

## РЕАКЦИЯ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ НА НОРМОБАРИЧЕСКУЮ ГИПОКСИЮ, МОДЕЛИРОВАННУЮ *in vivo* И *in vitro*

© 2017 г. В.Г. Пахомова\*, К.В. Шадрин\* \*\*, А.П. Рупенко\*,  
О.В. Крюкова\*, И.И. Моргулис\* \*\*

\*Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН»,  
660036, Красноярск, ул. Академгородок, 50

\*\*Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ,  
660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

E-mail: vgrakhomova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.08.16 г.

В условиях искусственного гомеостаза на модели изолированного перфузируемого органа исследованы метаболические особенности печени крыс при гипоксии. Проводили сравнение метаболизма изолированной перфузируемой печени, полученной от интактных животных и помещенной в условия нормобарической гипоксии, и печени животных, которых предварительно содержали в камере для моделирования состояния гипоксии на целом организме, но перфузию проводили средой с нормальным содержанием кислорода. Функциональную активность печени оценивали по уровню портального давления, потреблению кислорода органом, выделению углекислого газа, мочевины, содержанию глюкозы и лактата в перфузионной среде. Полученные результаты показали, что изменения метаболизма изолированной перфузируемой печени при реакции на недостаток кислорода проявляются в одни и те же сроки после воздействия вне зависимости от способа экспериментального моделирования гипоксического состояния, что напрямую свидетельствует о метаболической автономии органа.

*Ключевые слова:* нормобарическая гипоксия, перфузия изолированных органов, метаболизм, печень.

Перфузия изолированных органов используется в трансплантологии в качестве средства поддержания органной жизнедеятельности перед трансплантацией, а также достаточно широко применяется в различных областях экспериментальной биологии, например, в качестве тест-системы при изучении воздействий физических и химических факторов или для исследования биохимических процессов, протекающих в тканях изолированного органа, с последующим применением этих результатов для создания искусственных органов. При этом в некоторых случаях предполагается, что реакция на какие-либо воздействия изолированного органа, находящегося в условиях управляемого культивирования, тождественна реакции органа, находящегося в естественных условиях его функционирования внутри организма.

Методология создания искусственного гомеостаза изолированного органа путем управляемой перфузии позволяет рассматривать и сравнивать метаболические реакции органа, находящегося в целом организме, вне его регуляторных влияний [1]. Однако отсутствие интегрирующего влияния регуляторных систем организма и неполное соответствие состава пер-

фузионного раствора биохимическим и физическим характеристикам крови могут оказывать влияние на метаболические процессы, протекающие в изолированных органах в условиях искусственного гомеостаза.

Биоэнергетические процессы, поддерживающие гомеостаз целого организма и его отдельных органов, зависят от непрерывного снабжения тканей кислородом и необходимыми субстратами. При несоответствии между потребностью тканей органа в кислороде и его доставкой возникает состояние гипоксии, приводящее к нарушению нормального функционирования организма. Такое состояние часто возникает в условиях стресса, спровоцированного действием экстремальных факторов различной природы, и характеризуется наличием функционально-метаболических нарушений, выраженность которых зависит от длительности и тяжести воздействия [2–6]. Особое значение при этом приобретает функционирование органов, напрямую вовлеченных в поддержание гомеостаза организма. Важное место среди них принадлежит печени, которая принимает непосредственное участие в реализации общего адаптационного синдрома, главным образом, усили-

вая выполнение детоксикационной функции [7–11]. В работах по исследованию влияния гипоксии разного генеза как на целый организм, так и на отдельные органы и ткани показаны различные функциональные и метаболические изменения в ответ на экстремальное воздействие. При этом гипоксическое состояние в эксперименте моделируется различными способами. Мы столкнулись с проблемой сравнения различных экспериментальных данных о реакции органов на гипоксию вне организма и внутри него, полученных разными исследовательскими группами.

Целью нашего исследования стало сравнение метаболических и физиологических параметров печени, функционирующей в условиях искусственного гомеостаза на установке для поддержания гомеостаза изолированных органов мелких животных «Гомеостат 3М» при моделировании нормобарической гипоксии *in vivo* и *in vitro*.

