

6. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – М.: Колос, –1976. – 256 с.
7. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
8. Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов / под ред. В.К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
9. Применение соломы зерновых культур на удобрение в Томской области: рекомендации / ГНУ СибНИИТ СО РАСХН, Департамент социально-экономического развития села Томской области. – Томск, 2004. – 10 с.
10. Kudenko A.Y., Gribovskaya I.A., Zolotukhin I.G. Physical-Chemical treatment of wastes: a way to close turnover of elements in LSS // Acta Astron. – 2000. – Vol. 46 (9). – PP. 585–589.
11. Waste Bioregeneration in life support CES: development of soil organic substrate / N.S. Manukovsky [et al.] // Adv. Space Res. – 1997. – № 20(10). – P. 1827–1832.
12. Material balance and diet in bioregenerative life support systems: connection with coefficient of closure / N.S. Manukovsky [et al.] // Advances in Space Research. – 2005. – № 35. – P. 1563–1569.
13. Evaluation of the Possibility of Using Human and Plant Wastes in Bioregenerative Life Support Systems / A.A. Tikhomirov [et al.] // SAE Technical Paper 2005-01-2981, 2005, doi:10.4271/2005-01-2981. URL: <http://papers.sae.org/2005-01-2981>.



УДК 577.359

К.В. Шадрин, В.Г. Пахомова,
А.П. Рупенко, И.И. Моргулис

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕРФУЗИРУЕМОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

В настоящем исследовании определяли влияние условий перфузии (длительность подготовительного периода, норадреналин и молочная кислота) на показатели функционирования изолированной печени крысы.

Ключевые слова: перфузия изолированной печени, метаболизм, норадреналин, глюконеогенез, гипоксия.

K.V. Shadrin, V.G. Pakhomova,
A.P. Rupenko, I.I. Morgulis

THE INFLUENCE OF PREPARATION AND EXPERIMENT CONDUCTING CONDITIONS ON THE FUNCTIONING CHARACTERISTICS OF THE ISOLATED PERFUSED RAT LIVER

The effect of the perfusion conditions (duration of the preparatory period, noradrenaline and lactic acid) on the characteristics of isolated rat liver functioning is determined in the present research.

Key words: isolated liver perfusion, metabolism, noradrenaline, gluconeogenesis, hypoxia.

Введение. Исследование метаболизма печени и нахождение пределов функционирования этого органа – очень важная задача современных исследований в фармакологии, физиологии и медицине. Для решения таких задач подходит метод перфузии изолированных органов [1, 6]. Он позволяет в реальном времени отслеживать реакцию органа на различные воздействия, а также дает уникальную возможность поддерживать его гомеостаз [8]. При этом оценивают содержание различных метаболитов [10, 11], медиаторов [7, 9], факторов, которые регулируют накопление гликогена и выброс глюкозы в среду [4, 5]. Однако не уделено достаточно внимания функционированию печени как самостоятельного целостного органа, в частности тому, как влияет длительность ишемического периода на качество перфузии, как осуществляется метаболизм печени при стимуляции и как этот орган в условиях изолированной перфузии выполняет одну из присущих ему метаболических функций, например производство глюкозы из молочной кислоты [2, 3]. Несомненно,

менно, параметры функционирования изолированного органа зависят от условий перфузии, в частности, от состава перфузионной среды [12, 13]. При этом технологии самой операции и процессы выделения и размещения органа в термостатируемой камере (т.е. подготовительный период) вызывают в органе состояние гипоксии, что может также отражаться на его функционировании в дальнейшем. Поэтому очень важно знать, как длительность подготовительного периода влияет на метаболизм изолированных органов.

Целью работы было сравнить функционирование изолированной перфузируемой печени при различной длительности подготовительного периода и оценить влияние добавок в перфузионную среду, при использовании которых орган лучше сохраняет функциональную активность. В качестве стресс-воздействия использовали введение в перфузионную систему норадреналина. В качестве функциональной нагрузки на печень использовали лактат.

