

## **ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС В ДИНАМИКЕ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА ПОСЛЕ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

**Е.В.ИНЖЕВАТКИН<sup>1</sup>, А.А.САВЧЕНКО<sup>1</sup>, А.И.АЛЬБРАНТ<sup>1</sup>, В.П.НЕФЕДОВ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Красноярский государственный университет  
660041, Красноярск, пр.Свободный, 79. Тел.: (3912)448213, Факс: (3912)448625

<sup>2</sup>Международный научный центр исследований экстремальных состояний  
организма при Президиуме Красноярского научного центра СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, Президиум Красноярского научного центра  
СО РАН. Тел.: (3912)495739, Факс: (3912)439765

Методом нерециркуляционной безгемоглобиновой перфузии изолированного органа исследованы метаболические изменения, происходящие в печени крыс в динамике восстановительного периода после однократного гипертермического воздействия (25 минут, 42°C) *in vivo*. Показано, что в первые 6 часов после указанного воздействия происходит снижение интенсивности дыхания органа, активация гликолиза и истощение углеводных запасов печени. К 18 часу, в результате развития клеточных адаптационных реакций, уровень утилизации кислорода восстанавливается, что в дальнейшем может способствовать полному восстановлению метаболизма и функций печени.

**Ключевые слова:** гипертермия, печень, перфузия, метаболизм

**ВВЕДЕНИЕ.** Гипертермия рассматривается многими исследователями как один из перспективных методов профилактики и терапии ряда заболеваний [1, 2]. Однако, пребывание организма в условиях гипертермического воздействия может приводить к метаболическим и функциональным изменениям, которые, в свою очередь, могут оказывать негативное влияние на характер жизнедеятельности отдельных органов. При этом, особое значение приобретает состояние органов, непосредственно участвующих в поддержании гомеостаза организма. Одним из таких органов является печень.

Целью данной работы было исследование метаболических изменений, происходящих в печени крыс в динамике восстановительного периода после гипертермического воздействия.

**МЕТОДИКА.** Опыты проводили на белых беспородных крысах обоих полов массой 170 – 220 г. Для оценки метаболических параметров печени использовалась нерециркуляционная безгемоглобиновая перфузия органа *in situ*

[3] раствором Кребса-Хензелейта на бикарбонатном буфере (рН 7,4), с добавлением 5 мМ глюкозы. Раствор насыщали смесью кислорода и углекислого газа (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) с помощью оксигенатора пузырькового типа. Температура раствора, поступающего в печень со скоростью 18-21 мл/мин, составляла 37°C.

Состояние гипертермии у крыс вызывали, помещая их на 25 минут в индивидуальных клетках в водяную баню с температурой воды 42°C так, что над поверхностью воды находилась только голова животного. Предварительно, с целью предотвращения побочной стрессорной реакции, крысам внутрибрюшинно вводили 0,25% раствор дроперидола в дозе 0,1 мл/100 г веса. Контрольную серию составляли животные, не подвергавшиеся гипертермическому воздействию.

Перфузию проводили через 1, 6 и 18 часов после извлечения животных из водяной бани. После вскрытия брюшной полости канюлировали *v. portae*, через которую перфузионный раствор вводился в печень, и после торакотомии канюлировали *v. cava caudalis*, через которую происходил отток перфузата из печени. Время гипоксии печени при канюлировании сосудов не превышало двух минут. Перед операцией крыс наркотизировали тиопенталом натрия, который вводили внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг массы, после чего внутривенно вводили гепарин в дозе 10000 ЕД/кг массы для предотвращения свертывания крови во время операции. Продолжительность перфузии составляла 90 мин.

Концентрацию кислорода в перфузионном растворе измеряли полярографическим методом [4], концентрации лактата и пирувата определяли биолюминесцентным методом [5, 6], концентрацию глюкозы регистрировали с использованием серийного глюкозоанализатора "Eksan-g" (Литва). Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета прикладных компьютерных программ "Statistica".

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** На рис.1а представлены данные о скорости дыхания перфузируемой печени крыс при различной продолжительности восстановительного периода. Установленное снижение интенсивности потребления кислорода к 1 и 6 часам восстановительного периода (по сравнению с контрольной серией), по-видимому, отражает нарушения в работе дыхательной цепи митохондрий. Такие нарушения, с одной стороны, могут быть связаны с гипертермически индуцируемой активацией перекисного окисления липидов митохондриальных мембран. С другой стороны, снижение интенсивности дыхания может быть вызвано инактивацией ферментных компонентов дыхательной цепи вследствие их прямого взаимодействия с активными формами кислорода, внутриклеточная концентрация которых повышается при гипертермии [7]. Так или иначе, очевидно, что снижение потребления кислорода должно неизбежно приводить к возникновению дефицита АТФ. Снижение концентрации АТФ в клетке, при этом, может затруднить реализацию энергозависимых цитопротекторных механизмов, например, связанных с синтезом и функционированием белков теплового шока [8-10].

