

Энергетический статус ткани печени крыс при ишемических повреждениях

Э. И. Гальперин,

Л. Ц. Платонова,

Н. И. Шоно,

А. Ю. Чевокин

Отдел хирургии
печени (зав. -
проф.

Э.И.Гальперин)

Московской

медицинской

академии им.

И.М. Сеченова

Изучено энергетическое состояние ткани печени крыс линии Вистар при различной по продолжительности ишемии 40% массы печени ($n = 67$). Контрольную группу составили 20 ложнооперированных животных. Определяли содержание адениновых нуклеотидов, энергетический потенциал и активность ключевых ферментов основных путей утилизации глюкозы, обеспечивающих клетку энергией. С увеличением времени ишемии наблюдали быстрое снижение энергетического состояния ишемизированной ткани печени, сочетающееся с повышением летальности животных. Уровень аденозинтрифосфата на 120 мин после начала ишемии составлял 28% от нормального уровня. В реперфузионном периоде имело место восстановление энергетического статуса ишемизированной ткани. При 15-минутной ишемии содержание адениновых нуклеотидов достигало исходного уровня через 10 мин после начала реперфузии, при 30-минутной ишемии — через 30 мин реперфузии. При 60-минутной ишемии начало реперфузии (5 мин) сопровождалось снижением показателей энергетического метаболизма и лишь через 60 мин приближалось к норме. При ишемии 120-минутной рост показателей энергетического метаболизма наблюдался только через 30 мин после начала реперфузии. Однако при 2-часовой реперфузии восстановления энергетического статуса ткани печени не происходило. Выявлено снижение активности ключевых ферментов обмена глюкозы с увеличением длительности ишемического воздействия. В ранние сроки реперфузии (5-10 мин) обнаружено угнетение пентозомонофосфатного пути и гликолиза; активность цикла Кребса не менялась. В более поздние сроки реперфузии (30—60 мин) наблюдали незначительное восстановление активности гликолиза и почти полное восстановление цикла Кребса. Активность пентозомонофосфатного пути оставалась на низком уровне. Реперфузионный период после ишемии продолжительностью более 60 мин не сопровождался восстановлением энергетического состояния печени (при 2-часовой реперфузии), что сочеталось с высокой летальностью животных.

Hepatic Energy State in Ischemic Lesions of Rats

E. I. Galperin,

L. V. Platonova,

N. I. Shono,

A. Yu. Chevokin

Liver Surgery
Department

(Director - prof.

E.I.Galperin).

I.M.Sechenov

Moscow Medical

Academy

Hepatic energy state was studied in Wistar rats following 40% liver tissue different duration ischemia ($n= 67$). The control group consisted of 20 Sham-operated animals. Content of adenine nucleotides, energy potential, activity of glucose consumption main pathway key enzymes was defined. Elevating terms of ischemia rapid fall of liver energy state was observed, accompanied with mortality rate elevation. On 120 min of ischemia ADP content was equal 28% of its normal level. In reperfusion period energy state of the ischemic liver recovered. After 15 min ischemia the level of adenine nucleotides returned to its normal level in 10 min of reperfusion. After 30 min ischemia - in 30 min of reperfusion. After 60 min ischemia onset of reperfusion (on 5 min) was accompanied with drop of the liver energy state and its resuscitation was noticed only in 60 min. After 120 min ischemia energy state was beginning its restoration only on 30 min of reperfusion, but did not come to its normal level even after 120 min reperfusion. Decrease of glucose consumption main pathway key enzymes activity depended

on ischemic time. In initial terms (5-10 min) of reperfusion pentosomonophosphate pathway and glycolyse were noted to be depressed. Crebbs cycle activity did not change. In later terms (30-60 min) glicolyse activity slight recovery and almost cycle full restoration was stated. Pentosomonophosphate pathway activity remained on low level. After more than 60 min ischemia reperfusion (even during 2 hours) was not accompanied with liver energy state restoration and led to high mortality rate of animals.

Одной из актуальных проблем хирургической гепатологии является снижение ишемического повреждения печени во время операции при наложении турникета на гепатодуоденальную связку, во многом обуславливающее неблагоприятное течение послеоперационного периода [2]. Большинство процессов, которые направлены на сохранение функции органа, являются энергозависимыми. В связи с этим обеспечение клеток органа высокоэнергетическими соединениями способно снизить степень ишемического повреждения.