Учитывая значимость проблемы нарушения транспорта кислорода для трансплантологии, а также для исследований, связанных с применением метода перфузии изолированных органов, представляется важным обнаружение отличий в реакции на гипоксию органа, функционирующего внутри целостного организма, и изолированного органа в условиях его перфузионной культуры.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на крысах-самцах Wistar массой 200–250 г.

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Животные были разделены на три группы: группа 1 (контрольная) – перфузия изолированной печени интактных животных средой с содержанием кислорода 95%; группа 2 – перфузия средой с содержанием кислорода 14% изолированной печени интактных животных; группа 3 – перфузия средой с содержанием кислорода 95% изолированной печени животных после моделирования состояния гипоксии в метаболической камере.

Состояние нормобарической гипоксии моделировали двумя способами. Первый способ *in vitro* заключался в снижении оксигенации перфузионной среды (14% кислорода в среде), т.е. непосредственно во время перфузии исследу-

емый орган оказывался в состоянии гипоксии. Во втором случае гипоксическое состояние моделировали *in vivo*, помещая интактных крыс на 40 мин в метаболическую камеру, в которую подавали газовую смесь из 14% кислорода и 86% азота со скоростью 100 мл/мин. После этого печень выделяли и подключали к установке для перфузии изолированных органов.

Для группы 1 (контрольной) органы забирала у интактных животных и не подвергали никаким дополнительным воздействиям во время перфузии. Все параметры опытных групп сравнивали с контролем. Перфузию осуществляли с использованием уникальной научной установки «Комплекс оборудования для управляемого культивирования изолированных органов», разработанной в МНЦИЭСО при КНЦ СО РАН. До начала операции выделения органов животным внутрибрюшино вводили тиопентал натрия (100 мг/кг массы животного) в качестве общего наркоза. Для стабилизации гемостаза в латеральную подкожную вену голени вводили гепарин (10 тыс. ед./кг).

После выделения печень взвешивали и подключали через канюли к гемодинамическому контуру перфузионной установки «Гомеостат 3М».

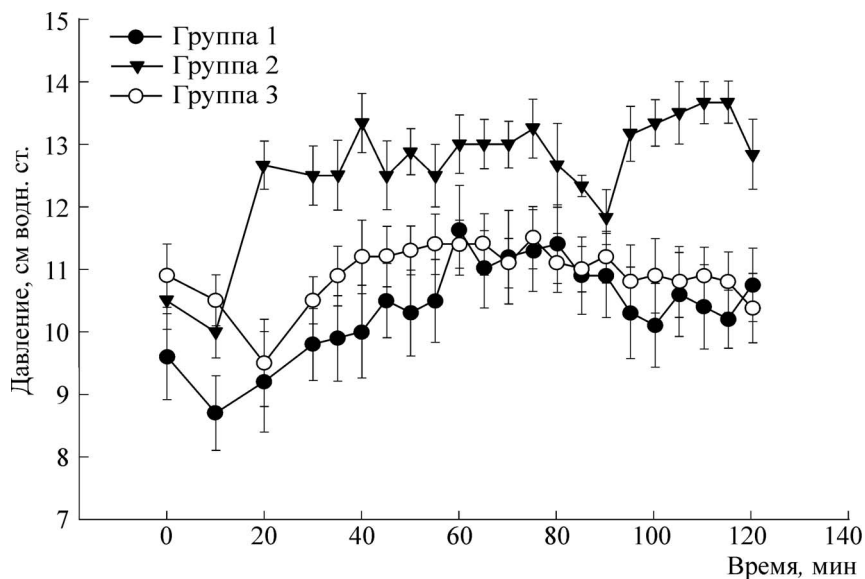
Во всех случаях перфузию проводили при постоянной скорости потока среды 2,5мл/(мин·г).

В качестве перфузионной среды использовали раствор Кребса–Рингера с добавлением 1,7 мМ лактата, 5 мМ хлорида аммония и 0,2 мМ аспарагиновой кислоты [12,13].

