

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ НА ЖИВОТНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Нелли Леонидовна ВОРОНЦОВА, Ирина Юрьевна ЖУРАВЛЕВА,
Ринат Авхадиевич МУХАМАДИЯРОВ, Леонид Семенович БАРБАРАШ

*НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6*

Целью настоящего исследования являлось изучение воздействия острой гипоксии (ОГ) на некоторые звенья метаболизма животных с хронической печеночной недостаточностью (ХПН). Моделирование ХПН проводили путем перевязки правой и центральной печеночных вен ниже места впадения их в нижнюю полую вену; в результате венозного застоя через 12 недель у экспериментальных животных развилась ХПН. Для моделирования ОГ воспроизводили пневмоторакс путем прокалывания мышц в четвертом межреберном промежутке вблизи грудины. Установлено, что воздействие острой гипоксии на организм экспериментальных животных с ХПН вызывает изменение активности ферментов — маркеров печеночного повреждения — в сыворотке крови и в ткани печени. После воздействия ОГ эндогенная интоксикация остается на уровне, отмеченном у животных с ХПН, однако соотношение исследуемых фракций среднемолекулярных пептидов изменяется. Наиболее выражены изменения, обусловленные воздействием ОГ, на систему антиоксидантной защиты. Значительное снижение активности каталазы и суммарной антиоксидантной активности в печени животных свидетельствует о срыве компенсаторных возможностей организма экспериментальных крыс с ХПН после воздействия ОГ. Снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов в печени может быть обусловлено истощением резерва легкоокисляемых липидов.

Ключевые слова: печень, острая гипоксия, венозный застой, печеночная недостаточность, окислительный стресс.

Исследование патогенеза метаболических расстройств, обусловленных воздействием гипоксии, несмотря на значительное количество публикаций, по-прежнему привлекает к себе внимание ученых в связи с необходимостью оптимизации их медикаментозной коррекции [1, 2].

У больных с клапанной патологией, сопровождающейся нарушением кровообращения IIА-IIБ степени, как правило, имеются признаки функциональной печеночной недостаточности [2–4]. Функциональное состояние печени у больных с патологией митрального и трикуспидального клапанов находится в прямой зависимости от стадии (продолжительности) заболевания. Проведение оперативных вмешательств у таких больных сопровождается воздействием острой гипоксии (ОГ) в период искусственного кровообращения (ИК). Кроме того, основной этап кардиохирургических операций завершается реперфузией, которая, восстанавливая адекватный кровоток в органах и тканях, одновременно является пусковым звеном

каскада патофизиологических реакций, выраженность которых во многом определяет дальнейшее состояние организма [2, 4–6].

В этой связи важно дифференцировать метаболические нарушения в печени, обусловленные венозным застоем, наличие и выраженность которых при воздействии операционного стресса и ОГ при ИК определяют вероятность срыва компенсаторных возможностей организма и возникновения послеоперационной острой печеночной недостаточности.

Патобиохимические изменения в крови не всегда полностью отражают суть метаболических нарушений, происходящих на уровне ткани печени. По ряду вопросов максимальную информацию можно получить только в условиях эксперимента при исследовании широкого спектра биохимических показателей как в крови, так и в печени.

Целью данного исследования явилось изучение в эксперименте некоторых метаболических изменений, обусловленных воздействием ОГ на орга-

Воронцова Н.Л. — к.б.н., вед.н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии; e-mail: voronl@cardio.kem.ru

Журавлева И.Ю. — д.м.н., гл.н.с. отдела экспериментальной и клинической кардиологии; e-mail: jmuravl_irina@mail.ru

Мухамадияров Р.А. — к.б.н., доцент., ст.н.с. лаборатории ультраструктурных исследований отдела экспериментальной и клинической кардиологии; e-mail: rem57@rambler.ru

Барбараш Л.С. — академик РАМН, директор; e-mail: bio@cardio.kem.ru

низм животных с хроническим венозным застоем в печени.

Материал и методы

Эксперимент выполнен на половозрелых крысах-самцах линии Вистар с массой тела 250–300 г.