При ишемии и реперфузии органа наблюдается значительное повреждение ткани, связанное с увеличением продукции свободных радикалов, способных индуцировать апоптоз, который является также энергозависимым процессом [5]. Блокирование механизмов апоптоза может иметь большое значение в предупреждении и лечении ишемических повреждений [5]. При ишемии печени нарушается образование аденозинтрифосфата (АТФ), универсального источника энергии в клетке. В связи с этим изучение энергетического статуса тканей при разной степени тяжести ишемических повреждений приобретает большой практический интерес.

Целью данного исследования являлось изучение энергетического состояния ткани печени после разных по продолжительности ишемических и реперфузионных воздействий на нее.

Материал и методы

Разработана и применена на крысах (Вистар) модель ишемии 40% ткани печени. Эксперименты проводили на 67 самках крыс весом 250-300 г натошак. Контрольную группу составили 20 ложнооперированных животных. Выполняли срединную лапаротомию под наркозом (внутримышечное введение бриетала в концентрации 50 мг/кг). Ишемию создавали наложением микрозажимов на основание левой боковой доли печени с пережатием сосудистой ножки транспаренхиматозно. На время ишемии рану закрывали асептической повязкой, смачивая физиологическим раствором. Зажимы снимали через 15-120 мин. Время реперфузии в разных опытах составляло от 5

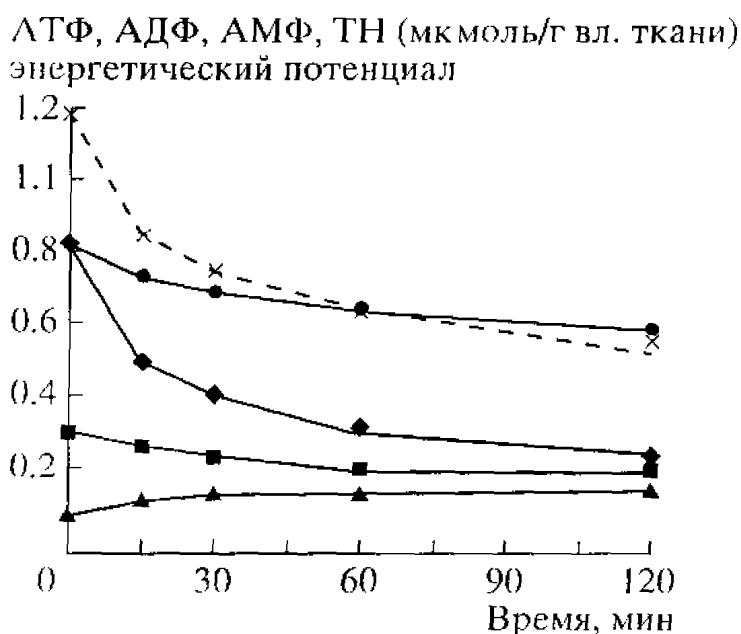


Рис. 1. Адениновые нуклеотиды (АТФ ♦, АДФ ■, АМФ ▲, ТН ×) и энергетический потенциал (●) в ишемизированной ткани печени крыс. По оси абсцисс – время, мин.

По оси ординат – АТФ, АДФ, АМФ, ТН (мкмоль/г вл. ткани), энергетический потенциал.

до 120 мин. У животных канюлировали воротную вену и промывали через нее печень охлажденным физиологическим раствором. После перфузии ишемизированную долю печени иссекали и сразу же помещали на лед.

Для исследования адениновых нуклеотидов 1 г размятой ткани печени гомогенизировали в 3 мл охлажденной 5% перхлорной кислоты с 1 мМ додецилсульфатом натрия на холоду. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 13 мин при 4°C. В полученном супернатанте определяли АТФ, аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ) по стандартной методике энзиматически на спектрофотометре СФ-46 при 340 нм [7]. Содержание адениновых нуклеотидов выражали в мкмоль/г влажной ткани печени. Уровень энергетического потенциала вычислен по формуле Аткинсона $(АТФ + 1/2АДФ)/(АТФ + АДФ + АМФ)$ [6]. Тотальные адениновые нуклеотиды (ТН) рассчитывали как сумму трех нуклеотидов.