В процессе эксперимента определяли (жидкостным манометром) портальное давление, которое в случае постоянной скорости среды отражает сопротивление сосудов печени. Измерение напряжения кислорода, углекислого газа, лактата, глюкозы проводили на анализаторе газов крови ABL 800 Flex (Radiometer, Дания). Концентрацию мочевины в перфузионной среде определяли с использованием набора «Мочевина-Витал» («Vital», Россия).

В последующем рассчитывали по артериально-венозной разнице скорости потребления печенью кислорода, выделения углекислого газа и мочевины.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. Рассчитывали значения средней величины ( $X$ ) и стандартной ошибки ( $\pm x$ ). Для определения достоверности различий использовали критерий Фишера [14]. Данные, приведенные ниже без специальных оговорок, являются статистически достоверными.



**Рис. 1.** Динамика портального давления в изолированной перфузируемой печени крысы (по оси ординат – давление в вене порта, см вод. ст., по оси абсцисс – продолжительность перфузии, мин).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вне зависимости от способа возникновения гипоксического состояния реакция организма представляет собой каскад регуляторно-компенсаторных механизмов, формирующихся на разных уровнях организации и позволяющих уменьшить эффект нарушения кислородного гомеостаза [4,15]. Одним из физиологических параметров, характеризующих реакцию печени на недостаток кислорода, является давление в сосудах изолированного перфузируемого органа крыс (рис. 1).

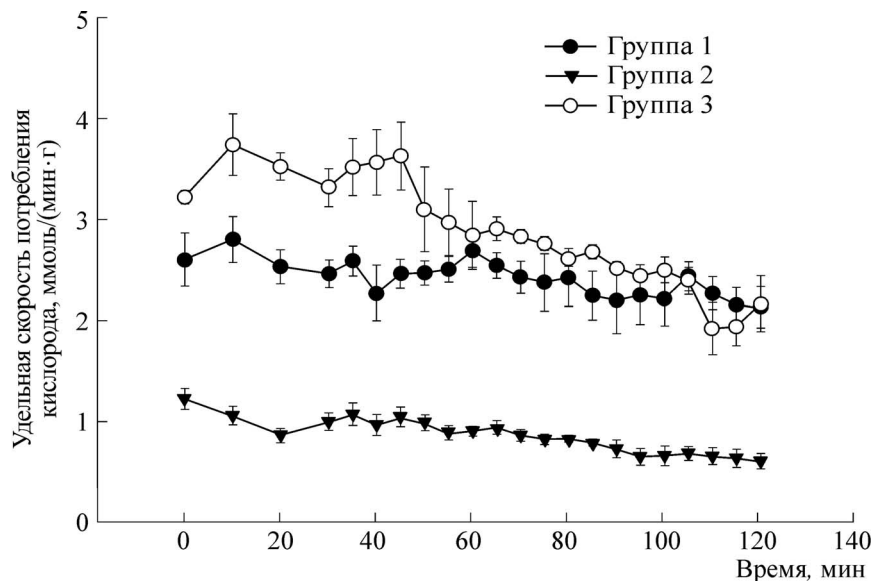
Из представленных на рис. 1 данных видно, что в эксперименте происходило изменение микроциркуляции в сосудах печени. При органной гипоксии наблюдали спазм сосудов изолированной печени на протяжении всего эксперимента (повышение давления на рис. 1 для группы 2). В то же время при гипоксии органа, моделированной *in vivo* (группа 3), нарушение микроциркуляции наблюдается только в первые минуты перфузии, что может быть связано с действием прекапиллярных сфинктеров.

Известно, что у прекапиллярных сфинктеров тонус и диаметр изменяются за счет местных тканевых гормонов тучных клеток и базофилов при их дегрануляции [15]. Действие таких местных тканевых гормонов составляет минуты, что согласуется с результатами нашего эксперимента. Особенностью метода для культивирования изолированных органов является способность рассматривать органные реакции, исключая влияние регуляторных факторов це-