Методика исследования. Эксперименты проводили на крысах-самках Вистар массой 200–260 г. У наркотизированных (натрий-тиопентал, 100 мг/кг, в/б) животных стабилизировали гемостаз (гепарин, 1000 ед./кг, в/в); канюлировали воротную вену, инфузировав охлажденным раствором (50% – среда 199, 50% – солевой раствор Кребса-Хенселейта с добавлением 80 г/л полиглюкина); канюлировали верхнюю полую вену, после чего орган выделяли и помещали в установку для культивирования изолированных органов мелких лабораторных животных «Гомеостат-3М». Печеночную артерию и нижнюю полую вену лигировали. Таким образом, вход перфузионной жидкости в печень осуществлялся через воротную вену, а выход – через верхнюю полую вену.

Перфузию печени крыс проводили в нормотермических условиях при постоянной скорости тока перфузата ($\approx 3\text{--}3,5 \text{ мл}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$).

По длительности подготовительного периода животных разделили на три группы: 1-я группа – 25–35 мин, 2-я группа – 36–45, 3-я группа – 46–55 мин. Всего в эксперименте использовано 30 животных (по 10 в каждой группе). Длительность перфузии составляла 60 мин.

В экспериментах, где исследовали влияние добавок в перфузионную среду, использовали 22 животных. Все перфузируемые органы были разделены на 3 группы: 1 – контроль (органы 12 животных), без введения норадреналина; 2 – органы, в перфузионную систему которых вводили норадреналин (5) (вводили с 60 по 70 мин перфузии в концентрации 1 мкМ); 3 – органы, в перфузионную систему которых добавляли лактат (5) (вводили с 70 по 80 мин перфузии в концентрации 10М). Длительность перфузии составляла 120 мин.

В ходе перфузии определяли следующие показатели жизнедеятельности органа: уровень давления в воротной вене, скорость желчотока, удельные скорости потребления кислорода и выделения углекислого газа, отношение удельной скорости потребления кислорода к удельной скорости выделения углекислого газа, концентрации молочной, пировиноградной кислот, глюкозы, отношение концентраций молочной и пировиноградной кислот в оттекающей от органа жидкости, скорости изменения содержаний молочной и пировиноградной кислот в оттекающей от органа жидкости.

Давление в воротной вене определяли манометрическим методом (см водн. ст.), удельные скорости потребления кислорода и выделения углекислого газа (мл/мин/г) определяли по формуле

$$dV_{O_2}/dt = Q_t (\Phi_a - p_v)$$

где Q_t – минутный объем кровообращения;

$\Phi_a - p_v$ – разность напряжений кислорода в артериальной и венозной ветвях циркуляции.

Концентрации глюкозы, лактата и пирувата (мМ) определяли спектрофотометрически. Скорости изменения содержаний молочной и пировиноградной кислот (мМ/мин) определяли по формуле

$$dC/dt = (C_{i+1} - C_i) / \Delta t,$$

где C_i – концентрация в момент i -го измерения;

C_{i+1} – концентрация в момент измерения $i+1$;

Δt – интервал между забором соответствующих проб, мин.

Результаты были статистически обработаны с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Влияние длительности подготовительного периода на показатели жизнедеятельности изолированной перфузируемой печени крысы

Данные свидетельствуют о сохранении в условиях перфузии функциональной активности печени: во всех экспериментальных группах изолированный орган хорошо выделяет желчь и стабилизирует уровни давления в воротной вене. Наиболее близкий к исходному уровень давления в воротной вене наблюдали для органов животных группы 2 (рис. 1).