Для определения активности гексокиназы (ГК; КФ 2.7.1.1), фосфофруктокиназы (ФФК; КФ 2.7.1.11), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГФД; КФ 1.1.1.49) и изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ; КФ 1.1.1.41) ткань печени гомогенизировали в охлажденном физиологическом растворе. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин при 4°C. В полученном супернатанте определяли активность ферментов кинетически по стандартной методике [4, 8]. Изменения оптической плотности фиксировали при 340 нм. Активность ферментов выражали в мкмоль/мин x г влажной ткани печени.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью метода Стьюдента и коэффициента корреляции.

Результаты

На рис. 1 показано влияние различной по продолжительности ишемии на энергетическое состояние тканей ишемизированной доли печени. Уровень АТФ наиболее резко снижался на 15 и 30 мин после начала ишемии. В эти периоды он составлял 60 и 40% ($p < 0.01$) от контрольного уровня, соответственно. Уровни АДФ, ТН и энергетического потенциала также снижались и на 15 и 30 мин составляли 89,72 и 89% ($p < 0.05$) и 78, 63, 84% ($p < 0.01$) от исходного уровня, соответственно. При увеличении времени ишемии до 120 мин уровни АТФ, АДФ, ТН и энергетического потенциала снижались до 28, 67, 47 и 72% ($p < 0.01$) от нормального уровня, соответственно. Уровень АМФ возрастал и через 30 и 120 мин после ишемии составлял 147 и 191% ($p < 0.01$) от исходного уровня, соответственно.

После снятия зажимов в ишемизированной доле начиналось восстановление кровотока (реперфузия), что сопровождалось повышением энергетического статуса (рис. 2). Через 5 мин реперфузии после 15-минутной ишемии наблюдали увеличение уровней АТФ, АДФ, ТН и энергетического потенциала, которые к этому времени составляли 77, 95 ($p < 0.05$), 84 и 95% ($p < 0.01$) от контрольного уровня, соответственно. Уровень АМФ составлял 130% ($p < 0.01$) от исходного значения. Через 10 мин реперфузии эти показатели практически достигали нормы и составляли 94, 99, 96 и 99% ($p > 0.05$) от контрольного значения, соответственно. Уровень ДМФ составлял 109% ($p > 0.05$) от контроля. После 30-минутной ишемии восстановление энергетического статуса происходило несколько медленнее. Через 5 мин уровни АТФ, АДФ, ТН и энергетического потенциала составили 62 ($p < 0.01$), 90 ($p > 0.05$), 73 и 90% ($p < 0.01$) от контрольного значения, соответственно; через 15 мин - 76 ($p < 0.05$), 94 ($p > 0.05$), 82 и 95% ($p < 0.05$), соответственно; через 30 мин - 98, 99, 98 и 100% ($p > 0.05$) от контроля, соответственно. Уровни АМФ через 5, 15 и 30 мин были равны 138 ($p < 0.01$), 115 и 96% ($p > 0.05$) от контрольного значения, соответственно. Начало реперфузии после 60-минутной ишемии сопровождалось снижением показателей энергетического метаболизма. Через 5 мин реперфузии уровни АТФ, АДФ, ТН и энергетического потенциала продолжали снижаться и составляли 36, 69, 53 и 78% ($p < 0.01$) от контроля, соответственно. Через 20 мин наблюдали рост этих показателей - 66 ($p < 0.01$), 89 ($p > 0.05$), 76 и 92% ($p < 0.01$) от исходного значения, соответственно. Уровни АМФ через 5 и 20 мин реперфузии составили 188 и 132% ($p < 0.05$) от контрольного значения, соответственно. Через 60 мин после начала реперфузии уровни АТФ, АДФ, ТН и энергетического потенциала приближались к контролю - 91, 96, 94 и 98% ($p > 0.05$) от исходного значения. АМФ со-

ставлял 119% ($p < 0.05$) от контрольного значения. При увеличении продолжительности ишемии до 120 мин в раннем реперфузионном периоде не наблюдали тенденции к восстановлению энергетического статуса ткани печени, наоборот сохранялось его снижение. Через 5 мин реперфузии уровни АТФ, АДФ, ТН и энергетического потенциала составляли 14, 62, 37 и 58% ($p < 0.01$) от контрольного значения, соответственно. Через 30 мин реперфузии начинался рост этих показателей, но через 120 мин реперфузии не происходило нормализации энергетического статуса тканей: уровни АТФ, АДФ, ТН и энергетического потенциала - 47, 75, 61 и 83% ($p < 0.01$) от контроля, соответственно.