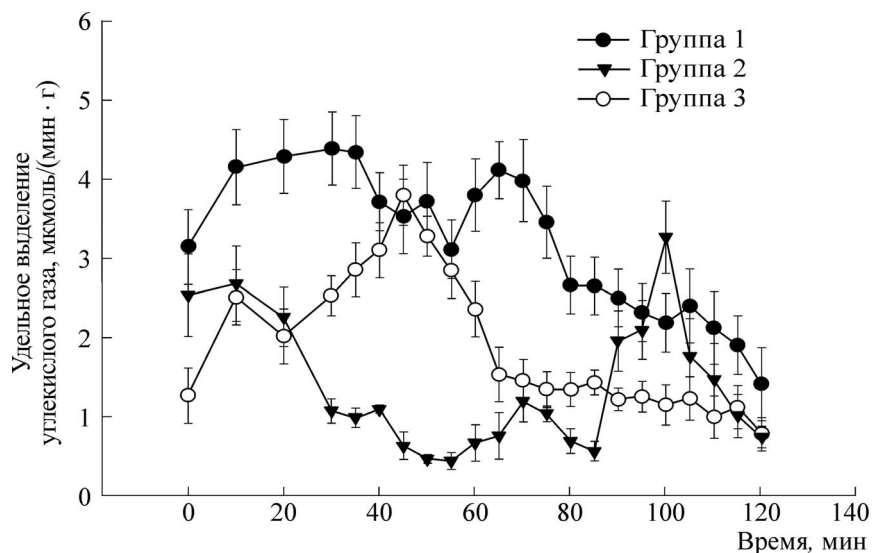
лого организма, при этом сохраняются структура нативного органа и межклеточные взаимодействия, обеспечивается органной кровотоком посредством микроциркуляции и диффузионных потоков.

Изменение регионального кровотока является лишь одним из механизмов компенсации при развитии гипоксического состояния; кислородное обеспечение органов в этих условиях зависит, в том числе, от газового состава крови, диффузионных расстояний для кислорода, способности к утилизации кислорода и др. [16–18]. Известно, что снижение напряжения кислорода в тканях органов животных, вызванное гипоксией, вызывает повышение сродства дыхательных ферментов к кислороду, что должно способствовать максимальному извлечению кислорода из крови [19].

В группе 1 (контрольной) наблюдается стабильное потребление кислорода органом на протяжении всего времени перфузии, в то время как в группе 3 происходит увеличение скорости потребления кислорода сразу после помещения органа в установку, а начиная с 50-й минуты – снижение до контрольных значений (рис. 2). Это может быть связано с тем, что орган до помещения его в установку искусственного жизнеобеспечения испытывал состояние гипоксии *in vivo* на протяжении 40 мин (при нахождении животного в метаболической камере). В группе 2, где орган непосредственно испытывает гипоксию на протяжении всей перфузии, наблюдается стабильное, но сниженное относительно контроля (приблизительно в три раза)



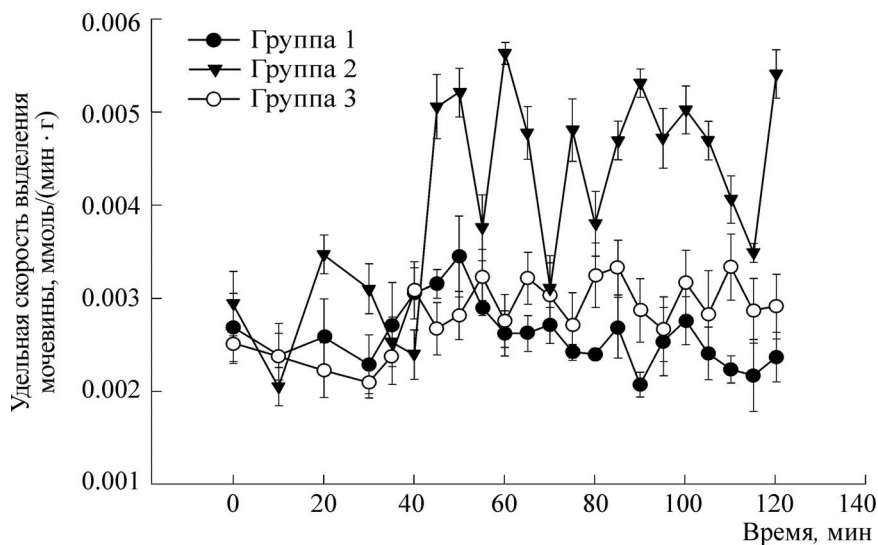
**Рис. 2.** Динамика потребления кислорода изолированной перфузируемой печенью крысы (по оси ординат – удельная скорость потребления кислорода, ммоль/(мин·г), по оси абсцисс – продолжительность перфузии, мин).



