адаптаційної реакції нефронів при водній депривації забезпечувалося менш ефективним механізмом – гліколізом.

Реакція на водну депривацію у товстій висхідній частині петлі Генле (ТВЧПГ) 3-ї і 4-ї зони мала подібну тенденцію. Судячи з активності ЛДГ і її фракції $ЛДГ_м$, знижувалося аеробне окиснення глюкози і зростав анаеробний гліколіз. Проте, якщо в 3-й зоні відновлені форми цитоплазматичного НАД переносилися в мітохондрії гліцерофосфатним човниковим механізмом, підтвердженням чого служило підвищення на 15,81±0,29% ($p<0,005$) активності α-ГФДГ порівняно з фоновими значеннями, то гальмування цього ферменту у ТВЧПГ 4-ї зони обмежувало завантаження другої ланки дихального ланцюга. Знижувалася ефективність і мітохондріального утворення енергії, оскільки значно низькою була активність НАД-залежних ферментів циклу Кребса, зокрема, МДГ-НАД. Істотне зниження активності ГДГ-НАД обмежувало постачання додаткової кількості субстратів окиснення в ЦТК. Про більш виразний енергодефіцит у клітинах ТВЧПГ 4-ї зони свідчила і низька активність СДГ (знижувалася на 67,3±2,1%, $p<0,05$ порівняно з фоновими значеннями). Паралелізм у динаміці НАД•Н-ДГ і СДГ при незмінних значеннях Г-6-ФДГ у ТВЧПГ 3-ї зони підтверджував зниження додаткового надходження інтермедіатів ЦТК.

Відмінності в активації гліколізу і ЦТК клітин ДЗК 1-ї і 2-ї зон у гіпореактивних щурів стосувалися спектру додаткових субстратів, що надходять у ЦТК і дихальний ланцюг. У ДЗК 1-ї зони на 26,19±0,88% ($p<0,05$) збільшилася активність α-ГФДГ, що виявилося компенсаторною реакцією, спрямованою на постачання електронів і протонів у мітохондрії на другу ділянку дихального ланцюга. Додатковим субстратом для роботи ЦТК клітин ДЗК 2-ї зони був глутамат, який за допомогою активізованої ГДГ-НАД трансформувався в α-кетоглутурат. Однак ступінь приросту МДГ-НАД був вірогідно меншим, ніж приріст активності НАД•Н-ДГ, що свідчило про залучення аспартату для регенерації оксалоацетату і підтримки ЦТК.

Збільшення енергопостачання транспортних процесів у ТВЧПГ 3-ї зони нирки відбувалося завдяки інтенсифікації роботи гліколізу і ЦТК. Однак шляхи інтенсифікації ЦТК істотно відрізнялися від таких у ДЗК. Принципово інший, більш ефективний внутрішньоклітинний адаптаційний механізм використовували ТВЧПГ 3-ї групи. Привертає до себе увагу статистично вірогідне зниження активності ізоферменту $ЛДГ_м$ і збільшення МДГ-НАД. При посиленні надходження пірувату з гліколізу його додаткове постачання забезпечувала спільна діяльність МДГ-НАДФ і пентозо-фосфатного шляху. У клітинах ТВЧПГ 4-ї зони на висоті функціонального навантаження більший приріст активності НАД•Н-ДГ порівняно з активністю МДГ-НАД, ймовірно, пов'язаний із залучанням цитоплазматичного аспартату як джерела додаткового утворення оксалоацетату, що надходить у ЦТК. Статистично значуще підвищення активності ЛДГ і Г-6-ФДГ віддзеркалює взаємозв'язок процесів активації пентозофосфатного шляху і додаткового надходження субстратів окиснення в гліколіз. Підвищення відношення НАД•Н-ДГ/НАДФ•Н-ДГ свідчило про переважне забезпечення енергозатрат зростаючих транспортних процесів завдяки зниженню енергозабезпечення внутрішньоклітинних біосинтетичних процесів у ТВЧПГ юкстамедулярних нефронів до кінця водної депривації.