Для моделирования хронической гипоксии выполняли перевязку правой и центральной печеночных вен дистальнее места впадения их в нижнюю полую вену [7]. В результате венозного застоя через 12 недель у экспериментальных животных развивалась хроническая печеночная недостаточность (ХПН). Для моделирования ОГ экспериментальным животным мышцы вблизи четвертого межреберья прошивали, оставляя концы нитей свободными. Пневмоторакс воспроизводили путем прокалывания мышц грудной клетки в четвертом межреберном промежутке вблизи грудины. Через 60 секунд грудную клетку сжимали рукой и соединяли края раны, подтягивая и связывая шовные нити. После этого зашивали кожный разрез. Все манипуляции проводили под эфирным наркозом. После операции выжили все животные.

В качестве контроля использовали группу интактных животных аналогичного возраста и пола. Для оценки механизма действия ОГ на фоне застойной венозной недостаточности использованы животные с экспериментальным хроническим венозным застоем в печени (ХПН) и животные с моделированной ОГ.

Экспериментальные исследования на животных выполняли в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10. 1983, № 267 МЗ

РФ от 19.06.2003 и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правилами по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденными МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977).

Для исследований использовали кровь и печень. Печень отмывали от крови и замораживали до проведения исследований в жидком азоте.

В качестве критерия повреждения печени оценивали активность органоспецифических ферментов в сыворотке крови и в гомогенатах печени. Из ткани печени при охлаждении до 4 °С готовили гомогенаты, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Для определения активности сорбитолдегидрогеназы (СДГ) и аргиназы в ткани печени полученный гомогенат разводили в 40 раз. Активность гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови и гомогенатах печени измеряли кинетически спектрофотометрическими методами, используя диагностические наборы KONE DIAGNOSTICS (Финляндия). Активность холинэстеразы (ХЭ) определяли по реакции с дитио-бис-нитробензойной кислотой. Для измерения активности СДГ использовали спектрофотометрический метод Gerlach [8]. Активность аргиназы определяли по скорости образования продукта реакции – мочевины.

Уровень эндогенной интоксикации определяли по содержанию молекул средней массы (МСМ) путем прямой спектрометрии депротеинизированной сыворотки при длинах волн 254 нм и 280 нм [9].

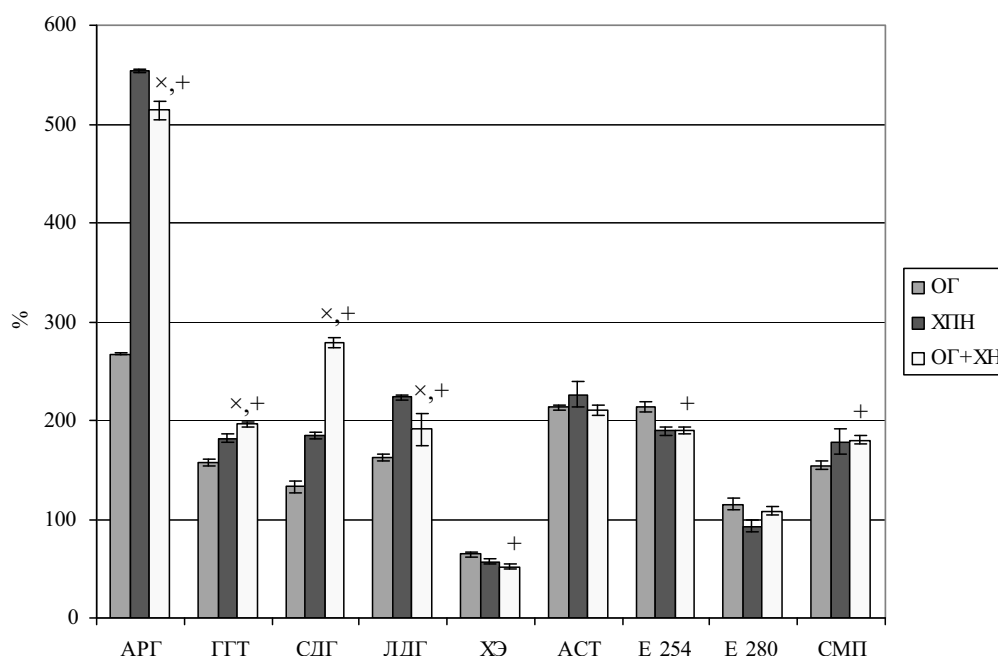


Рис. 1. Изменения параметров сыворотки крови, характеризующих функциональное состояние печени и уровень эндогенной интоксикации. Здесь и на рис. 2 и 3 представленные значения выражены в процентах к величине показателей интактных крыс, принятой за 100 %. Статистически значимые ($p < 0,05$) различия между группами «ХПН + ОГ» и «ХПН» обозначены как ×, между группами «ХПН + ОГ» и «ОГ» – как +

