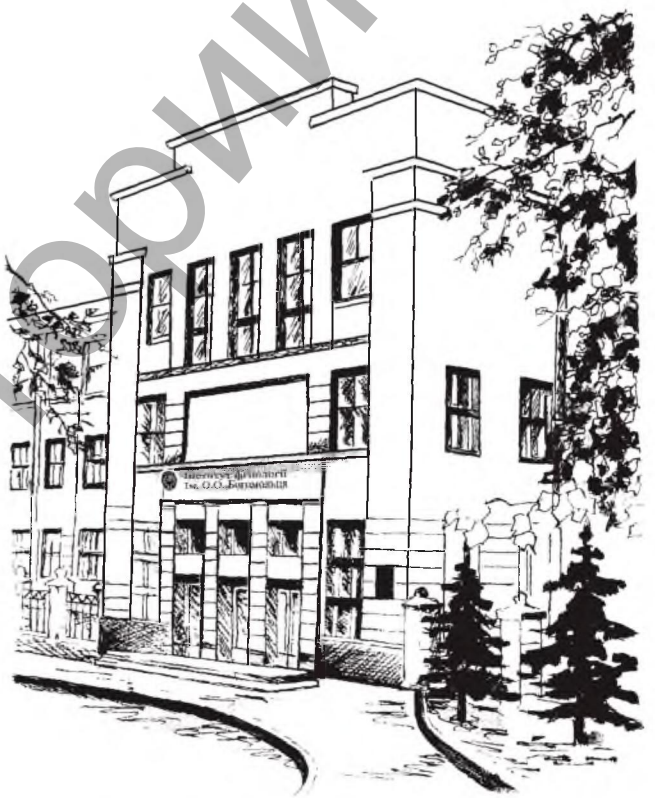
ISSN 0201-8489

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Фізіологічний журнал

том 62, № 3, 2016



Репозиторий ГГМУ

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

В.Ф. САГАЧ
(головний редактор)
Т.В. БЕРЕГОВА
П.В. БІЛАН
Г.М. БУТЕНКО
Н.В. ВОЙТЕНКО
ГУК ІГОР
В.Є. ДОСЕНКО
(заст. головного редактора)
М.В. КРИШТАЛЬ
О.О. КРИШТАЛЬ
М.Ю. МАКАРЧУК
І.М. МАНЬКОВСЬКА
В.М. МОРОЗ
О.Г. РЕЗНІКОВ
(заст. головного редактора)
В.Г. ШЕВЧУК
Я.М. ШУБА
Р.І. ЯНЧІЙ
П.І. ЯНЧУК

РЕДАКЦІЙНА РАДА

В.Ф. САГАЧ
(голова)
О.В. АТАМАН
В.В. БЕЗРУКОВ
В.Я. БЕРЕЗОВСЬКИЙ
А.І. ГОЖЕНКО
В.М. ЗАПОРОЖАН
Ю.М. КОЛЕСНИК
О.О. ЛУК'ЯНЕЦЬ
М.М. ТКАЧЕНКО
С.С. ТКАЧУК
М.Д. ТРОНЬКО
О.А. ШАНДРА

Науковий редактор В.Ф. САГАЧ

Відповідальний секретар редакції Л.В. ЛИТВИН

Адреса редакції: 01024 Київ 24, вул. Богомольця, 4
Телефон: 256-25-27, 253-07-45

http:/www.biph.kiev.ua/journals.html E-mail: Fiziol_z@biph.kiev.ua

Підписано до друку 01.06.2016. Формат 84x108/16. Папір офс.
Умов.-друк. арк. 12,25. Тираж 200 прим. Зам. 800

Свідоцтво про реєстрацію: серія КВ № 169 від 27.10.93 р.

Друкарня Видавничого дому "Академперіодика" Свідоцтво про внесення до Державного реєстру суб'єкта видавничої справи серії ДК №544 від 27.07.2001
252601, Київ-4, вул. Терещенківська, 4

Репозиторий ГрГМУ

УДК 616-092.9:616.36-005.8:615.835.14

Влияние гипоксического прекондиционирования на механизмы транспорта кислорода и окислительные повреждения при синдроме ишемии-реперфузии печени у кроликов

М.Н. Ходосовский

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь; e-mail: hod_73@yahoo.com

Исследовали влияние гипоксического прекондиционирования (ГП) на кислородсвязывающие свойства крови и степень окислительных повреждений при ишемии-реперфузии печени у кроликов. Животных рандомизированно разделили на 2 экспериментальные группы: в 1-й моделировали ишемию (30 мин, маневр Прингла) и реперфузию (120 мин) печени; во 2-й – предварительно перед ишемией-реперфузией проводили курс ГП (трехкратный «подъем» на высоту 3500 м в гипобарической камере в течение 1 ч в сутки). Изучали показатели кислородтранспортной функции (парциальное напряжение O_2 при насыщении им гемоглобина на 50%, парциальное напряжение CO_2 и O_2, pH, бикарбонат плазмы, действительный избыток оснований и др.) крови, продукты перекисного окисления липидов (диеновые коньюгаты, основания Шиффа), а также активность маркерных ферментов печени – аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) в крови. Установлено, что у кроликов 1-й группы при ишемии-реперфузии происходит снижение сродства гемоглобина к кислороду, активация процессов перекисного окисления липидов и повышение активности АлАТ и АсАТ в крови. Применение ГП способствовало повышению сродства гемоглобина к кислороду, снижению активности процессов перекисного окисления липидов и АлАТ и АсАТ крови при ишемии-реперфузии. Таким образом, ГП оказывает протективный эффект на печень путем повышения сродства гемоглобина к кислороду, что снижает степень окислительных повреждений органа при ишемии-реперфузии.