Отже, наші дослідження показали, що при водній депривації у тварин з різною адренореактивністю у ТВЧПГ нефронів реакція гліколізу і ЦТК була діаметрально протилежною. У гіперреактивних щурів у

ТВЧПГ в обох групах нефронів була знижена інтенсивність гліколізу і ЦТК, тоді як у гіпореактивних спостерігалася їх інтенсифікація за рахунок залучання різних анаплеротичних реакцій. В експериментальних тварин у ДЗК нефронів мала місце подібна інтенсифікація основних метаболічних шляхів. Причому в ДЗК гіперреактивних щурів у метаболізмі юкстамедулярних нефронів домінував гліколіз, тоді як у гіпореактивних тварин – ЦТК. У кіркових нефронах мала місце подібна тенденція до активації гліколізу і ЦТК.

Встановлено, що формування адаптаційних реакцій в нирці пов'язано з активацією гліколізу і ЦТК. Причому збільшення енергозабезпечення може досягатися завдяки інтенсифікації окремих реакцій ЦТК [2], а досягнутий результат у вигляді підвищення активності відповідних ферментів може зберігатися протягом тривалого періоду [3].

Результати проведеного дослідження переконливо засвідчують виражену мітохондріальну дисфункцію ТВЧПГ гіперреактивних щурів, що обумовлює зниження транспортних процесів у канальцях нефрону [4]. Між ініціацією цих механізмів при стресі й адренореактивністю організму простежується визначений взаємозв'язок. Так, активація внутрішньоклітинної протеїнкінази С, наприклад, при зв'язуванні α-адренорецепторів з агоністами, сприяє мітохондріальній дисфункції і пригнічує транспорт іонів натрію в канальцях [5]. Однією з можливих цілей дії протеїнкінази С може бути НАДФ•Н-оксидаза, що генерує утворення активних форм кисню [6]. Підвищена хемосенситивність α-адренорецепторів стимулює ренін-ангіотензинову систему, наслідком чого також є порушення структури і функції мітохондрій [7]. Тому логічно припустити компенсаторну інтенсифікацію гліколітичних реакцій у канальцях нефронів гіперреактивних щурів, яка нами спостерігалася в ДЗК.

У гіпореактивних щурів, генетично детермінованих на високу продукцію $ПГЕ_2$, у мозковій речовині нирки можна припустити посилення транспорту іонів натрію у ТВЧПГ за умов достатніх адаптаційних резервів канальцевих клітин. Модулювати функцію мітохондрій у клітинах канальців нефрону може NO і зв'язані з ним епоксиейкозатрієнові кислоти [5]. Водночас, як показали результати математичного моделювання, гліколіз має виняткове значення для функціонування осмоконцентраційного механізму. Лактат не метаболізується у внутрішній медулі нирки, що є гіпоксичною зоною нирки. Фізіологічний рівень лактату підвищує осмолярність мозкової речовини, накопичуючи в ньому іони Na^+. У цьому контексті активність гліколізу є чутливим індикатором ефективності функціонування осмоконцентраційного механізму.

Основу виявленої гетерогенності ступеня метаболічної адаптації канальців нефронів тварин може закладати як обумовлена термічною травмою селективна альтерація канальцевих клітин, так і експресія генів, що забезпечують гліколіз, наприклад GLUT-1 [8]; можливість up-regulation протеїнкіназою А ізомеру 6-фосфофрукто-2-кінази [9]; а також наявність ізоформ PDK-2 PDK-4 кінази піруватдегідрогенази, здатних фосфорилювати та інактивувати піруватдегідрогеназний комплекс [10].

Висновок. Використання водної депривації дозволило виявити зрив адаптаційних реакцій товстої висхідної частини петлі Генле нефронів гіперреактивних тварин, що пояснюють причини формування функціональної неповноцінності органа у віддалений термін після термічної травми шкіри.

Перспективи наукового пошуку. Обгрунтованою є перспектива подальших досліджень щодо з'ясування взаємозв'язку метаболічного забезпечення адаптаційних реакцій нефронів після термічної травми шкіри з головним енергозалежним процесом ниркових канальців – реабсорбцією іонів натрію.