Для оценки суммарного количества МСМ использовали метод, описанный Минским М.И. и соавт. [10].

Для оценки состояния процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови и в гомогенатах печени измеряли содержание основного продукта пероксидации — малонового диальдегида (МДА) по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [11]. Определение величины суммарной антиоксидантной активности проводили с использованием метода [12], в ткани печени, кроме того, оценивали активность каталазы [13]. Для определения количества белка в гомогенатах использовали модифицированный метод Бредфорда с Кумасси синим G-250 [14].

Все измерения проводили на спектрофотометре Ultrospec plus (Pharmacia, Швеция). Статистическую обработку результатов выполняли в программе Statistica 6.0 с расчетом значения средней величины (M) и стандартной ошибки ($\pm m$). Для определения достоверности различий использовали t -критерий Стьюдента. На рисунках исследуемые показатели выражены в процентах к величине показателей интактных крыс, которую принимали за 100 %.

Результаты и обсуждение

Снижение кровообращения в печени и развитие ХПН привели к изменению целого ряда биохимических процессов в гепатоцитах. После воздействия ОГ на фоне хронического венозного застоя в печени, в сыворотке крови животных значительно возрастала активность СДГ ($p < 0,05$), несколько увеличилась активность ГГТ ($p > 0,05$), активности аргиназы и АСТ осталась на уровне, отмеченном после 3-х месяцев хронического венозного застоя (рис. 1).

Значительное снижение активности сывороточной ХЭ при ХПН может быть обусловлено нарушением синтеза фермента гепатоцитами, альтерацией печеночной ткани. После воздействия ОГ отмечено дальнейшее снижение активности ХЭ — с 241,8 до 221,7 ед. ($p < 0,05$).

Несколько иная динамика отмечена в отношении ЛДГ. Активность ЛДГ в сыворотке крови животных опытной группы (ОГ + ХПН) несколько снижена, хотя и осталась на достаточно высоком уровне и почти в 2 раза превышает контрольное значение, отмеченное в крови интактных животных. Следует отметить, что активность ЛДГ при хроническом венозном застое значительно выше, чем при воздействии изолированной ОГ. Принимая во внимание, что ЛДГ обладает высокой органной специфичностью и основной причиной увеличения ее активности в сыворотке является тканевое повреждение, установленные изменения можно расценивать как выраженное гипоксическое повреждение гепатоцитов в результате хронического венозного застоя.

В то время как в сыворотке крови животных опытной группы активность СДГ возрастала и весьма значительно, в ткани печени после воздействия ОГ отмечена тенденция к дальнейшему снижению активности фермента (рис. 2). Содержание белка в печени снижается до 80 % от уровня, установленного в группе контроля. Вместе с тем после острого воздействия гипоксии в печени значительно возрастает активность ГГТ, становясь в среднем в 1,5 раза выше, чем в группе ХПН ($p < 0,05$). Установленные нарушения превосходят изменения, отмеченные в группе животных с ХПН, что позволяет говорить об увеличении тяжести печеночной недостаточности, обусловленной хроническим венозным застоем.