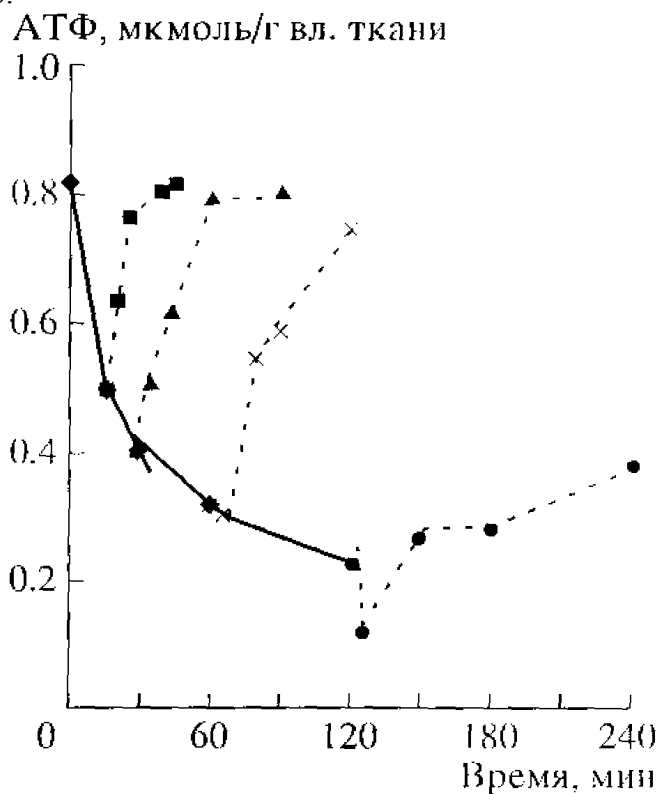


Рис. 2. Изменение АТФ в ишемизированной ткани печени крыс при ишемии (—) и реперфузии (....).

По оси абсцисс – время, мин.

По оси ординат – АТФ (мкмоль/г влажной ткани).

■ – АТФ при реперфузии после 15 мин ишемии, ▲ – после 30 мин ишемии, × – после 60 мин ишемии, • – после 120 мин ишемии.

На рис. 3 показано влияние различной по продолжительности ишемии и последующей реперфузии на активности ключевых ферментов основных путей обмена глюкозы, обеспечивающих клетку энергией – ГК; ФФК - ключевых ферментов гликолиза; ГФД - ключевого фермента пентозомонофосфатного пути утилизации глюкозы и ЦДГ - одного из ключевых ферментов цикла Кребса. Через 15 и 30 мин после начала ишемии наблюдалось незначительное снижение активности ферментов: активность ГК составляла 98 ($p > 0.05$) и 88% ($p < 0.05$) от нормального уровня, соответственно, активность ФФК - 94 ($p > 0.05$) и 86% ($p < 0.01$), активность