Література

1. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. – М.: Свет, 1982. – 272 с. 2. Nikiforov A.A., Ostretsova I.B. Effects of metabolic substrates and inhibitors on weak organic anion transport in rat renal proximal tubules // Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M.Sechenova. – 1997. – V. 83, № 5-6. – P. 165-189. 3. Rezzani R., Angoscini P., Borsani E. et al. Cyclosporine A-induced toxicity in two renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK) // Histochem. J. – 2002. – V. 34, № 1-2. – P. 27-33. 4. Takebayashi S., Jimi S., Segawa M.,

Takaki A. Mitochondrial DNA deletion of proximal tubules is the result of itai-itai disease // Clin. Exp. Nephrol. – 2003. – V. 7, № 1. – P. 18-26. 5. Nowak G., Grant D.F., Moran J.H. Linoleic acid epoxide promotes the maintenance of mitochondrial function and active Na^+ transport following hypoxia // Toxicol. Lett. – 2004. – V. 147, № 2. – P. 161-175. 6. Kitada M., Koya D., Sugimoto T. et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy // Diabetes. – 2003. – V. 52, № 10. – P. 2603-2614. 7. Tomitsuka E., Goto Y., Taniwaki M. Direct evidence for expression of type II flavoprotein subunit in human complex II (succinate-ubiquinone reductase) // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 11, № 3. – P. 774-779. 8. Dominguez J.H. Studies of renal injury IV: The GLUT1 gene protects renal cells from cyclosporine A toxicity // Kidney Int. – 2002. – V. 62, № 1. – P. 127-136. 9. Marsin A.S., Bouzin C., Bertrand L., Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, № 34. – P. 30778-30783. 10. Sugden M.C., Holness M.J. Therapeutic potential of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases in the prevention of hyperglycaemia // Curr. Drug. Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. – 2002. – V. 2, № 2. – P. 151-165.

МЕТАБОЛІЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ АДАПТАЦІЙНИХ РЕАКЦІЙ НЕФРОНІВ ПІСЛЯ ТЕРМІЧНОЇ ТРАВМИ ШКІРИ

Е.Ф.Баринов, І.В.Карасьов

Резюме. На 63 щурах-самцях лінії Вістар масою 280-310 г з різним станом індивідуальної реактивності організму досліджували метаболічне забезпечення адаптаційних реакцій нирки після термічної травми шкіри. Гістоензимологічні дослідження показали, що в гіперреактивних щурів у товстій висхідній частині петлі Генле інтенсивність гліколізу і циклу трикарбонових кислот (ЦТК) знижена в обох групах нефронів, у гіпореактивних – спостерігалася їх інтенсифікація; у дистальних звивистих канальцях (ДЗК) гіперреактивних щурів у метаболізмі юкстамедулярних нефронів домінував гліколіз, а у гіпореактивних переважав ЦТК. У ДЗК кіркових нефронів мала місце подібна тенденція до активації гліколізу і ЦТК.

Ключові слова: опіки шкіри, метаболізм нефронів, адаптація.

METABOLIC PROVISION OF ADAPTIVE REACTIONS OF NEPHRONS AFTER THERMAL SKIN TRAUMA

E.F.Barinov, I.V.Karasiov

Abstract. The metabolic provision of adaptive renal reactions after a skin trauma has been investigated on 63 male rats of the Wistar line weighing 280-310 g. with a different state of the body's individual reactivity. Histoenzymologic studies have shown that the intensity of glycolysis and cyclotricarboxilic acids (CTA) in the thick ascending portion of Henle's loop (TAPHL) is diminished in both groups of nephrons of hyperreactive rats, while their intensification was observed in hyporeactive ones; glycolysis dominated in the distal convoluted tubules (DCT) of hyperreactive rats in the metabolism of the juxtamedullary nephrons, and CTA was predominant in the hyporeactive rats. A similar tendency towards an activation of glycolysis and CTA occurred in DCT and CTA of the cortical nephrons.

Key words: skim burn, nephron metabolism, adaptation.

M.Gorky State Medical University (Donets'k)

Надійшла в редакцію 07.04.2004 р.