Ключевые слова: кислород; гипоксия; прекондиционирование; печень; ишемия; реперфузия; кролики.

ВВЕДЕНИЕ

Синдром ишемии-реперфузии печени часто встречается в клинической практике при выполнении резекций или трансплантации органа [1, 2]. Повышение устойчивости тканей к гипоксии является важным механизмом защиты органов от окислительного стресса при ишемии и последующей реперфузии. Индукция коротких периодов ишемии перед основным (ишемическое прекондиционирование – ИП) оказывает выраженное протективное воздействие на постишемические ткани [3]. Установлено, что ИП печени способно снижать активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), выраженность лейкоцитарной инфильтрации и апоптоза в реперфузионном периоде, что улучшает функционирование органа после ишемии. Предполагают, что механизм защитного эффекта данного способа связан с повышением продукции оксида азота (NO) и улучшением условий микроциркуляции в органе, активацией белков теплового шока, снижением продукции провоспалительных и проапоптотических цитокинов, увеличением синтеза гипоксией индуцируемого фактора 1 (ГИФ-1) [3, 4]. Общая природа механизмов адаптации к гипоксии в различных тканях объясняет успех еще одного вида прекондиционирова-

© М.Н. Ходосовский

Репозиторий ГрГМУ

ния печени – дистантное, которое заключается во временном пережатии мезентериальных артериальных сосудов или брюшного отдела аорты для повышения устойчивости органа к реперфузионным повреждениям [2, 5]. Несмотря на экспериментальный характер данных исследований, авторы считают эффективным этот способ в борьбе с окислительным стрессом, увеличением содержания провоспалительных цитокинов и нарушением микроциркуляции в печени при реперфузии.

Успешное применение ИП и дистантного прекондиционирования привело исследователей к изучению возможности использования коротких периодов общей гипоксии организма (гипоксическое прекондиционирование – ГП) для повышения устойчивости к синдрому ишемии-реперфузии органов [1, 6–8]. Преимуществом метода считается его неинвазивность, что сокращает время оперативного вмешательства. Анализ способов проведения ГП печени показал, что существует значительная вариабельность по степени и кратности гипоксических воздействий на организм с целью повышения его устойчивости к ишемии и последующей реперфузии. Так Loi и соавт. [6] для коррекции реперфузионных повреждений печени у крыс использовали 2-недельную адаптацию животных по 15 ч/сут в гипобарической камере на высоте 5500 м. Другие авторы [1] ГП печени моделировали путем короткого 10-минутного периода дыхания 10% O_2 газовой смеси с последующим переходом на дыхание 21% O_2 (10 мин) перед основным ишемическим периодом. В обоих случаях исследователями получен протективный эффект, выражавшийся в снижении активности трансаминаз и цитокинов крови, уменьшении активности процессов ПОЛ и морфологических нарушений при ишемии-реперфузии печени. Известно, что в адаптации организма к гипоксии важную роль играет изменение кислородсвязующих свойств крови [9]. Вместе с тем изменение показателей кислородтранспортной функции крови может существенно влиять на степень окислительных повреждений при реперфузии печени [10]. Так как вопрос о влиянии ГП на кислородсвязывающие свойства крови при ишемии-реперфузии печени не исследован, представляется важным изучить эффект ГП на состояние механизмов транспорта кислорода и окислительных повреждений печени у экспериментальных животных.

Цель нашей работы – изучить влияние ГП на параметры кислородтранспортной функции крови и ПОЛ при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени у кроликов.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на 20 взрослых кроликах-самцах массой 3,5-4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным внутривенным наркозом (гексенал 30 мг/кг; калипсол 100 мг/кг) вводили катетеры: один - в *v.hepatica* для забора печёночной венозной крови, а другой - в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Ишемию печени вызывали маневром Прингла (Pringle maneuver) – наложением сосудистого зажима на печеночно-двенадцатиперстную связку в течение 30 мин. После снятия зажима реперфузионный период длился 120 мин. Забор образцов крови для оценки показателей кислородтранспортной функции и ПОЛ крови осуществляли до и после ишемии, а также в конце реперфузионного периода. Функциональное состояние печени оценивали по активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) кинетическим методом с помощью стандартного набора реактивов фирмы “Cormay” (Польша). Все оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анальгезии в соответствии с нормами, принятыми этической комиссией по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 2 экспериментальные группы: в 1-й группе (n=11) моде-

Репозиторий ГрГМУ

лировали ишемию-реперфузию печени; во 2-й группе (n=9) животных до эксперимента подвергали «подъему» на высоту 3500 м [11] в гипобарической камере, где они находились в течение 1 ч. Подъемы в гипобарической камере проводили через день, 3 раза на протяжении недели, ишемию-реперфузию моделировали через 70 ч после последнего подъема.