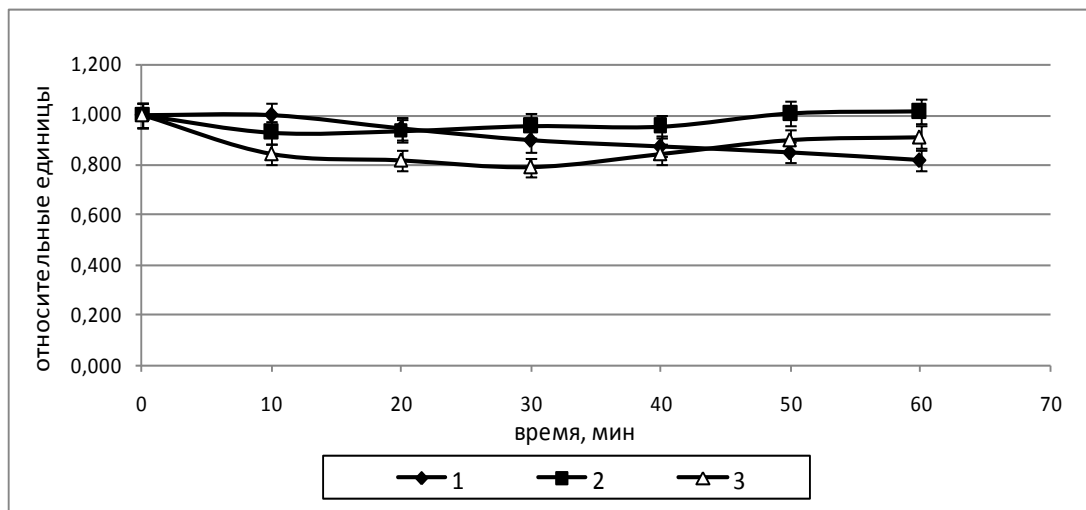


Рис.1. Динамика давления в воротной вене в системе изолированной перфузируемой печени крыс при различной длительности подготовительного периода (1, 2, 3 – номер экспериментальной группы)

На рисунке 2 представлено изменение скорости продукции желчи для различной длительности подготовительного периода. В группах 1 и 2 скорость выделения желчи остается стабильной в течение всего эксперимента, в то время как в группе 3 после 50 мин она заметно падает.

Для удельной артерио-венозной разницы по кислороду (рис. 3) наиболее стабильными были значения показателя для органов первой группы, а для органов животных второй и третьей групп измеряемые показатели достаточно заметно отклонялись от исходного значения.

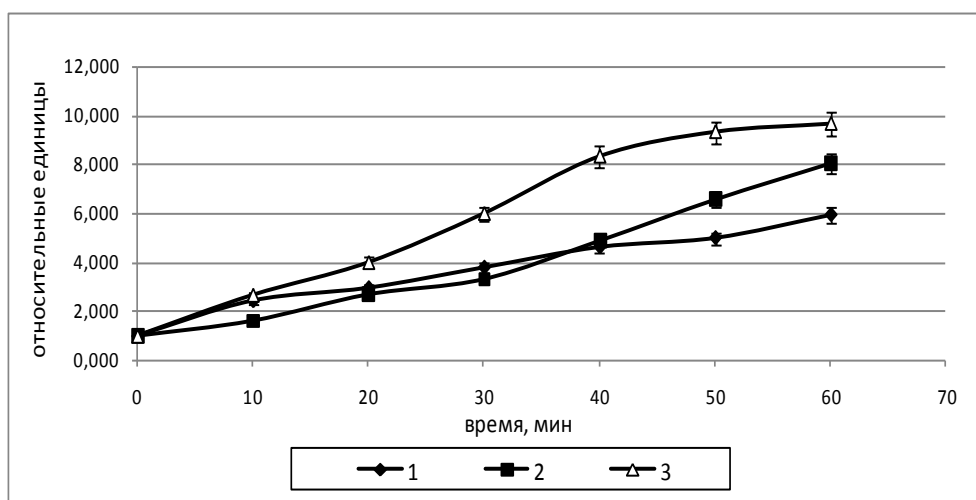


Рис. 2. Изменение скорости выделения желчи изолированной перфузируемой печенью при различной длительности подготовительного периода (1, 2, 3 – номер экспериментальной группы)

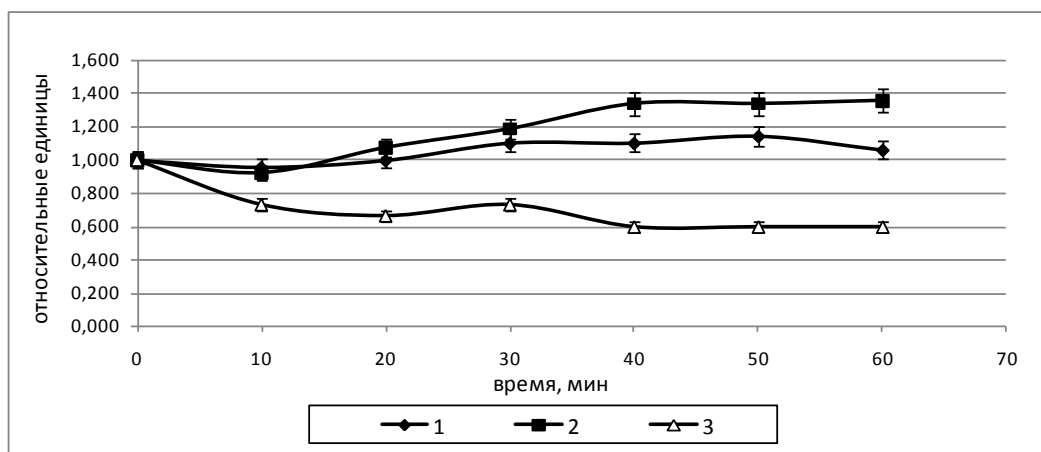


Рис. 3. Динамика удельной артерио-венозной разницы по кислороду для изолированной перфузируемой печени при различной длительности подготовительного периода (1, 2, 3 – номер экспериментальной группы)