В условиях энергодефицита возрастает значение гликолиза как источника АТФ. Это отражается в виде обнаруженного увеличения продукции лактата печенью к 1 и 6 часам восстановительного периода (рис.1б). Активизация гликолиза, по-видимому, является компенсаторной реакцией на уменьшение в клетке концентрации АТФ и увеличение концентрации АДФ и АМФ. Последние, как известно, являются аллостерическими активаторами гликолиза [11].

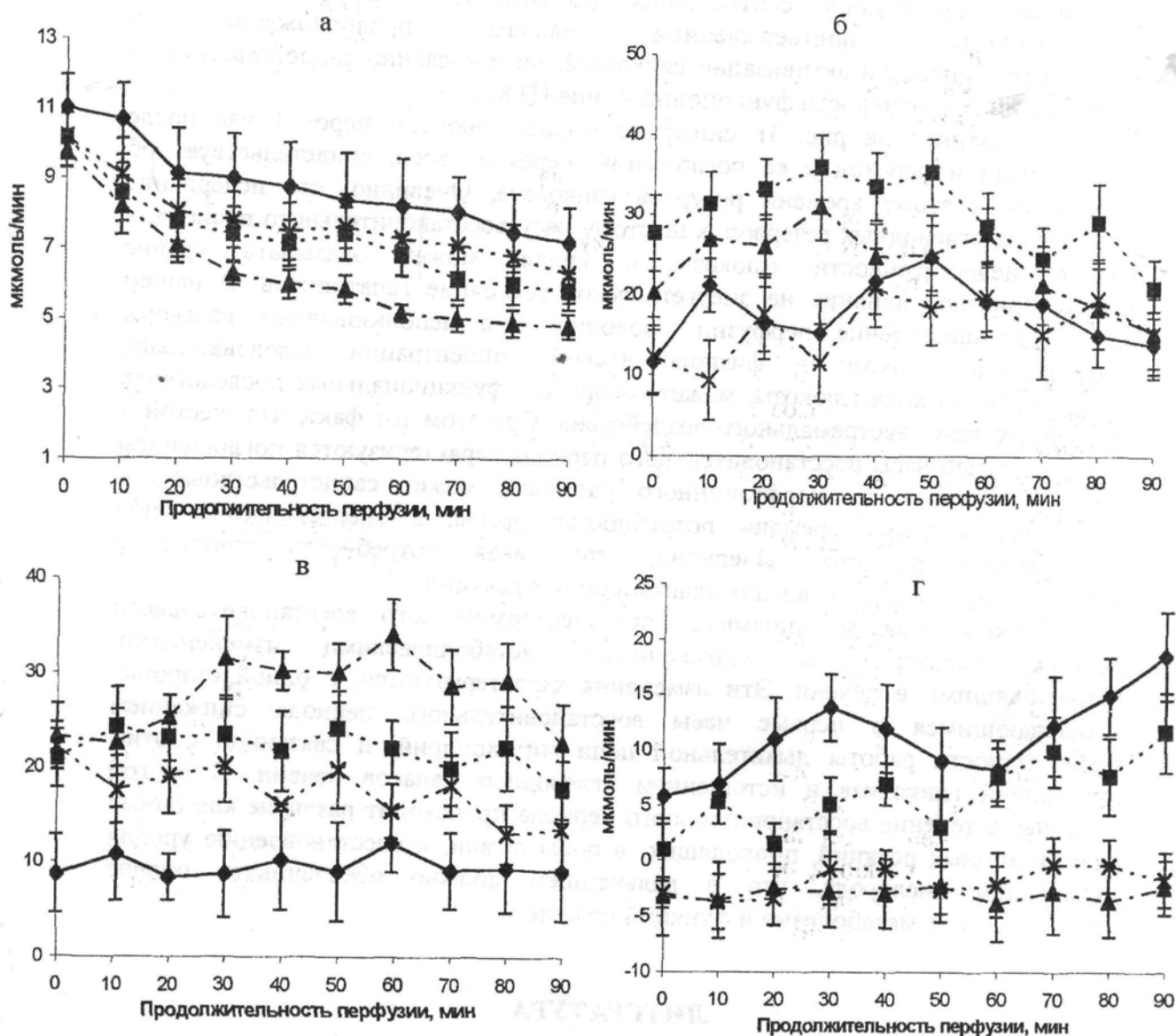


Рисунок 1.

Скорость потребления кислорода (а), выделения лактата (б), соотношение скоростей выделения лактата и пирувата (в) и скорость выделения глюкозы (г) перфузируемой печени крыс при различной продолжительности постгипертермического восстановительного периода.

Условные обозначения:  $\blacklozenge$  - контроль,  $\blacksquare$  - 1 час,  $\blacktriangle$  - 6 часов,  $\times$  - 18 часов

Наряду с динамикой выхода из печени лактата, важное значение может иметь динамика соотношения скоростей выхода лактата и пирувата в течение перфузии, показанная на рис. 1в. Поскольку соотношение между концентрациями этих двух метаболитов в клетке зависит в основном от катализируемой лактатдегидрогеназой реакции, оно может отражать соотношение концентраций НАДН и НАД в клетке [12]. Как следует из представленных данных, 1 и 6 часы восстановительного периода характеризуются возрастанием соотношения скоростей выхода лактата и пирувата, что свидетельствует об увеличении в клетке соотношения НАДН/НАД. Это возможно, является результатом нарушения согласованности в работе систем, воспроизводящих НАДН, в частности ЦТК, и систем утилизации НАДН, в первую очередь – дыхательной цепи митохондрий.