На микрогазоанализаторе Synthesis-15 (Instrumentation Laboratory Company) оценивали показатели кислородтранспортной функции крови: $p50_{реал}$, pO_2, pCO_2, pH, бикарбонат плазмы (HCO_3^-), общий CO_2 плазмы (TCO_2), действительный избыток оснований (ABE), стандартный избыток оснований (SBE), стандартный бикарбонат плазмы (SBC). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю p50 (pO_2 крови, соответствующее 50%-му насыщению ее кислородом). $p50_{станд}$ рассчитывали для стандартных условий (pH 7,4; pCO_2 = 40 мм рт. ст. и t° = 37 °С), $p50_{реал}$ – для реальных значений этих факторов. Оценку активности процессов ПОЛ проводили по концентрации диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ) в плазме крови. Содержание ДК в плазме крови определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм [12]. Содержание ОШ определяли по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 и 440 нм соответственно [13].

Статистическую обработку результатов проводили в зависимости от нормальности распределения выборки (тест Колмогорова-Смирнова). При нормальном распределении достоверность отличий определяли с помощью критерия t Стьюдента, при отсутствии нормального распределения применяли: внутри каждой группы – критерий Вилкоксона, между группами – Манна-Уитни (U-тест). Достоверными считали различия при $P<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение маркерных ферментов печени в печеночной и смешанной венозной крови при моделировании синдрома ишемии-реперфузии у кроликов представлено в табл. 1 и 2. Установлено, что у животных 1-й группы в конце ишемии активность АлАТ в плазме печеночной и смешанной венозной крови достоверно повышалась в 5,22 и 5,18 раза, а АсАТ - в 4,63 и 4,0 раза соответственно. В реперфузионном периоде рост активности трансаминаз продолжался и превышал исходный уровень АлАТ в 11,22 и 12,56 раза, а АсАТ – в 10,42 и 11,0 раз ($P< 0,001$) соответственно. Данные изменения указывают на развитие тяжелых реперфузионных повреждений гепатоцитов при моделировании синдрома ишемии-реперфузии. Проведение животным 2-й группы курса ГП сопровождалось ростом активности АлАТ и АсАТ в печеночной венозной крови в конце ишемического периода в 2,95 ($P< 0,001$) и 2,7 ($P< 0,001$) раза, что было на 40,4% ($P< 0,01$) и 38,6 % ($P< 0,05$) меньше по сравнению с показателям в 1-ой группе в печеночной венозной крови в соответствующем периоде. Схожая динамика изменения активности АлАТ и АсАТ наблюдалась в смешанной венозной крови (см. табл. 2). В конце реперфузии у кроликов 2-й группы эти показатели в печеночной венозной крови превосходил исходные в 3,4 ($P< 0,001$) и 3,2 ($P< 0,001$) раза, а в смешанной венозной крови - в 3,0 ($P< 0,001$) и 2,6 ($P< 0,001$) раза соответственно. Данная активность трансаминаз крови в конце реперфузии у кроликов 2-й группы была существенно ниже таковой по отношению к животным 1-й группы (см. табл. 1 и 2), что указывает на улучшение функционального состояния печени в реперфузионном периоде под влиянием ГП.

Изменения основных показателей кислородтранспортной функции печёночной и смешанной венозной крови у животных 1-й группы указывали на развитие нарушений

Репозиторий ГрГМУ

Таблица 1. Влияние гипоксического прекондиционирования на показатели кислородтранспортной функции, перекисного окисления липидов и трансаминаз печеночной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов (Me [25%; 75%])