В целом наиболее стабильную по всем показателям динамику наблюдали для органов животных первой группы. Динамика показателей для органов второй и третьей групп была менее стабильной: наблюдались колебания значений исследуемых величин.

Реакция изолированной перфузируемой печени крысы на введение норадреналина

Из таблицы 1 можно видеть, что с момента введения норадреналина уровень давления в воротной вене при перфузии органов животных первой группы начинает отличаться от контроля. В течение 10 мин после введения норадреналина уровень давления в воротной вене для органов группы 2 достоверно ниже, чем в контроле. Начиная с 70 мин, уровень давления в воротной вене для органов группы 2 повышается до контрольных значений и сохраняется таковым до конца перфузии.

Таблица 1

Динамика уровня давления в воротной вене в группах 1 и 2, относительные единицы, в системе изолированной перфузируемой печени крыс при введении норадреналина

Время, мин	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Группа 1	1,000 ±0,050	0,982 ±0,049	0,994 ±0,050	1,113 ±0,056	1,029 ±0,051	1,064 ±0,053	1,072 ±0,054	1,119 ±0,056	1,164 ±0,058	1,226 ±0,061
Группа 2	1,000 ±0,050	0,907 ±0,045	0,837 ±0,042	0,728 ±0,036*	0,745 ±0,037*	1,125 ±0,056	0,983 ±0,049	0,921 ±0,046	0,881 ±0,044*	0,854 ±0,043*

* Обозначает $P < 0,05$ в сравнении со значениями для группы 1.

На рисунке 4 представлены изменения скоростей потребления кислорода и выделения углекислого газа, а также отношения скорости выделения углекислого газа к скорости потребления кислорода. Как видно, в группе 1 как скорость потребления кислорода, так и скорость выделения углекислого газа увеличиваются, а в группе 2 уровни этих показателей остаются неизменными. Коэффициент дыхания (рис. 4,в) и в 1, и во 2 группах остается неизменным до последних 20 мин перфузии, после чего в группе 1 заметно понижается, оставаясь прежним при добавлении норадреналина.