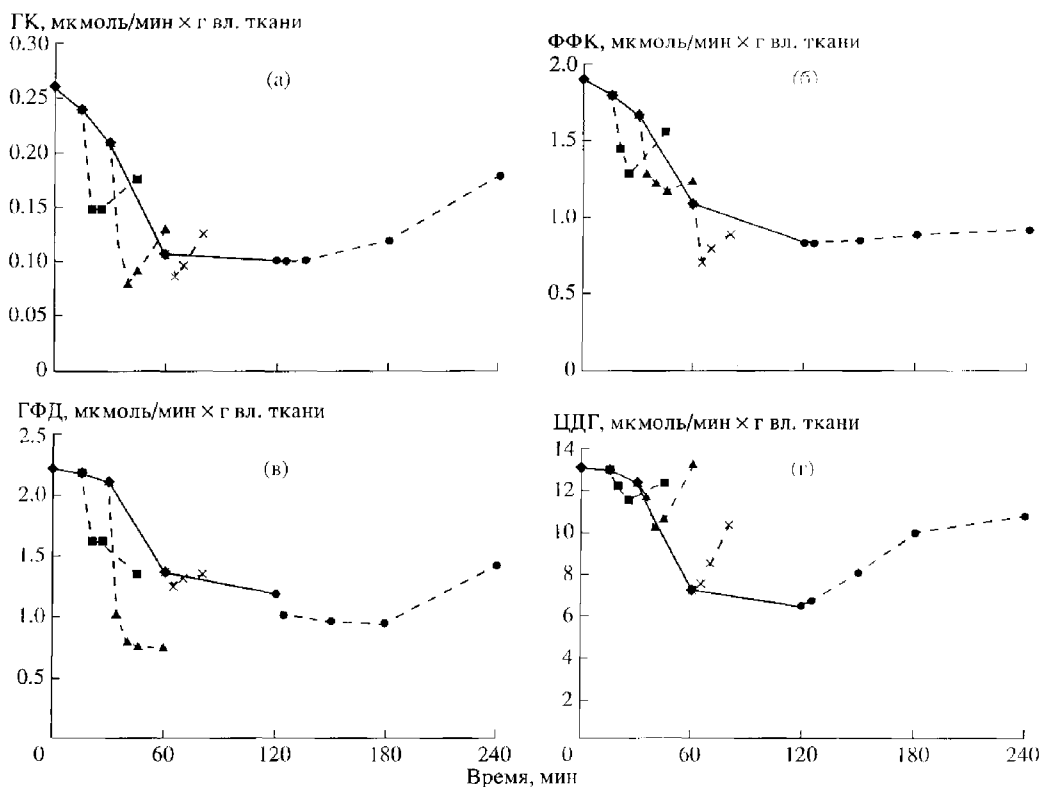


Рис. 3. Активность ключевых ферментов основных путей обмена глюкозы в ткани печени крыс во время ишемии (—) и реперфузии (....).

По оси абсцисс – время, мин.

По оси ординат – активность ГК (а), ФФК (б), ГФД (в), ЦДГ (г), $\mu\text{кмоль}/\text{мин} \times \text{г вл. ткани}$ печени.

■ – активность ферментов при реперфузии после 15 мин ишемии, ▲ – после 30 мин ишемии, × – после 60 мин ишемии, • – после 120 мин ишемии.

ГФД - 97 и 95% ($p > 0.05$) и активность ЦДГ - 96 и 94% ($p > 0.05$) от контрольного уровня. Наиболее резкое снижение активности ферментов показано через 60 мин после начала ишемии. Активность ГК составляла 36% ($p < 0.01$) от исходного уровня, ФФК - 58%, ГФД - 61 и ЦДГ - 56% ($p < 0.01$). Дальнейшее увеличение времени ишемии приводило к более плавному снижению активности ферментов.

При реперфузии изменение активности исследуемых ферментов носило неоднозначный характер. 15-минутная ишемия и 5-минутная реперфузия приводили к значительному снижению активности гликолитических ферментов (активность ГК (рис. 3а) составляла 59% ($p < 0.01$), а ФФК (рис. 3б) - 76% ($p < 0.01$) от исходного уровня). Через 10 мин реперфузии активность ГК практически не менялась, а активность ФФК продолжала снижаться до 68% ($p < 0.01$) от нормального уровня. 30-минутная реперфузия сопровождалась восстановлением активности этих ферментов: ГК - до 80% ($p < 0.01$) и ФФК - до 82% ($p < 0.05$) от исходного уровня. После 30-минутной ишемии также наблюдалось значительное снижение активности гликолитических ферментов в раннем постишемическом периоде. Активность ГК через 15 мин реперфузии достигала минимального

Летальность крыс после разных периодов ишемии	
Время ишемии, мин	Летальность/n
15	0/15
30	0/17
60	3/17
120	6/18

уровня -38% ($p < 0.01$) и активность ФФК - 62% ($p < 0.01$) от контрольного значения. Дальнейшее проведение реперфузии сопровождалось восстановлением активности этих ферментов: ГК - до 48% ($p < 0.01$), ФФК - до 65% ($p < 0.01$) от нормы. При увеличении продолжительности ишемии до 60 мин в раннем реперфузионном периоде изменения активности ключевых ферментов гликолиза не наблюдали. При продолжительности ишемии 120 мин не наблюдалось снижения активности ГК и ФФК в первые 60 мин реперфузии и через 120 мин после начала реперфузии происходило медленное восстановление активности ферментов ГК - до 70% ($p < 0.01$) и ФФК - до 48% ($p < 0.01$) от исходного уровня.