Показатель	Ишемия-реперфузия печени (1-я группа, n=11)			Гипоксическое прекондиционирование и ишемия-реперфузия (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин ишемии	120 мин реперфузии	Исходная	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
Парциальное напряжение O_2 при насыщении им гемоглобина на 50%, мм рт.ст.						
в реальных условиях ($p50_{реал}$), .	32,6 [32,45; 34,5]	39,3* [37,97; 43,3]	42,3* [39,2; 43,6]	29,2** [28,16; 30,9]	33,6** [31,5; 36,2]	33,8*** [30,9; 35,1]
в стандартных условиях ($p50_{станд}$)	31,4 [30,7; 33,4]	27,9* [25,64; 29,52]	29,06* [27,46; 31,1]	32,29 [29,44; 32,9]	27,44* [25,8; 32,5]	31,65 [28,55; 33,3]
Гемоглобин (Hb), г/л	119,0 [103,0;139,0]	121,0 [104,0; 140,0]	126,0 [98,0; 133,0]	118,0 [107;145]	118,0 [111; 123]	118,0 [111; 131]
Парциальное напряжение O_2 (pO_2), мм рт. ст.	39,0 [37,0; 49,0]	21,0* [19,0; 33,0]	38,0 [32,0; 40,0]	40,0 [34,0; 43,0]	26,0* [20,0; 33,0]	29,0* [28,0; 33,0]
Показатель кислотности (pH), ед.	7,365 [7,349;7,41]	7,115* [7,059;7,229]	7,112* [7,07; 7,177]	7,473** [7,441; 7,49]	7,196* [7,072;7,387]	7,306*** [7,264;7,429]
Парциальное напряжение CO_2 (pCO_2), мм рт. ст.	48,0 [41,8; 53,5]	68,0* [52,3; 71,1]	55,7* [48,1; 74,3]	39,7 [34,3; 44,6]	44,6* [43,4; 68,7]	48,9* [43,2; 52,2]
Бикарбонат плазмы (HCO_3^-), ммоль/л	26,7 [25,4; 29,4]	20,5* [17,3; 23,4]	18,7* [14,6; 22,4]	29,4 [27,3; 31,2]	26,4* [20,2; 29,0]	28,2** [20,0; 29,7]
Общий CO_2 (TCO_2). ммоль/л	28,2 [26,8;30,6]	22,6* [19,4; 25,3]	20,8* [16,7; 24,2]	31,0 [29,1; 31,1]	27,7 [22,3; 30,7]	29,5** [21,3; 31,5]
Действительный избыток оснований (ABE), ммоль/л	1,3 [0,3; 5,4]	- 7,5* [-14,1; -3,6]	- 9,4* [-14,6; -5,0]	6,6 [0,5; 7,2]	- 0,9*** [-8,5; 1,7]	3,0*** [-6,2; 4,1]
Стандартный избыток оснований (SBE), ммоль/л	0,9 [-0,2; 5,5]	- 7,9* [-14,0; -3,7]	- 10,0* [-15,8; -5,9]	6,2 [0,4; 7,1]	- 1,6*** [-9,3; 1,7]	3,2** [-7,2; 3,7]
Стандартный бикарбонат (SBC), ммоль/л	25,0 [24,3; 28,7]	16,6* [12,7; 20,3]	16,6 * [12,0; 20,0]	28,7 [24,8; 29,9]	22,0*** [16,6; 24,8]	26,0*** [18,6; 27,2]
Диеновые конъюгаты. ΔE_{233}/мл	0,56 [0,52; 0,62]	1,28* [0,9; 1,48]	2,24* [2,08; 2,82]	0,46 [0,4; 0,52]	1,12* [0,9; 1,4]	0,58** [0,54; 0,62]
Основания Шиффа, ЕД/мл	7,64 [7,27; 8,34]	9,88* [8,96; 11,34]	11,84* [10,2; 14,65]	7,46 [7,04; 8,22]	9,25*** [8,96; 9,64]	8,12** [7,95; 8,77]
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	31,43 [26,19; 38,4]	164,12* [118,7; 230,5]	352,69* [307,3; 431,3]	33,17 [27,9; 40,16]	97,78*** [80,3; 106,5]	113,49*** [89,0; 111,7]
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	33,17 [29,68; 41,9]	153,65* [108,3; 251,4]	345,71* [312,5; 370,2]	34,92 [31,4; 40,16]	94,28*** [85,6; 120,47]	111,74*** [85,55; 120,5]

* P <0,05к исходному уровню в своей группе; ** P< 0,05 по отношению к соответствующему периоду в 1-й группе.

Репозиторий ГрГМУ

Таблица 2. Влияние гипоксического прекондиционирования на показатели кислородтранспортной функции, перекисного окисления липидов и трансаминаз смешанной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов (Me [25%; 75%])

