

Г.Ш. Гараев¹, Ж.Р. Гафарова², Р.Э. Джафарова¹

Изменения состава белков в крови в период синдрома ишемии-реперфузии, моделированного нарушением кровотока в печени

¹Азербайджанский медицинский университет, Баку

²Азербайджанский государственный институт усовершенствования врачей им. А. Алиева, Баку

Резюме. На экспериментальной модели ишемии-реперфузии печени исследованы количественные изменения состава белков в крови белых беспородных крыс. Установлено, что на фоне 10-минутной ишемии содержание общего белка понизилось на 0,9%, альбуминов – на 1,5% ($p < 0,05$). Содержание глобулинов практически не изменилось, а содержание фибриногена увеличилось на 33,3% ($p < 0,05$). В соответствующие периоды реперфузии, по сравнению с интактными значениями, содержание общего белка и альбуминов снижалось, а глобулинов и фибриногена повышалось. Интенсивность изменений количественного и качественного содержания белков в крови животных зависело как от продолжительности периода ишемии, так и продолжительности реперфузии. При этом повышение уровня глобулинов в крови происходило более интенсивно в период реперфузии после 20-минутной ишемии. Таким образом, на фоне ишемии происходят изменения количественного состава белков плазмы (общего белка, альбуминов, глобулинов, фибриногена). С увеличением продолжительности ишемии патологические изменения увеличиваются. При реперфузии процесс продолжается однонаправленно, но при этом на фоне более глубокой ишемии продолжительностью 20 мин некоторые показатели патологического изменения состава крови менее выражены, чем на фоне реперфузии после 10-минутной ишемии. Этот феномен объясняется активацией защитных и адаптационных функций организма.

Ключевые слова: печень, ишемия, реперфузия, общий белок, альбумины, глобулины, фибриноген.

Введение. Проблема ишемии печени с последующим развитием реперфузионного синдрома (РС) после восстановления кровотока актуальна во всем мире. Реперфузионный синдром печени сопровождается дисфункцией микроциркуляторного русла и оксидативным стрессом, приводящим к некрозу и апоптозу гепатоцитов. Развитие РС печени носит многоступенчатый и мультифакторный характер. Важную роль в его патогенезе играют токсические вещества, поступающие в системный кровоток, что обуславливает общую интоксикацию. Восстановление кровотока не способствует устранению этих изменений, наоборот, ситуация усугубляется повреждающим действием свободных радикалов и цитокинов, поступающих в печень по мере реперфузии. Знание механизмов патофизиологических процессов, сопровождающих РС, может стать почвой для разработки новых, научно обоснованных методик, позволяющих улучшить качество трансплантационных и других обширных операций на печени и снизить риск развития послеоперационных осложнений. Поэтому этой проблеме уделяется большое внимание. Установлена важная роль в развитии РС процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты [5]. В этот период в крови выявляется повышенная концентрация маркеров поражения печени (аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы) и других ферментов, изменяется содержание белков [4]. Установлено,

что повреждение мембран клеток и внутриклеточных органелл приводит к нарушению их проницаемости для воды и ионов, в результате чего развивается прогрессирующий отек и гибель клеток [7, 9].

Особый интерес представляют изменения состава белков крови. Эти изменения достоверно характеризуют состояние метаболической функции печени при РС.

Цель исследования. На экспериментальной модели ишемии-реперфузии печени выявить количественные изменения состава белков в крови животных.

Материалы и методы. Эксперимент поставлен на 66 белых беспородных крысах обоих полов, разделенных на 3 группы. В 1-й группе ($n=6$) животные содержались в интактном состоянии, во 2-й и 3-й группах были животные с моделированной ишемией печени. Так, 2-я группа ($n=30$) – животные с ишемией продолжительностью 10 мин, 3-я группа ($n=30$) – животные с ишемией продолжительностью 20 минут. Животные 2-й и 3-й групп были разделены на 5 подгрупп по 6 животных в каждой. В каждой группе животным в 1-й подгруппе производили реперфузию в течение 60 мин, во 2-й подгруппе – 3 ч, в 3-й подгруппе – 24 ч, в 4-й подгруппе – 72 ч. Остальные 6 животных составляли контрольную группу – это крысы, у которых

создавали модель ишемии соответствующей продолжительности без последующей реперфузии.