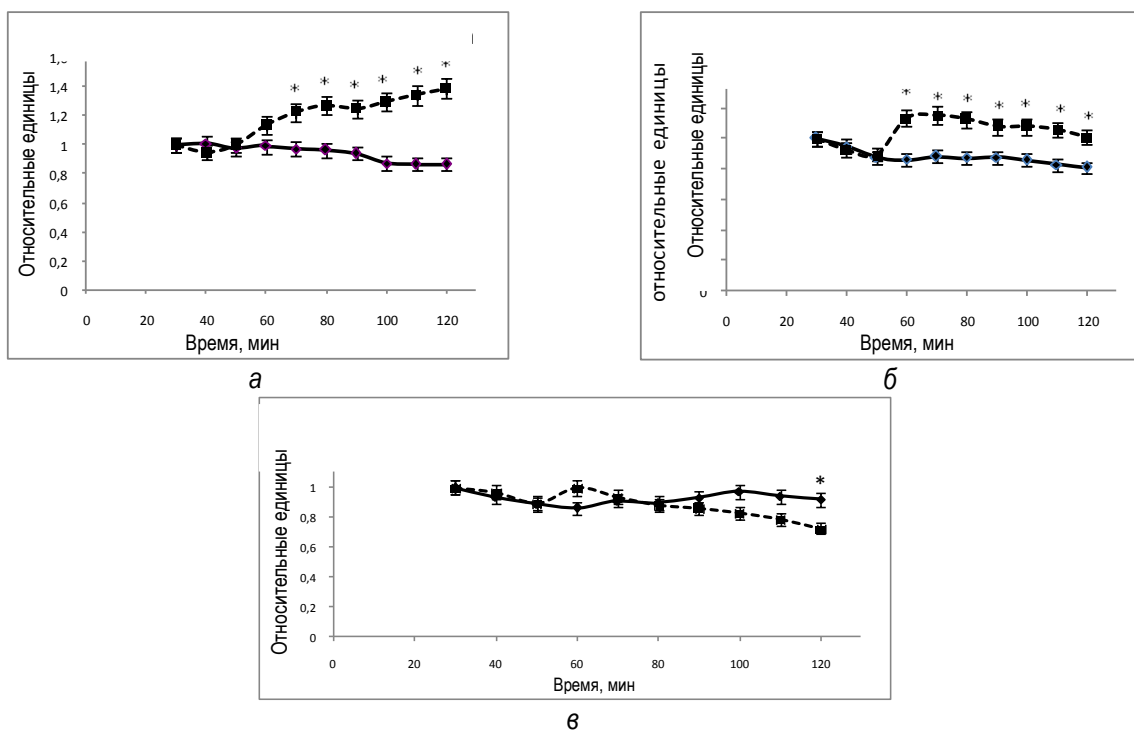


Рис. 4. Изменения скорости потребления кислорода (а) выделения углекислого газа (б) и отношения скорости выделения углекислого газа к скорости потребления кислорода (в) в группах 1 (пунктирная кривая) и 2 (сплошная кривая) в системе изолированной перфузируемой печени крыс при введении норадреналина. * обозначает $P < 0,05$ в сравнении со значениями для группы 1

На рисунке 5 представлена динамика уровней лактата, пирувата и отношения лактат/пируват в течение перфузии. Уровень лактата снижается в течение перфузии, в то время как содержание пирувата в оттекающей от органа жидкости остается постоянным. Отношение содержаний лактата и пирувата (рис. 5,в) уменьшается так же, как и снижается уровень лактата, что согласуется с данными рисунка 4,а.

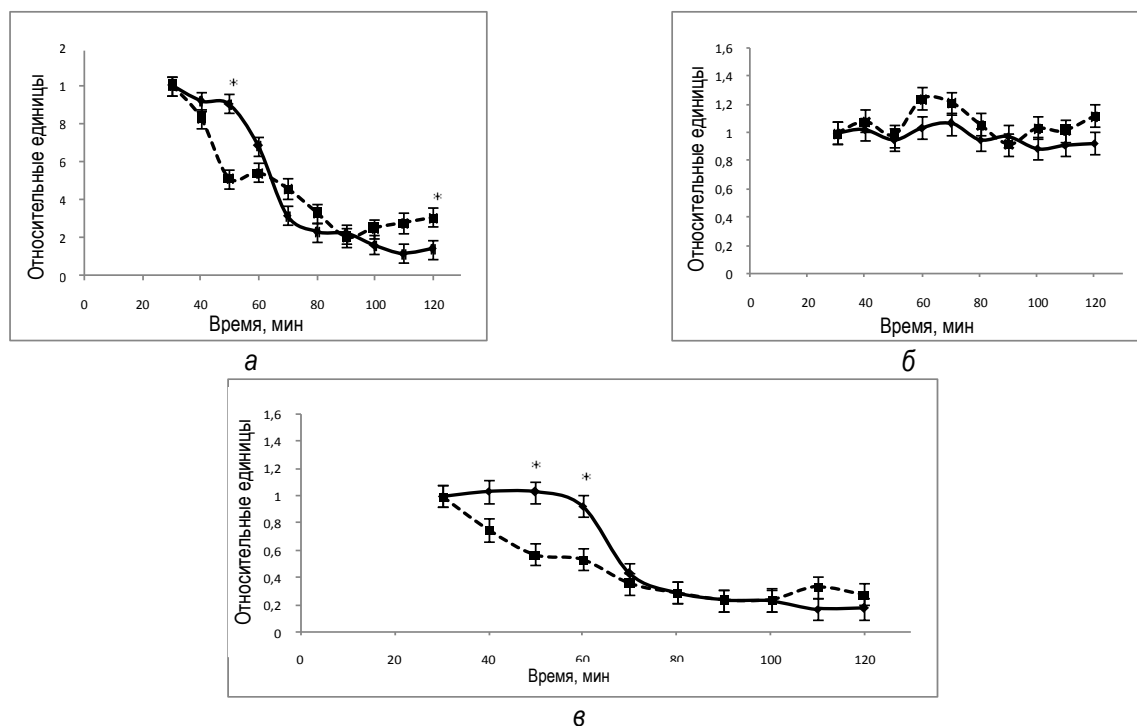


Рис. 5. Динамика уровней лактата (а), пирувата (б) и отношения лактат/пируват (в) в группах 1 (пунктирная кривая) и 2 (сплошная кривая) в системе изолированной перфузируемой печени крыс при введении норадреналина. * обозначает $P < 0,05$ в сравнении со значениями для группы 1