Показатель	Ишемия-реперфузия печени (1-я группа, n=11)			Гипоксическое прекондиционирование и ишемия-реперфузия (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин ишемии	120 мин реперфузии	Исходная	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
Парциальное напряжение O_2 при насыщении им гемоглобина на 50%, мм рт.ст.						
в реальных условиях ($p50_{реал}$), .	32,6 [29,27; 36,2]	41,9* [34,3; 44,5]	40,78* [37,05; 43,2]	29,8 [28,72; 31,2]	35,8*** [33,56; 36,1]	33,4** [31,0; 36,3]
в стандартных условиях ($p50_{станд}$)	30,6 [28,2; 33,37]	28,4 [26,7; 30,0]	28,9 [27,29; 32,5]	31,8 [29,67; 32,5]	30,95 [29,2; 33,8]	31,2 [28,93; 33,5]
Гемоглобин (Hb), г/л	120,0 [106; 137,0]	111,0 [97,0; 138,0]	121,0 [92,0; 144,0]	113,0 [107; 133]	115,0 [106; 127]	123,0 [109; 134]
Парциальное напряжение O_2 (pO_2), мм рт. ст.	39,0 [36,0; 47,0]	34,0 [28,0; 39,0]	35,0 [29,0; 47,0]	38,0 [37,0; 39,0]	28,0 [25,0; 34,0]	35,0 [30,0; 38,0]
Показатель кислотности (pH), ед.	7,346 [7,334;7,42]	7,127* [7,060; 7,223]	7,132* [7,076; 7,180]	7,429 [7,346;7,46]	7,304*** [7,177;7,344]	7,346** [7,271;7,398]
Парциальное напряжение CO_2 (pCO_2), мм рт. ст.	47,1 [40,4; 49,1]	57,2* [48,3; 76,7]	51,0 [46,9; 73,8]	41,0 [40,0; 45,6]	50,9* [48,4; 53,6]	47,9* [43,1; 54,1]
Бикарбонат плазмы (HCO_3^-), ммоль/л	27,2 [22,1; 30,9]	19,2* [15,5; 23,9]	19,2* [14,5; 23,8]	27,3 [25,4; 29,6]	25,4* [20,2; 28,3]	25,7** [19,6; 28,9]
Общий CO_2 (TCO_2), ммоль/л	28,7 [23,3; 32,4]	20,7* [18,1; 26,3]	20,8* [16,8; 26,3]	28,8 [27,0; 31,0]	27,0* [21,8; 29,8]	27,3** [21,1; 30,4]
Действительный избыток оснований (ABE), ммоль/л	2,4 [-2,9; 7,1]	- 7,2* [-15,2; - 5,7]	- 8,8* [-15,1; -5,2]	2,9 [1,7; 5,4]	- 0,6*** [-7,9; 4,1]	- 0,2** [-7,1; 4,6]
Стандартный избыток оснований (SBE), ммоль/л	1,7 [-3,9; 6,8]	- 7,4* [- 16,6; - 6,0]	- 9,3* [-16,3; -6,4]	2,3 [1,3; 5,0]	- 1,1*** [- 8,4; 3,7]	- 0,9** [- 8,4; 4,3]
Стандартный бикарбонат (SBC), ммоль/л	25,4 [21,8; 29,7]	18,1* [12,6; 19,1]	17,2 * [11,7; 20,0]	26,3 [25,4; 28,5]	23,0*** [16,9; 26,6]	24,1** [17,9; 27,6]
Диеновые конъюгаты, ΔE_{233}/мл	0,54 [0,48; 0,6]	1,18* [0,82; 1,44]	2,18* [1,92; 2,78]	0,52 [0,44; 0,56]	1,22* [0,88; 1,42]	0,68*** [0,6; 0,78]
Основания Шиффа, ЕД/мл	7,65 [7,33; 8,21]	9,48* [8,89; 10,41]	11,33* [9,84; 12,31]	7,82 [7,26; 8,32]	8,87*** [7,91; 9,05]	8,96*** [8,24; 9,26]
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	27,94 [24,4; 36,67]	144,92* [120,5; 202,5]	350,95* [307,3; 427,7]	33,17 [26,19;36,67]	97,78*** [76,8; 110,0]	99,52*** [76,82; 111,7]
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	31,43 [27,94; 41,9]	125,7* [118,7; 181,6]	345,7* [309,0; 434,8]	34,92 [27,94; 38,4]	94,28*** [85,55; 111,7]	90,79*** [85,55; 110,0]

* P <0,05к исходному уровню в своей группе; ** P< 0,05 по отношению к соответствующему периоду в 1-й группе.

Репозиторий ГрГМУ

в механизмах транспорта кислорода (см. табл. 1 и 2). Так, у них ишемия печени приводила к достоверному уменьшению pO_2 на 46,15 % и к увеличению pCO_2 на 41,67 % по отношению к исходному уровню в крови, оттекающей от печени. В конце реперфузионного периода значение pO_2 не отличалось от исходного, тогда как pCO_2 оставалось выше на 8,28 % ($P<0,05$). Показатели кислотно-основного состояния у кроликов 1-й группы на протяжении ишемии-реперфузии в обоих образцах крови снижались. Так на 30-й минуте ишемии в печеночной венозной крови значение HCO_3^- понизилось на 23,2 % ($P<0,05$), TCO_2 – на 19,86 % ($P<0,05$), а SBC – на 33,6 % ($P<0,05$) по отношению к исходному уровню. В конце реперфузионного периода в печеночной венозной крови значения HCO_3^- , TCO_2 и SBC были достоверно ниже исходного уровня на 29,96, 26,24 и 33,6 % соответственно. В смешанной венозной крои на 120-й минуте реперфузии у животных 1-й группы знвчения pO_2 и pCO_2 не изменялись, тогда как pH, HCO_3^-, TCO_2, ABE, SBE, SBC проявляли схожую динамику изменений как в печеночной венозной крови (см. табл. 2). В конце ишемического периода у кроликов 1-й группы наблюдалось увеличение $p50_{реал}$ на 20,55 и 28,53 % ($P< 0,05$) в печеночной и смешанной венозной крови соответственно (см. табл. 1). В конце реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови снижение СГК сохранялось: $p50_{реал}$ был выше исходного на 29,75 и 25,1 % ($P< 0,05$) соответственно. Данные изменения показателей кислородтранспортной функции крови в 1-й группе животных сопровождались ростом активности процессов ПОЛ и трансаминаз крови. Так, на 120-й минуте реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к исходному содержание ДК повышалось в 4,0 и 4,04 раза, ОШ увеличивалось на 54,97и 48,1% соответственно ($P<0,05$; табл. 1, 2).