По истечении эксперимента животные декапитировались, кровь забиралась для лабораторных исследований. Вне опытов все животные по содержанию и питанию находились в одинаковых условиях. Все эксперименты на животных проводились согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [2].

Ишемию печени моделировали следующим образом. Всем экспериментальным животным внутримышечно вводили 1 мл раствора калипсола. После наступления наркоза по верхней средней линии вскрывалась брюшная полость, в которой хорошо просматривалось поле в области печеночных ворот. После введения в ложе печеночной артерии 2 мл раствора прокаина гидрохлорида вскрывали ложе артерии, отходящей к правой доле печени, и под него проводили лигатуру. Стягиванием лигатуры создавали модель ишемии, а расслаблением – модель реперфузии.

Биохимические исследования проводили на микроанализаторе «Bioskrem MS-2000» (Соединенные Штаты Америки). Определение содержания в крови общего белка, альбуминов, глобулинов, фибриногена проводили с использованием коммерческих наборов фирмы «Нитан», а фибриногена – по общепринятой методике [3]. Исходя из того, что калипсол вводился всем животным как в экспериментальных, так и в контрольных подгруппах, его влияние на изучаемые показатели не учитывались [6, 8].

Статистический анализ полученных результатов проводили непараметрическим методом Вилкоксона – Манна – Уитни [1].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что фоновое содержание общего белка во 2-й группе по сравнению с 1-й группой понизилось на 0,9%, альбуминов – на 1,5%. Содержание глобулинов практически не изменилось, а содержание фибриногена увеличилось на 33,3% (табл. 1).

В период реперфузии продолжительностью 60 мин в 1-й подгруппе по сравнению с интактными значениями содержание общего белка снизилось на 9,7% ($p > 0,05$), во 2-й подгруппе – на 18,5% ($p < 0,05$), в 3-й – на 23,5% ($p < 0,05$), в 4-й – на 26,9% ($p < 0,01$). Содержание альбуминов в 1-й подгруппе снизилось на 15,8% ($p < 0,05$), во 2-й подгруппе – на 23,9% ($p < 0,05$), в 3-й – на 30,5% ($p < 0,05$), в 4-й – на 35,3% ($p < 0,001$). Содержание глобулинов в 1-й подгруппе повысилось на 14% ($p > 0,05$), во 2-й подгруппе – на 27,3% ($p < 0,05$), в 3-й – на 42% ($p < 0,01$), в 4-й – на 46% ($p < 0,01$). Содержание фибриногена в 1-й подгруппе повысилось на 150% ($p < 0,01$), во 2-й подгруппе – на 177,8% ($p < 0,01$), в 3-й – на 250% ($p < 0,01$), в 4-й – на 69,4% ($p < 0,01$).

По сравнению с исходными значениями у животных 2-й группы содержание общего белка в 1-й подгруппе снизилось на 8,9% ($p > 0,05$), во 2-й подгруппе – на 17,8% ($p < 0,05$), в 3-й – на 22,8% ($p < 0,05$), в 4-й – на 26,2% ($p < 0,01$), рисунок 1.

Содержание альбуминов в 1-й подгруппе снизилось на 14,6% ($p > 0,05$), во 2-й подгруппе – на 22,8% ($p < 0,05$), в 3-й подгруппе – на 29,5% ($p < 0,05$), в 4-й подгруппе – на 34,3% ($p < 0,01$). Содержание глобулинов в 1-й подгруппе повысилось на 14% ($p < 0,05$), во 2-й подгруппе – на 27,3% ($p < 0,05$), в 3-й подгруппе – на 42% ($p < 0,01$), в 4-й подгруппе – на 46% ($p < 0,01$). Содержание фибриногена в 1-й подгруппе повыси-

Таблица 1

Содержание исследуемых белков в плазме крови крыс на фоне ишемии с последующей реперфузией, г/л ($M \pm m$)