Влияние молочной кислоты на показатели жизнедеятельности
изолированной перфузируемой печени крысы

На рисунке 6, а представлена динамика содержаний молочной и пировиноградной кислот в венозной ветви циркуляции. В контроле – перфузия без введения пирувата и лактата в среду.

Из рис. 6, б следует, что введение молочной кислоты приводит к повышению содержания глюкозы, в то время как в контроле содержание глюкозы относительно стабильно. Увеличение содержания глюкозы в этих условиях, возможно, означает участие лактата в метаболическом пути глюконеогенеза.

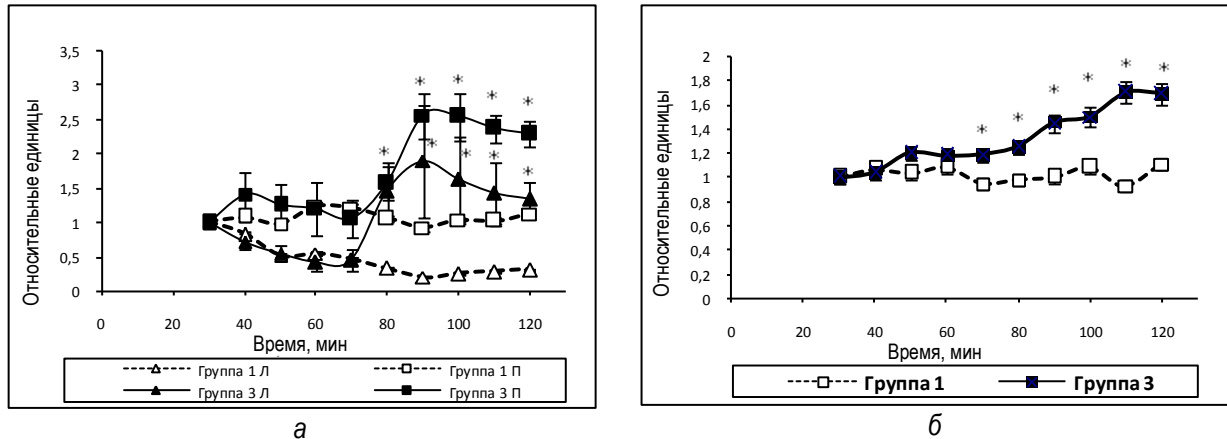


Рис.6. Динамика содержаний молочной и пировиноградной кислот (а) и глюкозы (б) в венозной ветви циркуляции при перфузии изолированной печени крысы: * обозначает $P < 0,05$ в сравнении со значениями для группы 1

Исходя из данных, представленных в таблице 1, можно считать, что изолированный орган адекватно реагирует на введение норадреналина повышением уровня давления в воротной вене. Полученные данные также могут свидетельствовать о том, что в системе изолированной перфузируемой печени идет нормальный кислородный метаболизм.

По полученным данным можно судить также о том, что изолированная перфузируемая печень может продолжать выполнять одну из своих уникальных метаболических функций – превращение лактата в глюкозу.

Представленные данные свидетельствуют о том, что во время подъема содержания молочной кислоты и пирувата скорость прироста содержания молочной кислоты меньше скорости прироста пировиноградной (табл. 2). Это может означать, что активируется не только кислородный метаболизм, например, цикл Кребса, дыхание в митохондриях, но и другой путь метаболизма лактата, присущий интактной печени, глюконеогенез.