У животных, которым проводили курс ГП (2-я группа), наблюдалось улучшение показателей кислородтранспортной функции крови на протяжении ишемии-реперфузии печени (см. табл. 1, 2). Установлено, что он способствовал снижению исходного $p50_{реал}$ печеночной венозной крови на 10,4% ($P<0,05$) по отношению к таковому в 1-й группе. В конце ишемического периода pO_2 печеночной венозной крови понизилось на 35,0% ($P< 0,05$), pH, HCO_3^-, ABE, SBE, SBC снижались, а $p50_{реал}$ и TCO_2 существенно не изменялись по отношению к исходным уровням, при этом $p50_{реал}$ был ниже, чем у животных 1-й группы на 14,5% ($P< 0,05$; табл. 1). В смешанной венозной крови на 30-й минуте ишемии у животных 2-й группы показатели $p50_{реал}$, pH, ABE, SBE, SBC были существенно лучше, чем у 1-й группы (табл. 2). На 120-й минуте реперфузии у кроликов группы ГП в смешанной венозной крови большинство показателей кислородтранспортной функции крови не отличались от исходного уровня, а показатели $p50_{реал}$, pH, HCO_3^-, TCO_2, ABE, SBE, SBC были лучше, чем в 1-й группе (см. табл. 2). В печеночной венозной крови в конце реперфузионного периода наблюдалась схожая динамика показателей кислородтранспортной функции крови (см. табл. 1). ГП способствовало снижению содержания продуктов ПОЛ после ишемии. Так, у животных 2-й группы в конце реперфузионного периода в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к значениям в 1-й группе содержание ДК понижалось в 3,9 и 3,2 раза ($P< 0,01$), содержание ОШ снизилось на 31,4 и 20,9% ($P< 0,01$) соответственно (см. табл. 1, 2).

Установлено, что ишемия печени, вызванная маневром Прингла, приводила к развитию метаболического ацидоза у кроликов 1-й группы (судя по показателям pH, ABE, SBE и SBC). Повышение pCO_2 могло быть следствием застойных явлений и нарушения микроциркуляции в печени. Снижение СГК крови при ишемии (судя по росту $p50_{реал}$) носило адаптивный характер, способствуя снижению дефицита O_2 в тканях органа. Вместе с тем сохранение сниженного СГК в реперфузион-

Репозиторий ГГМУ

ном периоде могло приводить к избыточному потоку кислорода в ткани и созданию условий для «относительной гипероксии» и окислительного стресса [14]. Это предположение подтверждается повышением содержания ДК и ОШ в крови в конце реперфузии у кроликов 1-й группы. Рост активности ПОЛ сопровождался повреждением гепатоцитов (судя по активности АлАТ и АсАТ крови). Развитию окислительного стресса в печени могло способствовать истощение механизмов антиоксидантной защиты, которое наблюдали после ишемии органа у крыс вместе со снижением СГК при реперфузии [10]. Восстановление pO_2 в печеночной венозной крови в конце реперфузии у кроликов 1-й группы могло носить патофизиологический характер, усиливая, наряду со сниженным СГК, дисбаланс между способностью тканей к полноценному восстановлению кислорода и его поступлением. Повышение доли неполного восстановления кислорода (т.н. «утечки» электронов) в митохондриях гепатоцитов отображалось на последующем повреждении клеточных и субклеточных мембранных структур свободнорадикальными процессами ПОЛ.

Проведение курса ГП у кроликов приводило к улучшению показателей кислотно-основного равновесия на протяжении экспериментов. Так, несмотря на снижение pH, ABE, SBE и SBC после ишемии, к концу реперфузионного периода эти показатели не отличались от исходных значений в данной группе и были лучше, чем у животных 1-й группы. Очевидно, что ГП у кроликов приводило к меньшим метаболическим нарушениям в печени, возможно, за счет большей сопряженности процессов окислительного фосфорилирования, т.е. повышения эффективности тканевого дыхания снижает утечку электронов и интенсивность окислительного стресса при реперфузии [15]. Кроме того, трехкратное ГП способствует повышению экспрессии таких транскрипционных факторов, как ГИФ-1α, c-Fos, NF-κB и др., что приводит к активации генов, продуцирующих проадаптивные белки, в частности, пептидные антиоксиданты, антиапоптотические белки семейства bcl-2, семейства стресс-белков HSP, эритропоэтин и другие, вовлекаемые в процессы выживания клеток при повреждающих воздействиях [8]. Выявленные изменения СГК после ГП у животных 2-й группы указывают на смещение кривой диссоциации оксигемоглобина влево на протяжении экспериментов в печеночной венозной крови и в конце реперфузии в смешанной венозной крови по отношению к результатам у кроликов 1-й группы (рис. 1). Важно отметить, что на фоне повышенного СГК печеночной венозной крови сохранялось снижение pO_2 при небольшом увеличении pCO_2 на 120-й минуте реперфузии у животных с ГП.