Изучение активности ГФД (рис. 3в) в раннем реперфузионном периоде после различных сроков ишемии показало значительное снижение активности фермента. Реперфузия после 15-минутной ишемии вызывала снижение активности фермента до 61% ($p < 0.01$) от нормы, после 30-минутной ишемии (до 33% ($p < 0.01$), после 60-минутной ишемии - до 61% ($p < 0.01$). Восстановление активности ГФД отмечено только после 120-минутной ишемии с последующей 120-минутной реперфузией.

При исследовании активности ЦДГ (рис. 3г) показана высокая способность фермента к восстановлению активности во время реперфузии. После 15-минутной ишемии в первые 10 мин реперфузии наблюдалось снижение активности фермента до 89% ($p > 0.05$) от исходного уровня и через 30 мин реперфузии - восстановление активности фермента до 94% ($p > 0.05$). После 30-минутной ишемии отмечали снижение активности ЦДГ через 10 мин после начала реперфузии до 79% ($p > 0.05$), продолжение реперфузии до 30 мин сопровождалось восстановлением активности фермента до исходного уровня. Реперфузия, следующая за 60-минутной ишемией, вызывала увеличение активности фермента в раннем постишемическом периоде до 79% ($p < 0.05$) от исходного уровня. После 120-минутной ишемии также наблюдали восстановление активности ЦДГ, однако даже 120-минутная реперфузия не приводила к полному восстановлению активности фермента (82% ($p > 0.05$) от исходного уровня).

В таблице приведены данные о летальности крыс после разных периодов частичной ишемии печени. Летальность животных увеличивалась с увеличением времени ишемии. После 15- и 30-минутной ишемии в течение всего периода исследования выжили все животные. После 60- и 120-минутной ишемии выжили 82 и 66% животных, соответственно.

Обсуждение

Модель ишемии 40% ткани печени позволила снизить влияние измененного выключением доли печени портального кровотока при реперфузии на локальную гемодинамику и энергетический статус в ишемизированной доли печени по сравнению с моделями ишемии печени, используемыми другими авторами (ишемия 70% ткани печени, всей печени, всей печени с наложением портобедренного шунта) [10, 11].

Энергетический статус оценивали по уровню АТФ, АДФ, АМФ, ТН и энергетическому потенциалу, который является интегральным показателем АТФ-синтезирующей и АТФ-утилизирующей способности клетки [6]. Полученные результаты свидетельствуют о значительном снижении энергетического статуса ишемизированной доли печени в течение 30 мин после начала ишемии. Увеличение времени ишемии до 120 мин сопровождается дальнейшим снижением энергетического статуса, но снижение носит более плавный характер. В ишемизированных тканях на моделях ишемии 70% ткани печени крысы и ишемии всей печени с наложением обходного портобедренного шунта снижение энергетического статуса происходит более быстро [9, 11].

Восстановление кровотока в период реперфузии в ишемизированной доли печени сопровождается нормализацией показателей энергетического статуса. В постишемическом периоде наблюдается следующая зависимость: с увеличением продолжительности ишемии возрастает время, необходимое для восстановления энергетического статуса ишемизированных тканей. При увеличении времени ишемии до 120 мин в раннем реперфузионном периоде (5 мин) имеет место снижение энергетического статуса, которое, вероятно, является результатом функционирования печени, связанного с утилизацией субстратов, поступающих по воротной вене.

Исследование активности ключевых ферментов основных путей обмена глюкозы показало значительное угнетение всех основных путей утилизации глюкозы, обеспечивающих клетку энергией в ишемизированной доле печени, особенно через 60 мин ишемического воздействия.

Показана прямая зависимость между длительностью ишемического воздействия и снижением активности ключевых ферментов обмена глюкозы. В ранние сроки реперфузии (5-10 мин) обнаружено угнетение пентозомонофосфатного пути и гликолиза; активность цикла Кребса не менялась. В более поздние сроки реперфузии (30-60 мин) наблюдали незначительное восстановление активности гликолиза и почти полное восстановление цикла Кребса. Активность пентозомонофосфатного пути в этот период оставалась на низком уровне.

Изменение активности энергетического потенциала во время реперфузии коррелировало ($r = 0.794$) с изменением активности цикла Кребса и не коррелировало с изменением гликолиза и пентозомонофосфатного пути ($r = 0.158$ и 0.138 , соответственно), что может свидетельствовать об использовании для синтеза энергоемких нуклеотидов не глюкозы, а, вероятно, свободных жирных кислот, как энергетически более выгодных соединений.