Показатель	Общ. белок	Альбумины	Глобулины	Фибриноген
1-я группа				
Фон	73,8±2,5	45,3±1,7	25±1,6	3±0,37
2-я группа				
Фон	73,2±2,7	44,7±1,8	25±1,5	4±0,58
1-я подгруппа	66,7±3,3	38,2±2,6*	28,5±1,2	7,5±0,76***
2-я подгруппа	60,2±2,8**	34,5±2,5**	31,8±1,2**	8,33±0,88****
3-я подгруппа	56,5±2,9**	31,5±2,6**	35,5±1,5****	10,5±1,34****
4-я подгруппа	54±2,4****	29,3±2,2****	36,5±1,5****	11,3±1,33****
3-я группа				
Фон	72,5±2,6	44±1,9	25,7±1,4	4,5±0,76
1-я подгруппа	68,7±2,7	40,5±2,5	29,2±1	7,83±0,95***
2-я подгруппа	65±2,6	37,2±2**	32,5±0,8****	11,2±0,79****
3-я подгруппа	62±2,6**	35,2±2**	35,8±1,1****	13,7±0,88****
4-я подгруппа	59,2±2,2****	32,2±1,8****	38,2±1,1****	16±1,06****

Примечание: различия с показателями 1-й группы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; с фоновыми показателями своей группы: ^ – $p < 0,05$; ^^ – $p < 0,01$.

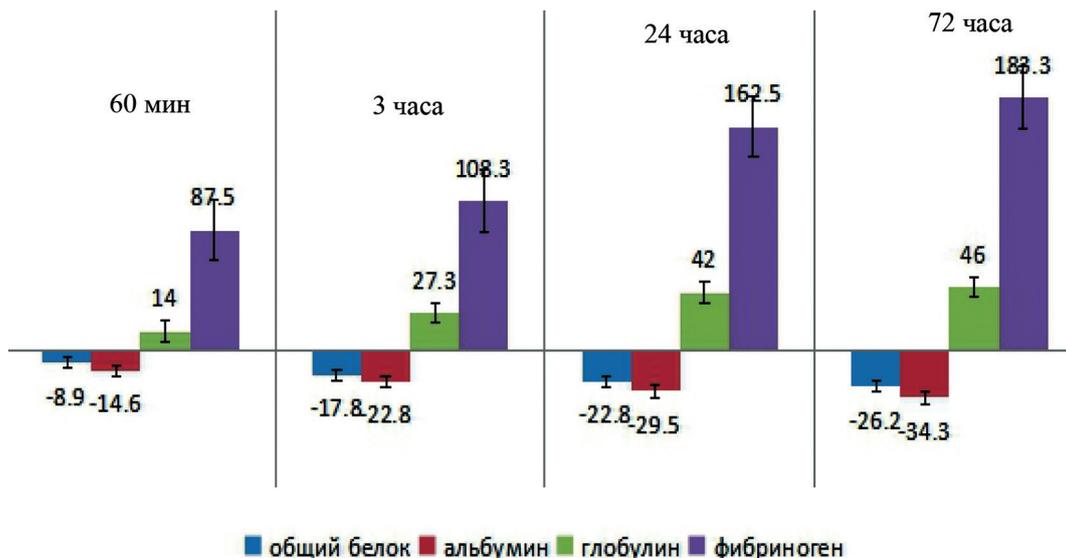


Рис. 1. Снижение содержания белков на фоне реперфузии после 10-минутной ишемии с указанием планки погрешностей со стандартными ошибками по сравнению с фоновыми значениями

лось на 87,5% ($p < 0,01$), во 2-й подгруппе – на 108,3% ($p < 0,01$), в 3-й подгруппе – на 162,5% ($p < 0,01$), в 4-й подгруппе – на 183,3% ($p < 0,01$). Таким образом, пониженное на фоне 10-минутной ишемии содержание общего белка и альбуминов в период реперфузии не восстанавливается, а наоборот, продолжает понижаться, причем с увеличением времени реперфузии их показатели динамично снижаются. Одновременно содержание глобулинов и фибриногена увеличивается во времени.