**Рис. 3.** Выделение углекислого газа в оттекающем перфузате (по оси ординат – удельная скорость выделения углекислого газа, ммоль/(мин·г), по оси абсцисс – продолжительность перфузии, мин).

потребление кислорода. Значения содержания кислорода в оттекающем перфузате в течение всего времени циркуляции жидкости через орган не опускались ниже 80 мм рт. ст. (против 300 мм рт. ст. во втекающем перфузате). Отсюда следует, что орган потребляет не весь присутствующий в среде кислород, несмотря на искусственное снижение его концентрации в перфузионной среде, что согласуется с данными работ [16,17]. Рассматривая изменения метаболизма изолированного органа с учетом гипоксического воздействия, можно заметить, что

происходит увеличение выхода углекислого газа в перфузионную среду (рис. 3). При этом максимальные уровни выхода углекислого газа в группах 2 и 3 приблизительно одинаковы по величине, однако увеличение содержания углекислого газа в оттекающем перфузате от органов, выделенных у животных группы 3, происходит на 40 мин раньше. При гипоксии в кровотоки попадают недоокисленные продукты обмена, которые нейтрализуются бикарбонатной буферной системой, что в итоге приводит к накоплению  $\text{CO}_2$ . В работе [3] было показано



**Рис. 4.** Динамика выделения мочевины изолированной перфузируемой печенью крысы (по оси ординат – удельная скорость выделения мочевины, ммоль/(мин·г), по оси абсцисс – продолжительность перфузии, мин).

увеличение скорости выделения  $\text{CO}_2$  в сочетании с повышением дыхательного коэффициента, т.е. при гипоксии происходит активация анаэробных процессов в организме. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что вне зависимости от условий возникновения гипоксического состояния как в целом организме, так и непосредственно в изолированном органе в условиях управляемой перфузии через 100 мин после начала гипоксического воздействия происходит полное окисление накопленных продуктов обмена до углекислого газа вследствие улучшения циркуляции перфузионной среды и потребления из нее печенью достаточного количества кислорода. Если для группы 3 суммировать продолжительность существования органа в условиях изолированной перфузии и продолжительность предварительного нахождения животного в состоянии гипоксии *in vivo*, то получим 100 мин. Время достижения максимума концентрации углекислого газа в оттекающем от органа перфузате для группы 2 тоже равняется 100 мин. Таким образом, время от начала гипоксии органа (внутри или вне животного) до подъема содержания углекислого газа одинаково. Это позволяет предположить существование органного, независимого от целого организма, механизма поддержания гомеостаза.

Исходя из этого, можно говорить об автономно (без участия нервной системы) запускаемых адаптивных процессах в ответ на гипоксию в печени.

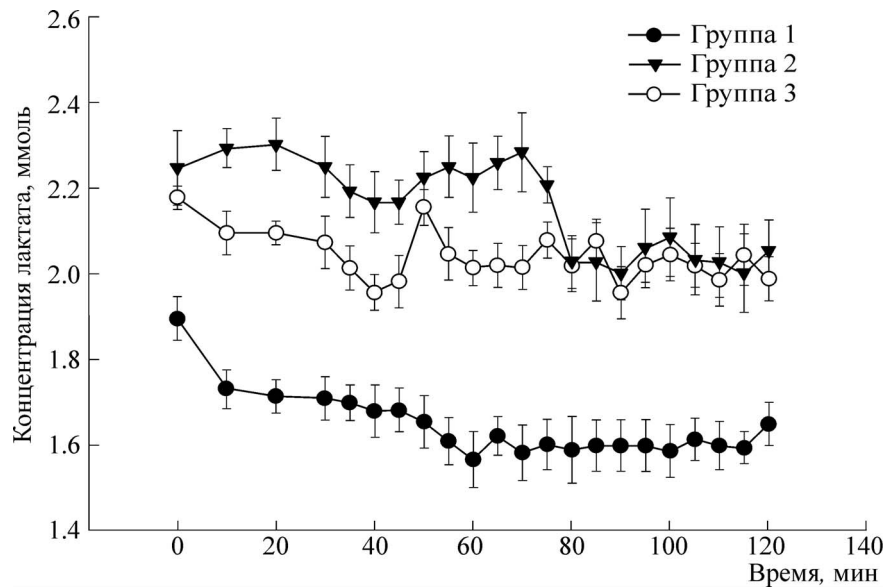
При сравнении рис. 3 и 4 можно видеть, что количество произведенного углекислого га-