Факт повышения СГК, улучшение показателей кислотно-основного баланса и снижение содержания продуктов ПОЛ (судя по изменению ДК и ОШ) указывают на улучшение метаболических процессов и устранение условий для «относительной гипероксии» в печени в постишемическом периоде. Повышение СГК печеночной венозной крови с одновременным снижением в ней pO_2 при реперфузии печени может быть одним из

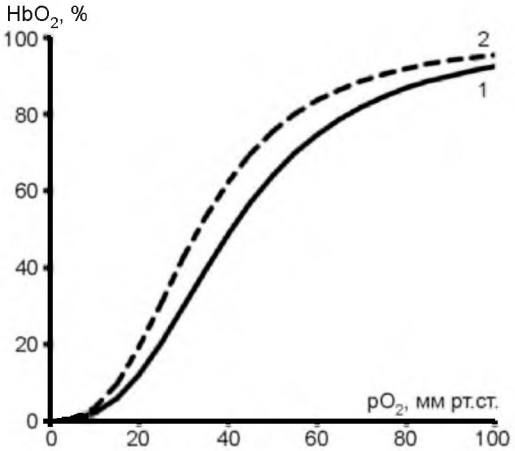


Рис. 1. Влияние гипоксического прекондиционирования на положение кривых диссоциации оксигемоглобина, рассчитанных по значениям парциального напряжения O^2 при насыщении им гемоглобина на 50% в реальных условиях смешанной венозной крови, на 120-й минуте реперфузии у кроликов. 1- первая группа (n=11), 2 - вторая группа (n=9)

Репозиторий ГомГМУ

механизмов, препятствующих деградации ГИФ-1α, с активностью которого связывают индукцию многих защитных эффектов при ишемии-реперфузии, таких, как противовоспалительный, антиапоптотический, антиокислительный и метаболический [16]. Показано, что ГИФ-1α способен активировать синтез гемоксигеназы-1 (ГО-1), что улучшает функцию митохондрий гепатоцитов и снижает продукцию активных форм кислорода при ИРП [17]. Возможно, протективный эффект активации ГО-1 при ИРП связан с газотрансмиттерными свойствами монооксида углерода, который эндогенно образуется при активации данного фермента. Известно, что повышение СГК крови является одним из прямых эффектов СО на гемоглобин [18]. Однако вопрос об участии СО механизме протективного действия ГП при ИРП нуждается в дополнительных исследованиях.

Таким образом, ГП способствует повышению СГК крови, улучшает показатели кислотно-основного баланса и препятствует развитию окислительного стресса, что положительно влияет на функциональное состояние печени при ишемии-реперфузии у кроликов. Протективный эффект ГП в большой степени обусловлен коррекцией механизмов транспорта кислорода кровью, что положительно влияет на метаболические процессы при ИРП.

ВЫВОДЫ

1. Гипоксическое прекондиционирование в отсроченном периоде у кроликов снижает степень окислительных повреждений печени при ишемии-реперфузии: снижает содержание диеновых конъюгатов, оснований Шиффа, активность маркерных ферментов повреждения печени (АлАТ и АсАТ).

2. Коррекция синдрома ишемии-реперфузии печени путем гипоксического прекондиционирования у кроликов приводит к улучшению механизмов транспорта кислорода кровью, смещению кривой диссоциации оксигемоглобина влево, что способствует уменьшению степени окислительных повреждений.

M.N. Khodosovsky

INFLUENCE OF HYPOXIC PRECONDITIONING ON THE MECHANISMS OF BLOOD OXYGEN TRANSPORT AND OXIDATIVE DAMAGES DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION IN RABBITS

The effect of hypoxic preconditioning (HP) on the blood oxygen-binding properties and liver oxidative damages was determine during hepatic ischemia-reperfusion (HIR) in rabbits. Animals were randomized into two experimental groups: 1st (HIR) - hepatic ischemia (30 min by Pringle maneuver) and reperfusion (120 min); 2nd (HP+HIR) – before HIR the rabbits were passed through hypoxic chamber at 3500 m altitude during 1 hr/day (3 times day after day). The parameters of blood oxygen transport (p50, pCO_2, pO_2, pH, HCO_3^-, ABE and ect.), lipid peroxidation products (conjugated dienes, Schiff bases) and blood hepatic markers (ALT, AST) were detected. It's found that HIR leads to decline in hemoglobin oxygen affinity, activation of lipid peroxidation processes and elevation of ALT and AST activities in the 1st group. Hypoxic preconditioning (2nd group) markedly increased hemoglobin oxygen affinity, reduced the lipid peroxidation processes and ALT and AST activities in the blood during HIR. Thus, HP has a protective effect during HIR through elevation of hemoglobin oxygen affinity and declining hepatic oxidative damages.

Key words: oxygen; hypoxia; preconditioning; liver; ischemia; reperfusion; rabbits.