У животных 3-й группы (см. табл. 1), по сравнению с животными 1-й группы, содержание общего белка снизилось на 1,8% ($p < 0,05$), а альбуминов – на 2,9% ($p < 0,05$). При этом содержание глобулинов увеличилось на 2,7% ($p < 0,05$), а фибриногена – на 50% ($p < 0,05$). На фоне реперфузии в этой группе содержание общего белка в 1-й подгруппе снизилось на 7% ($p < 0,05$), во 2-й подгруппе – на 12% ($p > 0,05$), в 3-й подгруппе – на 16% ($p < 0,05$), в 4-й подгруппе – на 19,9% ($p < 0,01$).

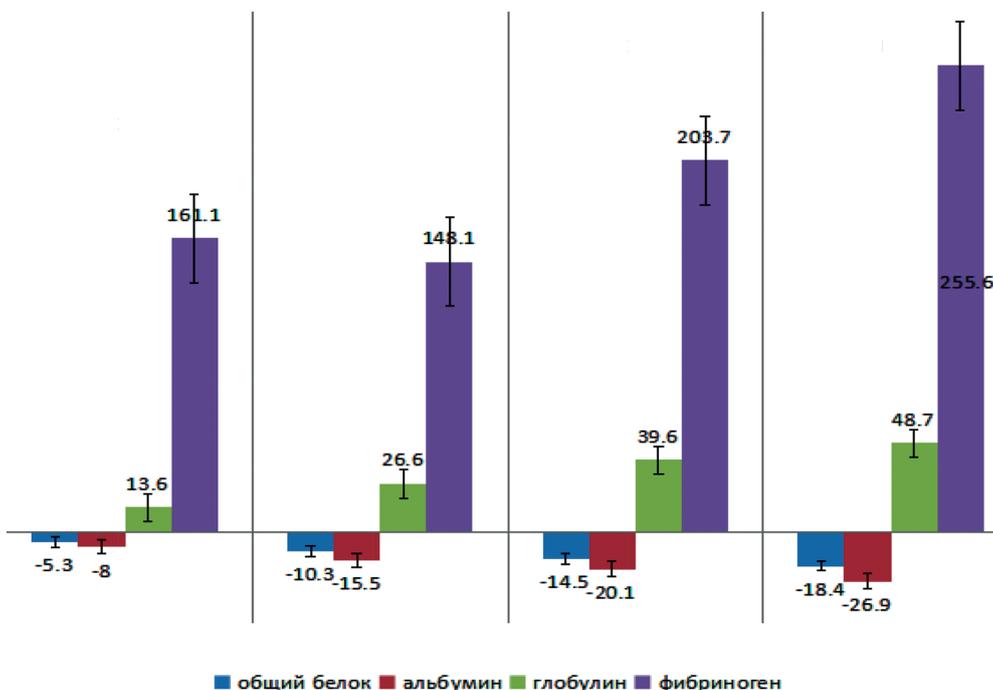


Рис. 2. Снижение содержания белков на фоне реперфузии после ишемии в течение 20 минут по сравнению с фоновыми значениями с указанием планки погрешностей со стандартными ошибками

По сравнению с интактными значениями содержание альбуминов в 1-й подгруппе снизилось на 10,7% ($p < 0,05$), во 2-й подгруппе – на 18% ($p < 0,05$), в 3-й подгруппе – на 22,4% ($p < 0,05$), в 4-й подгруппе – на 29% ($p < 0,01$). Содержание глобулинов в 1-й подгруппе повысилось на 16,7% ($p < 0,05$), во 2-й подгруппе – на 30% ($p < 0,01$), в 3-й подгруппе – на 43,3% ($p < 0,01$), в 4-й подгруппе – на 52,7% ($p < 0,01$). Содержание фибриногена в 1-й подгруппе повысилось на 161,1% ($p < 0,01$), во 2-й подгруппе – на 272,2% ($p < 0,01$), в 3-й подгруппе – на 355,6% ($p < 0,01$), в 4-й подгруппе – на 433,3% ($p < 0,01$).