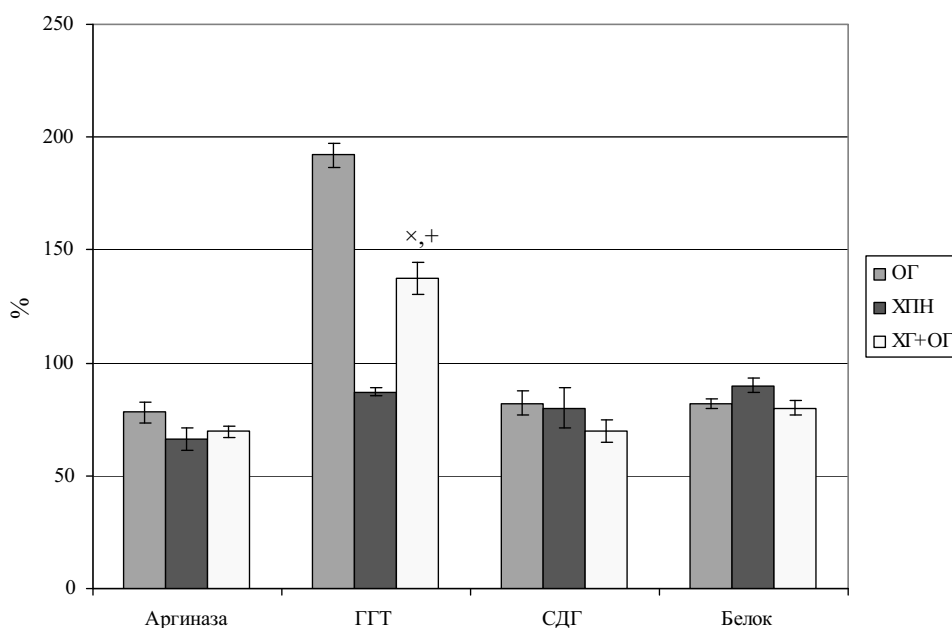


Рис. 2. Биохимические показатели метаболизма печени экспериментальных животных

Уровень МСМ в сыворотке крови после дополнительного воздействия ОГ на организм животных с хроническим венозным застоем практически не изменяется (рис. 1), вместе с тем возросло содержание фракции МСМ, определяемой при 280 нм — на 16 % выше уровня, отмеченного в сыворотке животных с ХПН ($p < 0,05$), однако эта величина была ниже значений, отмеченных после изолированного воздействия ОГ. Содержание фракции E254 осталась практически неизменной.

Наиболее значимые изменения, обусловленные воздействием ОГ на животных с хроническим венозным застоем, установлены при оценке интенсивности свободнорадикальных процессов (рис. 3). Так, в сыворотке крови животных опытной группы значительно, почти в 2 раза, снижена суммарная антиоксидантная активность ($p < 0,05$), при этом уровень МДА в сыворотке крови, несмотря на некоторое уменьшение, остается по-прежнему на достаточно высоком уровне.

Значительные изменения отмечены и в ткани печени животных. Снижение суммарной антиоксидантной активности и активности каталазы в печени животных опытной группы в сравнении с группами контроля, ОГ и ХПН статистически значимо ($p < 0,05$). Вместе с тем уровень МДА в печени крыс группы «ОГ + ХПН» в 2 раза ниже, чем в печени животных после воздействия изолированной ОГ и ХПН.

Полученные результаты позволяют заключить, что воздействие ОГ на организм животных с хроническим венозным застоем в печени определяет каскад дальнейших функциональных нарушений: снижает функциональную активность печени,

угнетает белоксинтезирующую функцию, повышает проницаемость клеточных мембран гепатоцитов.

В печени происходит нарушение соотношения окислительных и антиоксидантных процессов, и как результат — нерегулируемое усиление ПОЛ, приводящее к повреждению клеток. При значительной активации ПОЛ, когда окислительной трансформации подвергается значительная часть липидов и фосфолипидов, физико-химическая и ультраструктурная организация субклеточных мембран может нарушаться.

Установленный факт значительного снижения количества концентрации МДА, одного из основных продуктов ПОЛ, в печени экспериментальных животных при одновременном снижении суммарной антиоксидантной активности и активности каталазы можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак. Мембраны клеток и субклеточных органелл содержат фосфолипиды, в β -положении которых локализованы полиненасыщенные жирные кислоты, легко подвергающиеся перекисному окислению. Снижение содержания продуктов ПОЛ в данном случае может быть обусловлено только истощением резерва легкоокисляемых липидов в ткани печени.