за напрямую связано с количеством синтезированной мочевины. Синтез мочевины также может усиливаться посредством недоокисленных продуктов обмена, накапливающихся при недостатке кислорода в среде.

Известно, что гипоксия, как и любое другое стресс-воздействие, сопровождается экстренной мобилизацией защитных сил организма, вызывая перераспределение ресурсов между пластическими и энергетическими процессами в клетках. Вероятно, при низком содержании кислорода в перфузионной среде, при усилении процесса анаэробного распада глюкозы в клетках увеличивается уровень восстановленных кофакторов (таких как НАДН, НАДФН), необходимых для адекватного протекания химических превращений [7–10]. Поэтому клетки начинают использовать в качестве метаболического топлива аминокислоты, активируются реакции окислительного дезаминирования и высвобождение аммиака; как следствие, в перфузионной среде увеличивается содержание мочевины (рис. 4).

Длительное пребывание в условиях сниженного содержания кислорода сопровождается переходом на новый уровень реакции кислородного гомеостаза, который характеризуется экономизацией энергетического обмена [5]

Известно, что цикл мочевины и цикл Кребса связаны друг с другом через образование фумарата, который затем превращается в малат и усиливает интенсивность «вращения» цикла Кребса. Это может приводить к увеличению количества лактата – важного посредника в



**Рис. 5.** Динамика содержания лактата в оттекающем перфузате при перфузии изолированного органа (по оси ординат – концентрация лактата, ммоль, по оси абсцисс – продолжительность перфузии, мин).

процессах метаболизма и окислительно-восстановительного состояния внутри клетки [20,21].

Содержание лактата в оттекающем перфузате (рис. 5) в группах 2 и 3 держится на одном уровне, значительно превышая значения в контрольной группе. Как можно видеть из рис. 5, органы животных групп 2 и 3 выделяют лактат в перфузионную среду, в то время как органы животных группы 1, наоборот, потребляют его из подаваемой перфузионной среды. Такие изменения уровня лактата позволяют предположить, что в печени при действии гипоксии происходит ингибирование глюконеогенеза из лактата, в частности, из-за нарушения доступа к этому процессу макроэргических соединений.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что гипоксия вне зависимости от своего генеза приводит к нарушению микроциркуляции перфузионной среды в органе, но при поступлении кислорода в достаточном количестве в ткани органа спазм «снимается» даже в условиях перфузии. В органе в постгипоксический период происходит расслабление прекапиллярных сфинктеров. Это указывает на саморегуляцию тонуса сосудов печени.

Совпадение времени достижения максимума выделения углекислого газа в группах с моделированной гипоксией также указывает на органную саморегуляцию.

Таким образом, общая ответная реакция организма на острую кислородную недостаточность характеризуется активацией срочных компенсаторных механизмов. В клетке включаются

каскадные механизмы внутриклеточной сигнализации, ответственные за формирование адаптивных признаков.