Фактически, возрастание соотношения лактат/пируват является не только дополнительным подтверждением нашего предположения о постгипертермической активизации гликолиза, но и косвенно свидетельствует о возрастании интенсивности функционирования ЦТК.

Показанное на рис. 1г снижение выхода глюкозы через 1 час после гипертермии и переход к её поглощению через 6 часов, свидетельствует об истощении к этому времени ресурсов гликогена. Очевидно, что исчерпание внутренних углеводных резервов, к шестому часу восстановительного периода, в случае недостаточности глюкозы в крови, может оказывать крайне неблагоприятное влияние на энергетическое состояние гепатоцитов. В нашем случае, осуществление перфузии проводилось с использованием раствора, содержащего глюкозу в физиологической концентрации. Следовательно, прекращение выхода глюкозы, может говорить о функциональных последствиях изучаемого нами экстремального воздействия. При этом тот факт, что шестой и восемнадцатый часы восстановительного периода характеризуются поглощением печенью глюкозы из перфузионного раствора, может свидетельствовать о возросших к этому времени потребностях органа в энергетических либо пластических ресурсах. Очевидно, что такая потребность связана с необходимостью осуществления адаптационных реакций.

Таким образом, динамика постгипертермического восстановительного периода характеризуется выраженными метаболическими изменениями, происходящими в печени. Эти изменения характеризуются, с одной стороны, наблюдающимся в первые часы восстановительного периода снижением эффективности работы дыхательной цепи митохондрий, и связанной с этим активацией гликолиза и истощением углеводных запасов печени. С другой стороны, в течение восстановительного периода происходит развитие клеточных адаптационных реакций, приводящих, в последствии, к восстановлению уровня утилизации кислорода, что в дальнейшем должно обеспечивать полное восстановление метаболизма и функций печени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Barkman C.A., Almquist L.O., Kirkhorn T., Holmer N.G.* (1999) *Int. J. Hyperthermia*, **15**, 63-76
2. *Roti Roti J.L., Kampinga H.H., Malyapa R.S. et al.* (1998) *Cell Stress Chaperones*, **3**, 245-255
3. *Нефедов В.П.* (1987) В кн. Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза, Новосибирск, Наука, с.4-40.
4. *Альперин В.З., Конник Э.И., Кузьмин А.А.* (1975) Современные электрохимические методы и аппаратура для анализа газов в жидкостях и газовых смесях. - М., Химия.
5. *Girotti S., Bassoli C., Carcione M. et al.* (1989) *J. Biolumin. Chemilumin.*, **3**, 41-45.
6. *Golden S., Katz J.* (1980) *Biochem. J.* **188**, 799-805.
7. *Downs C.A., Jones L.R., Heckathorn S.A.* (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 344-350.
8. *Becker J., Craig E.A.* (1994) *Eur. J. Biochem.*, **219**, 11-23.
9. *DeMaio B., Beck S. C., Buchman T. G.* (1993) *Eur. J. Biochem.*, **218**, 413-420

10. Ovelgönne H., Bitorina M., Van Wijk R. (1995) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **135**, 100-109.
11. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. (1998) Биологическая химия. М., Высш. шк.
12. Kashiwagi A., Nishio Y., Asahina T. et al. (1997) *Diabetes*, **46**, 2088-2094.

Поступила 29.02.2000.

# **THE STUDY OF METABOLIC CHANGES IN RAT LIVER DURING A REDUCTIVE PERIOD AFTER OVERHEATING**

E.V.INZHEVATKIN<sup>1</sup>, A.A.SAVCHENKO<sup>1</sup>, A.I.ALBRANT<sup>1</sup>, V.P.NEFEDOV<sup>2</sup>

\*Krasnoyarsk State University, Svobodnyi prospekt 79, Krasnoyarsk, 770041 Russia;  
tel.: (3912)44082-13, fax: (3912)44-86-25

\*\*International Scientific Centre for Organism Extreme Conditions research (ISCOECR) at  
Presidium of Krasnoyarsk Scientific centre, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia;  
tel.: (3912) 49-57-39; fax: (3912) 43-97-65

The metabolic changes in rat liver were studied during a reduction period after the overheating (25 min, 42°C) using the isolated organ perfusion. First six hours after the treatment were characterised by a decrease of the respiration rate, the activation of glycolysis and an exhaustion of hepatic carbohydrate resources. The development of adaptive reaction resulted in the recovery of respiration rate to 18 h. This may provide subsequent restoration of hepatic metabolism and normalisation of the organ functioning.

**Key words:** overheating, liver, perfusion, metabolism.