Следует отметить, что развитие эндогенной интоксикации, помимо прочего, в значительной мере потенцируется накоплением продуктов перекисной окисления. Образующиеся в процессе ПОЛ гидроперекиси, ненасыщенные альдегиды и МДА являются мутагенами и обладают выраженной цитотоксичностью: ингибируют синтез белка, окис-

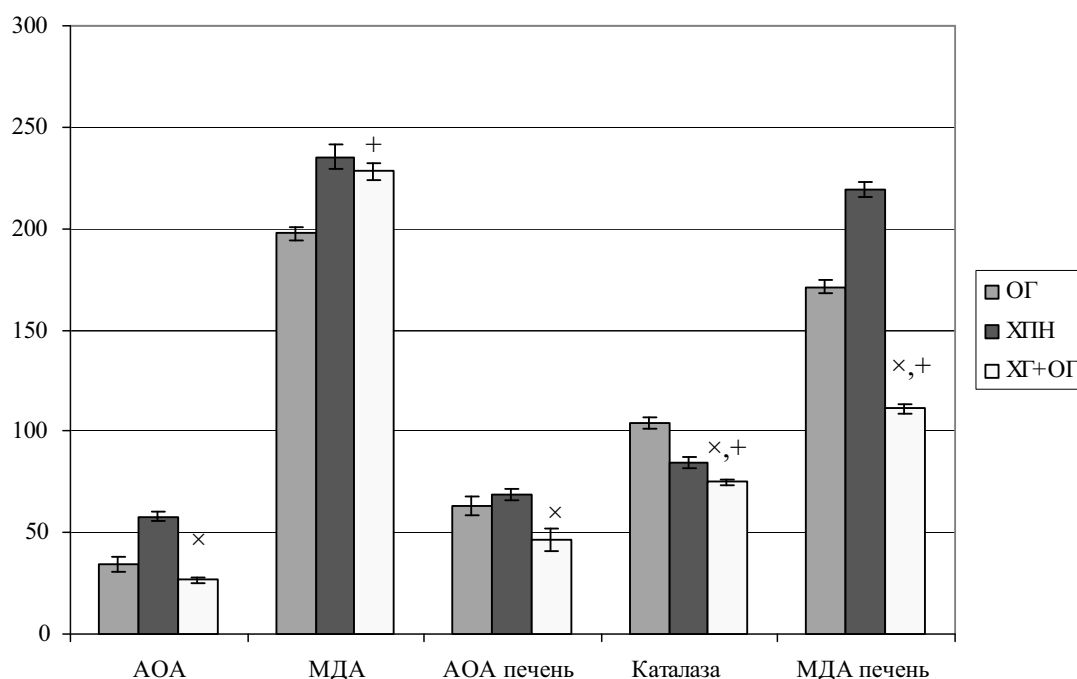


Рис. 3. Маркеры окислительного стресса в крови и печени экспериментальных животных

ляют белковые тиолы и дисульфиды, нарушают секрецию триглицеридов гепатоцитами, ингибируют различные мембранно-связанные ферменты [6, 9]. Перекисное повреждение белков приводит к их деградации и образованию токсичных фрагментов, в том числе МСМ [5, 15]. Таким образом, повышение уровня МСМ тесно связано с параллельно протекающими процессами ПОЛ, которые определяют глубину вторичных патобиохимических изменений в ткани печени. Накопление МСМ в крови при различных видах патологии является прогностически неблагоприятным показателем [15].

ОГ служит основной причиной нарушения функциональной активности печени после операций с использованием ИК. Во время ИК развивается сложный комплекс взаимосвязанных и взаимообусловленных изменений микроциркуляции, которые при длительной перфузии могут быть основными причинами формирования локальных повреждений в печени, затрудняющих восстановление ее функции в постперфузионном периоде [4, 6, 16]. Развивающийся окислительный стресс является одним из пусковых механизмов дисфункции органов и осложнений, возникающих во время и после хирургических операций.

Патобиохимические изменения гипоксического и свободнорадикального генеза очень часто встречаются совместно, так как все виды гипоксии обязательно сопровождаются активацией свободнорадикальных процессов. Расстройства гипоксического и свободнорадикального происхождения могут привести к деструкции клеток и, следовательно, часто определяют судьбу органа, ткани и, в конечном счете, всего организма. Отсюда вытекает актуальность разработки высокоэффективных препаратов, способных профилактировать и/или корректировать нарушения, обусловленные воздействием гипоксии и свободнорадикального окисления.