Поэтому можно предположить наличие метаболической автономии органа, состоящей в каскаде биохимических реакций, возможно, связанных с активацией транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией [22] в клетках печени, функционирующей как *in vivo*, так и в условиях искусственного гомеостаза. Сходную динамику наблюдали и на уровне организма в ходе комплемент-зависимой реакции в постгипоксическом периоде, достигающей наибольшей выраженности через 60 мин после начала гипоксии [23].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. П. Нефедов, В. А. Самойлов, Р. А. Гареев и Т. Д. Ким, *Управление функциональной активностью органов при перфузии* (Наука, Новосибирск, 1982).
2. Б. В. Ашастин, *Вестн. Южно-Уральского гос. университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура* **42** (301), 114 (2012).
3. О. В. Гришин, С. В. Басалаева, Н. В. Устюжанинова и др., *Бюл. физиологии и патологии дыхания* **51**, 8 (2014).
4. Л. Д. Лукьянова, *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* **1**, 3 (2011).
5. А. Н. Макаренко и Ю. К. Карандеева, *Вестн. проблем биологии и медицины* **2** (100), 27 (2013).
6. В. М. Яковлев, А. А. Вишневский и А. С. Шаназаров, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **98** (1), 137 (2012).

7. Е. В. Инжеваткин и А. А. Савченко, Бюл. эксперим. биологии и медицины **157** (6), 757 (2014).
8. Е. В. Инжеваткин, А. А. Савченко, А. И. Альбрант и В. П. Нефедов, Вопр. мед. химии **46** (2), 135 (2000).
9. Л. Д. Лукьянова и А. М. Дудченко, Бюл. эксперим. биологии и медицины. **136** (7), 41–44 (2003).
10. Н. Н. Реммель, В. А. Кратасюк, О. М. Мазняк и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **135** (1), 52 (2003).
11. С. Fondevila, A. J. Hessheimer, M. H. Maathuis, et al. *Ann. Surg.* **254**, 1000 (2011).
12. А. П. Рупенко, О. В. Круглик и И. И. Моргулис, Бюл. эксперим. биологии и медицины **146** (7), 117 (2008).
13. К. В. Шадрин, В. Г. Пахомова, А. П. Рупенко и И. И. Моргулис, Вестн. КрасГАУ **3**, 96 (2013).
14. Н. А. Плохинский, *Биометрия*, 2-е изд. (Изд-во МГУ, М., 1970).
15. *Физиология человека. Учебник для высших учебных заведений*, под ред. акад. РАМН Б. И. Ткаченко и проф. В. Ф. Пятина (СПб., 1996).
16. М. В. Балыкин и Х. Д. Каркобатов, Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова **98** (1), 127 (2012).
17. I. Kuwahira, N. Heisler, J. Piiper, and N. C. Gonzalez, *Resp. Physiol.* **92** (2), 227 (1993).
18. R. T. Shumacker, A. J. Sugget, P. D. Wagner, and J. V. West, *J. Appl. Physiol.* **59** (3), 749 (1985).
19. К. П. Иванов и Е. П. Вовенко, Докл. АН СССР **286** (1), 227 (1986).
20. G. A. Brooks, *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 58 (2002).
21. L. B. Gladden, *Med. Sci. Sports Exerc.* **40** (3), 477 (2008).
22. G. L. Semenza, *J. Clin. Invest.* **123** (9), 3664 (2013).
23. Л. Д. Лукьянова, Л. В. Козлов, А. М. Бичучер и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **150** (12), 626 (2010).

## A Response of the Rat Liver to *in vivo* and *in vitro*-Simulated Normobaric Hypoxia

V.G. Pakhomova\*, K.V. Shadrin\* \*\*, A.P. Rupenko\*,  
O.V. Krukova\*, and I.I. Morgulis\* \*\*

\*Krasnoyarsk Science Centre, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

\*\*Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky,  
ul. Partizana Zeleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

In the artificial homeostasis conditions using a model of the isolated perfused organ the metabolic features of rat liver during hypoxia were explored. Metabolism in the isolated perfused liver obtained from intact animals and subjected to normobaric hypoxic conditions of the perfusion medium was compared with that one in the liver of an animal, which was previously kept in the chamber in order to simulate a hypoxic state for the whole body, but perfusion was performed using the medium with normal oxygen content. Functional liver activity was assessed by the level of portal pressure, the body's oxygen consumption, carbon dioxide gas, urea, glucose and lactate content in the perfusion medium. The results showed that under oxygen deficiency the metabolic changes in the isolated perfused liver appear at the same time after exposure not depending on the methods of experimental simulation of hypoxic condition, that directly points to metabolic autonomy of the organ.

*Keywords: normobaric hypoxia, perfusion of isolated organs, metabolism, liver*