Таблица 2

Динамика скорости изменения содержаний лактата и пирувата в группах 1 и 3, относительные единицы, в системе изолированной перфузируемой печени крыс при введении лактата

Время, мин	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
<i>Лактат</i>										
Группа 1	1,000 ±0,050	-1,843 ±0,092	0,188 ±0,009	0,502 ±0,025	0,751 ±0,038	0,751 ±0,038	-0,260 ±0,013	-0,182 ±0,009	-0,177 ±0,009	-0,184 ±0,009
Группа 3	1,000 ±0,050	-1,448 ±0,072	-0,704 ±0,035*	-0,128 ±0,006*	6,472 ±0,324*	3,864 ±0,193*	-2,080 ±0,104*	-1,544 ±0,077*	-1,160 ±0,058*	-0,584 ±0,029*
<i>Пируват</i>										
Группа 1	1,000 ±0,050	-1,259 ±0,063	3,250 ±0,163	-0,345 ±0,017	-1,905 ±0,095	-1,741 ±0,087	1,405 ±0,070	-0,241 ±0,012	1,310 ±0,066	-0,655 ±0,033
Группа 3	1,000 ±0,050	-1,360 ±0,068	-1,800 ±0,090*	-0,200 ±0,010*	6,740 ±0,337*	16,700 ±0,835*	-0,360 ±0,018*	-3,200 ±0,160*	-2,320 ±0,116*	-1,320 ±0,066*

* Обозначает $P < 0,05$ в сравнении со значениями для группы 1.

Выводы

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что норадреналин нормализует физиологическую и метаболическую активности изолированной печени при перфузии и может быть использован для стабилизации параметров гомеостаза органа.

Протекание глюконеогенеза в изолированной перфузируемой печени наряду с обычным аэробным метаболизмом углеводов может свидетельствовать о том, что функционирование органа в условиях искусственного гомеостаза протекает адекватно условиям *in vivo*. Нагрузка молочной кислотой, в свою очередь, может служить удобным и надежным тестом на адекватность перфузии.

Результаты исследования свидетельствуют также о том, что жизнеспособность изолированной перфузируемой печени зависит от длительности подготовительного периода, во время которого орган находится в состоянии гипоксии. Чем короче период между выделением органа и подсоединением к системе искусственного жизнеобеспечения, тем стабильнее его функционирование.

Литература

1. Alexander H.R.Jr, Butler C.C. Development of isolated hepatic perfusion via the operative and percutaneous techniques for patients with isolated and unresectable liver metastases // *Cancer*. – 2010. – Vol. 16, № 2. – P. 132-141.
2. Participation of the liver gluconeogenesis in the glibenclamide-induced hypoglycaemia in rats / S.A. Geisler [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 2011. – Vol. 29, № 2 – P. 81–86.
3. Gerrit van Hall. Lactate kinetics in human tissues at rest and during exercise // *Acta Physiol.* – 2010. – Vol. 199, № 4 – P. 499–508.
4. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium // *J Physiol.* – 2004. – Vol. 558, № 1 – P. 5–30.
5. Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 44, № 1 – P. 33–45.
6. Targeted gene delivery to selected liver segments *via* isolated hepatic perfusion / H. Kinoshita [et al.] // *J Surg Res.* – 2010. – Vol. 160, № 1 – P. 47–51.
7. Induced hypoglycemia for 48 hours indicates differential glucose and insulin effects on liver metabolism in dairy cows / L. Kreipe [et al.] // *Journal of Dairy Science (JDS)*. – 2011. – Vol. 94, № 11 – P. 5435–5448.
8. Role of oxygen during hypothermic machine perfusion preservation of the liver / B. Lüer [et al.] // *Transplant International*. – 2010. – Vol. 23, № 9. – P. 944–950.
9. Molecular regulation of lipid metabolism in liver and muscle of rainbow trout subjected to acute and chronic insulin treatments / S. Polakof [et al.] // *Domestic Animal Endocrinology*. – 2010. – Vol. 39, № 1. – P. 26–33.
10. Sharize Betoni Galende et al. Glucose administration inhibits the hepatic activation of gluconeogenesis promoted by insulin-induced hypoglycemia // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2009. – Vol. 52, № 4. – P. 849-854.
11. Sharma A.M., Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue-understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92, № 2. – P. 386–395.
12. Рупенко А.П., Круглик О.В., Моргулис И.И. Функциональная активность изолированной перфузируемой печени зависит от состава среды // *Бюл. экспериментальной биологии и медицины*. – 2008. – Т. 146, № 7 – С. 117–120.
13. Рупенко А.П., Круглик О.В., Моргулис И.И. Снабжение печени кислородом в условиях изолированной перфузии // *Докл. Академии наук*. – 2008. – Т. 418, № 1. – С. 128–130.