Заключение

1. В условиях ОГ на фоне хронического венозного застоя нарастает метаболическая и детоксикационная нагрузка на печень, что приводит к дополнительному повреждению гепатоцитов и усиливает уже имеющиеся проявления печеночной недостаточности.

2. Полученные результаты свидетельствуют о недостаточной компенсаторной возможности организма экспериментальных животных с хроническим венозным застоем для восстановления нарушений, обусловленных воздействием острой гипоксии.

3. Присутствие четко очерченного звена в виде проявлений окислительного стресса диктует необходимость разработки способов коррекции нарушений, обусловленных воздействием ОГ на фоне хронического венозного застоя.

Список литературы

1. Сергеева Г.И., Князькова Л.Г., Могутнова Т.А. Перекисное окисление липидов и функциональное состояние печени после кардиохирургических вмешательств // Успехи совр. естествознания. 2006. (3). 48–49.
Sergeeva G.I., Knyaz'kova L.G., Mogutnova T.A. Lipid peroxidation and liver functional state after surgery // Uspekhi sovrem. estestvoznaniya. 2006. (3). 48–49.
2. Непомнящих В.А., Ломиворотов В.В., Дерягин М.Н. и др. Влияние искусственного кровообращения на окислительный стресс и метаболизм ксенобиотиков в печени у больных ишемической болезнью сердца // Бюл. СО РАМН. 2008. (1). 82–86.
Nepomnyashchikh V.A., Lomivortov V.V., Deryagin M.N. et al. The impact of cardiopulmonary bypass on oxidative stress and xenobiotic metabolism in liver of the patients with coronary artery disease // Byul. SO RAMN. 2008. (1). 82–86.
3. Сергеева Г.И., Князькова Л.Г., Могутнова Т.А. и др. Острофазовый ответ и биотрансформационная активность печени после операции на открытом сердце // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2006. (1). 31–35.
Sergeeva G.I., Knyaz'kova L.G., Mogutnova T.A. et al. Acute response and biotransformative liver function after an open-heart surgery // Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya. 2006. (1). 31–35.
4. Бояринов Г.А., Соколов В.В. Озонированное искусственное кровообращение. Нижний Новгород, 1999. 298 с.
Boyarinov G.A., Sokolov V.V. Ozonized bypass. Nizhniy Novgorod, 1999. 298 p.
5. Андрианова М.Ю., Палюлина М.В., Кукаева Е.А., Мильчаков В.И. Перекисное окисление липидов и содержание средних молекул при операциях с искусственным кровообращением // Анестезиология и реаниматология. 2001. (2). 33–35.
Andrianova M.Yu., Palyulina M.V., Kukaeva E.A., Mil'chakov V.I. Lipid peroxidation and medium-weight molecules content during cardiopulmonary bypass surgeries // Anesteziologiya i reanimatologiya. 2001. (2). 33–35.
6. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина, 1989. 368 с.
Bilenko M.V. Ischemic and reperfusion damages of organs. M.: Medicine, 1989. 368 p.
7. Зайко Н.Н., Быць Ю.В., Атаман А.А. и др. Патологическая физиология. Патологическая физиология печени. К.: Логос, 1996.
Zaiko N.N., Byts Yu.V., Ataman A.A. et al. Pathologic physiology. Pathologic physiology of liver. K.: Logos, 1996.
8. Методы исследования в профпатологии / Под ред. О.Г. Архиповой. М., 1988. 144–145.
Study methods in occupational pathologies / Ed. O.G. Arkhipova. M., 1988. 144–145.

9. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации // Эффективная терапия. 1995. (1). 61–64.
- Malakhova M.Ya. Methods for biochemical registration of the endogenous intoxication // Effektivnaya terapiya. 1995. (1). 61–64.
10. Минский М.И., Николайчик В.В., Моин В.М. и др. Способ определения средних молекул // Лаб. дело. 1992. (10). 13–15.
- Minskiy M.I., Nikolaichik V.V., Moyn V.M. et al. The method for determining of "average molecule" // Lab. delo. 1992. (10). 13–15.
11. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой // Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. 66–67.
- Stal'naya I.D., Garishvili T.G. The method of malondialdehyde measurement with thiobarbituric acid survey // Modern methods in biochemistry. Ed. V.N. Orekhovich. M.: Medicine, 1977. 66–67.
12. Промыслов М.Ш., Демчук М.Д. Модификация метода определения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови // Вопр. мед. химии. 1990. (4). 90–92.
- Promyslov M.Sh., Demchuk M.D. The modification of the method for defining of the total antioxidant activity of the blood serum // Vopr. med. khimii. 1990. (4). 90–92.
13. Aebi H. Catalase in vitro // Meth. Enzymol. 1984. 105. 121–126.
14. Шоно Н.И. Метод определения белка по Бредфорду: область применения, преимущества, недостатки // Лаб. дело. 1989. 4. 4–7.
- Shono N.I. The Bredford method for protein survey: application field, benefits and deficiencies // Lab. delo. 1989. (4). 4–7.
15. Чаленко В.В. Возможные причины повышения концентрации молекул средней массы при патологии // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1991. (4). 13–14.
- Chalenko V.V. Potential reasons for the increase of medium-weight molecules concentration in pathologic conditions // Patologich. fiziologiya i eksper. terapiya. 1991. (4). 13–14.
16. Воронцова Н.Л., Журавлева И.Ю., Шиверский К.М., Барбараш Л.С. Оценка динамики некоторых биохимических показателей сыворотки крови больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 1994. (3). 44–49.
- Vorontsova N.L., Zhuravleva I.Yu., Shiverskiy K.M., Barbarash L.S. The evaluation of the dynamics of certain serum biochemical variables in patients underwent cardiopulmonary bypass surgery // Grudnaya i serdechno-sosudistaya khirurgiya. 1994. (3). 44–49.

METABOLIC CHANGES DURING ACUTE HYPOXIA IN ANIMALS WITH CHRONIC HEPATIC FAILURE

Nelly Leonidovna VORONTSOVA, Irina Yur'evna ZHURAVLEVA,
Rinat Avkhadievich MUKHAMADIYAROV, Leonid Semenovih BARBARASH

*Institute of Integrated problems of Cardio-Vascular Diseases of SB RAMS
650002, Kemerovo, Sosnovyi bulvar, 6*

The objective of the present research was to study the impact of acute hypoxia (AH) on selected metabolism components in animals with chronic hepatic failure (CHF). CHF laboratory simulation was achieved by the ligation of right and central hepatic veins below their entrance into the inferior vena cava. In 12 weeks the venous congestion led to CHF. AH was induced by perforating of the chest in the fourth intercostal space near the sternum, thus, stimulating pneumothorax. It has been found that acute hypoxia leads to the progression of hepatic failure: the activity of specific hepatic enzymes increases in blood and decreases in the liver tissue. The level of endogenous intoxication after acute hypoxia is the same as one in experimental animals with CHF, the proportion of aromatic and oligopeptide fractions of medium molecular weight peptides changed. Antioxidant protection system is mostly damaged by acute hypoxia. A significantly decreased activity of catalase and total antioxidant activity testify to the failure of compensative abilities in the experimental rats with CHF when exposed to AH. Due to increased serum malondialdehyde, concentration of lipid peroxidation products in the liver is significantly reduced. The cause of this can only be the depletion of easy-to-oxidize lipids reserves.

Key words: liver, acute hypoxia, venous congestion, hepatic failure, oxidative stress.

Vorontsova N.L. — candidate of biological sciences, leading researcher of the laboratory for cellular technologies of department for experimental and clinical cardiology; e-mail: voronl@cardio.kem.ru

Zhuravleva I.Yu. — doctor of medical sciences, chief researcher of department for experimental and clinical cardiology; e-mail: jruravl_irina@mail.ru

Mukhamadiyarov R.A. — candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory for ultrastructural investigations of department for experimental and clinical cardiology; e-mail: rem57@rambler.ru

Barbarash L.S. — academician of RAMS, director; e-mail: bio@cardio.kem.ru