Grodno State Medical University, Belarus

М.М. Ходосовський

ВПЛИВ ГІПОКІСЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦІОНУВАННЯ НА МЕХАНІЗМИ ТРАНСПОРТУ КИСНЮ ТА ОКИСЛЮВАЛЬНІ ПОШКОДЖЕНЬЯ ПРИ СИНДРОМІ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ПЕЧІНКИ У КРОЛІВ

Досліджували вплив гіноксичного прекондиціювання (ГП) на киснезв'язувальні властивості крові та ступінь окисних пошкоджень при ішемії-реперфузії печінки у кроликів. Тварин рандомізовано розділили на 2 групи: у 1-й моделювали ішемію (30 хв, маневр Прінгла) та реперфузію (120 хв) печінки; в 2-й – попередньо перед ішемією-реперфузією проводили курс ГП (триразовий «підйом» на висоту 3500 м у гіпобаричній камері протягом 1 год за добу). Вивчали показники киснетранспортної функції (p50, pCO_2, pO_2, pH, HCO_3^-, ABE та ін.) крові, продукти перекисного окиснення лінідів

Репозиторий ГомГМУ

(дієнові кон'югати, основи Шиффа), а також активність маркерних ферментів печінки - аланін- і аспартатамінотрансфераз (АЛТ і АСТ) у крові. Встановлено, що у кроликів 1-ї групи при ішемії-реперфузії знижується спорідненість гемоглобіну до кисню, активуються процеси перекисного окиснення ліпідів та підвищується активність АЛТ і АСТ. Застосування ГП сприяло підвищенню спорідненості гемоглобіну до кисню, зниженню активності процесів перекисного окиснення ліпідів та АЛТ і АСТ крові при ішемії-реперфузії. Таким чином, ГП чинить захисний ефект на печінку підвищенням спорідненості гемоглобіну до кисню, що знижує ступінь окисних пошкоджень органа при ішемії-реперфузії.

Ключові слова: кисень; гіпоксія; прекондиціонування; печінка; ішемія; реперфузія; кролики

УО «Гродненський державний медичний університет», Гродно, Білорусь,

REFERENCES

1. Choukèr A, Ohta A, Martignoni A, Lukashev D, Zacharia LC, Jackson EK, et al. In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemia-reperfusion injury through the adenosine A2B receptor. Transplantation. 2012; 94(9):894-902.
2. Czigány Z, Turóczi Z, Ónody P, Harsányi L, Lotz G, Hegedüs V, et al. Remote ischemic perconditioning protects the liver from ischemia-reperfusion injury. J Surg Res 2013; 185(2):605-13.
3. Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Albano E, Carini R. Molecular mechanisms of liver preconditioning. World J Gastroenterol. 2010; 16(48):6058-67.
4. Song X, Zhang N, Xu H, Cao L, Zhang H. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. Int J Biol Sci. 2012; 8(5):707-18.
5. Kageyama S, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Okamura Y, et al. Intestinal ischemic preconditioning ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: role of heme oxygenase 1 in the second window of protection. Liver Transpl. 2015; 21(1):112-22.
6. Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. Transplantation. 2004; 77(7):1004-8.
7. Maslov LN, Lishmanov Yu B, Kolar F, Portnichenko AG, Podoksenov Yu.K, Khaliulin I G, et al. Hypoxic preconditioning is a phenomenon increa-sing tolerance of cardiomyocytes to hypoxia-reoxygenation. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2010; 96(12):1170-89. [Russian].
8. Samoflov MO, Rybnikova EA, Churilova AV. Signal molecular and hormonal mechanisms of formation of the hypoxic preconditioning protective effects. Patol Fiziol Eksp Ter. 2012; (3): 3-10. [Russian].
9. Simonson TS, Wei G, Wagner HE, Wuren T, Bui A, Fine JM, et al. Increased blood-oxygen binding affinity in Tibetan and Han Chinese residents at 4200 m. Exp Physiol. 2014; 99(12):1624-35.
10. Khodosovskiĭ MN, Zinchuk VV. Erythropoietin influence on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant state during hepatic ischemia-reperfusion. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2014;100(5):592-601. [Russian]
11. Tin'kov A.N., Prokof'ev A.B., Grintsova M.V. Evaluation of indices of cardiac electrical instability in patients with myocardial infarction during out-patient stage of follow-up care using the altitute-chamber hypoxia technique . Journal of Arrhythmology. 2005; (39):31-4. [Russian].
12. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. Lab Delo. 1988; (2):60-4. [Russian].
13. Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. Anal Biochem. 1973; 52(1): 1-9.
14. Bilenko M.V. Ischemic and reperfusion injuries of organs (molecular mechanisms and ways to prevention and treatment). Moscow: Medicine; 1989. [Russian]
15. Hummitzsch L, Zitta K, Bein B, Steinfath M, Albrecht M. Culture media from hypoxia conditioned endothelial cells protect human intestinal cells from hypoxia/reoxygenation injury. Exp Cell Res. 2014; 322(1):62-70.
16. Akhtar MZ, Sutherland AI, Huang H, Ploeg RJ, Pugh CW. The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities. Am J Transplant. 2014; 14(7):1481-7.
17. Zhong Z, Ramshesh VK, Rehman H, Currin RT, Sridharan V, Theruvath TP, et al. Activation of the oxygen-sensing signal cascade prevents mitochondrial injury after mouse liver ischemia-reperfusion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008; 295(4):G823-32.
18. Crocker GH, Toth B, Jones JH. Combined effects of inspired oxygen, carbon dioxide, and carbon monoxide on oxygen transport and aerobic capacity. J Appl Physiol(1985). 2013; 115(5):643-52.

Материал поступил в редакцию 10.08.2015

Репозиторий ГГМУ