Таким образом, при ишемии и реперфузии существенным изменениям подвергается субстратный состав путей образования АТФ и переориентирование путей синтеза энергии, направленных на усиление репаративных процессов в раннем постишемическом периоде, что согласуется с данными литературы о нарушении образования АТФ при ишемии всеми метаболическими путями, связанными с этим процессом [1].

Полученные нами данные свидетельствуют о высокой способности печени к восстановлению энергоемких соединений в ходе реперфузии ишемизированной ткани, о чем свидетельствует большая выживаемость животных.

Ранее нами и другими авторами [3] показано снижение энергетического статуса в ткани печени в течение 12 ч после 60 и 80% резекции печени. В последующие двое суток после 60% резекции наблюдали постепенное восстановление энергетического состояния ткани печени, что сопровождалось продукцией гепатотропного фактора роста - одного из важнейших факторов, регулирующих регенерацию печени после частичной гепатэктомии, и высокой степенью выживаемости животных. После 80% резекции восстановления энергетического состояния не было, продукции гепатотропного фактора роста не наблюдали и большинство животных погибало. Нами высказано предположение о зависимости продукции гепатотропного фактора роста от энергетического состояния ткани.

Интересны исследования, сочетающие в одном эксперименте ишемию доли печени с последующей гепатэктомией (70%) неишемизированной доли. Показано, что уже 90-минутная ишемия приводит к снижению регенерирующей способности ткани печени и снижению уровня АТФ в ней по сравнению с контролем оставшейся доли печени после гепатэктомии без ишемического воздействия [12].

Изучение влияния ишемического воздействия на печень крысы показало, что снижение уровня энергетического метаболизма ишемизированной ткани печени сочетается со снижением выживаемости животных. Полученные результаты могут иметь значение при определении возможных и безопасных сроков ишемии печени при проведении на ней оперативных вмешательств и определения прогноза течения послеоперационного периода.

Список литературы

1. *Биленко М.В.* Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина, 1989.
2. *Гальперин Э.И.* Гепатобилиарная хирургия 2008 года. Какая она будет? // *Анналы хирургической гепатологии.* 1998. № 3. С. 132-135.
3. *Гальперин Э.И., Платонова Л.В., Шоно Н.И. и др.* Зависимость продукции гепатотропного фактора роста и туморнекротического фактора - альфа от энергетического состояния печени после ее массивной резекции (экспериментальное исследование) // *Анналы хирургической гепатологии.* 1998. Т. 3. № 2. С. 39-45.
4. *Клиническая ферментология / Под ред. Щеклина Э.* Варшава, 1966.

5. Программированная клеточная гибель / Под ред. Новикова В.С. С.-П.: Наука, 1996.
6. *Atkinson D.E.* The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter // *Biochemistry*. 1966. V. 7. p. 4030-4034.
7. *Bergmeyer H.V.* /In: "Methods of Enzymatic Analysis". N.Y., Academic Press. 1965; ATP. P. 543; ADP and AMP. P. 573.
8. *Brinkmann J., Katz N., Sasse D., Jungerman K.* Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 1978. Bd. 359. №1 1. S. 1561-1571.
9. *Kono Yu., Ozawa K., Tanaka Ju. et al.* Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver // *Transplantation*. 1982. V. 33. № 2. P. 150-155.
10. *Marubayashi S., Dohi K., Ezaki H. et al.* Preservation of ischemic rat liver mitochondrial function and liver viability with CoQ 10 // *Surgery*. 1982. V. 91. №6. P. 631-637.
11. *Marubayashi S., Takenaka M., Dohi K. et al.* Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability // *Transplantation*. 1980. V. 30. №4. P. 294-296.
12. *Maruyama H., Harada A., Kurokawa T. et al.* Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats // *J. Surg. Res.* 1995. V. 58. № 3. P. 290-294.
13. *Nakatani T., Ozawa K., Asano M. et al.* Change in predominant energy substrate after hepatectomy // *Life Sciences*. 1981. V. 28. №3. P. 257-264.
14. *Rabes H.M., Tuzcek H.V., Wirshing R.* // In: "Liver regeneration after experimental injury". 1979. p. 35-52.