По сравнению с исходными значениями содержание общего белка в 1-й подгруппе снизилось на 5,3% ($p > 0,05$), во 2-й подгруппе – на 10,3% ($p < 0,05$), в 3-й подгруппе – на 14,5% ($p < 0,05$), в 4-й подгруппе – на 18,4% ($p < 0,01$), рисунок 2.

Содержание альбуминов в 1-й подгруппе снизилось на 8% ($p > 0,05$), во 2-й подгруппе – на 15,5% ($p < 0,05$), в 3-й подгруппе – на 20,1% ($p < 0,05$), в 4-й подгруппе – на 26,9% ($p < 0,01$). Содержание глобулинов в 1-й подгруппе повысилось на 13,6% ($p > 0,05$), во 2-й подгруппе – на 26,6% ($p < 0,01$), в 3-й подгруппе – на 39,6% ($p < 0,01$), в 4-й подгруппе – на 48,7% ($p < 0,01$). Содержание фибриногена в 1-й подгруппе повысилось на 161,1% ($p < 0,01$), во 2-й подгруппе – на 148,1% ($p < 0,01$), в 3-й подгруппе – на 203,7% ($p < 0,01$), в 4-й подгруппе – на 255,6% ($p < 0,01$). Следовательно, пониженное на фоне 20-минутной ишемии содержание общего белка и альбуминов в период реперфузии не восстанавливается, а наоборот, продолжает понижаться, причём с увеличением времени реперфузии их показатели динамично снижаются. Одновременно содержание глобулинов и фибриногена увеличивается во времени.

Анализ полученных данных показал, что незначительное в процентном отношении, но очень важное для жизнедеятельности организма снижение содержания общего белка происходит в период 10- и 20-минутной ишемии на 0,9 и 1,8% соответственно. В период реперфузии функциональные возможности гепатоцитов не восстанавливаются, а наоборот, их деструкция усугубляется наличием в крови токсических веществ, которые накопились в крови за период отключения печени от общей системы жизнеобеспечения организма. Поэтому понижение содержания общего белка идет усиленными темпами: к 72 ч реперфузии дефицит белков в крови уже составлял во 2-й группе 26,9%, а в 3-й группе – 19,9%. Однако, как видно из полученных данных, в 3-й группе, где находились животные с моделированной 20-минутной ишемией печени на фоне реперфузии продолжительностью 72 ч, дефицит белков был на 7% ниже по сравнению со 2-й группой, где находились животные с моделированной 10-минутной ишемией печени на фоне 72-часовой реперфузии.

Как и следовало ожидать, на фоне общей интоксикации и воспалительного процесса, сопро-

вождающих ишемию печени [10, 11], понижается содержание альбуминовой фракции и повышается содержание глобулиновой фракции. Снижение уровня альбуминов в крови наблюдается уже в период 10-минутной ишемии, но в этот период не наблюдается изменения в содержании глобулинов. Это означает, что защитные механизмы, где фракция глобулинов играет ключевую роль, еще не активировались. Увеличение времени ишемии до 20 мин приводит к значительному снижению уровня альбуминов, но уровень глобулинов при этом начинает повышаться. Значит, организм включает защитные механизмы. Процесс односторонне продолжается и в период реперфузии: в обеих группах во всех подгруппах уровень альбуминов понижается, а уровень глобулинов повышается, причем это повышение более значительно в подгруппах 3-й группы, где находились животные, у которых моделировали 20-минутную ишемию.

Уровень фибриногена увеличивается во все периоды ишемии и реперфузии, причем в 3-й группе более интенсивно, чем во 2-й группе.

Заключение. Показано, что на фоне ишемии в плазме крови экспериментальных животных происходит изменение количественного содержания общего белка, альбуминов, глобулинов и фибриногена. С увеличением продолжительности ишемии патологические изменения увеличиваются. При реперфузии процесс продолжается односторонне, но при этом на фоне более глубокой 20-минутной ишемии некоторые показатели патологического изменения состава крови менее выражены, чем на фоне реперфузии после 10-минутной ишемии. Этот феномен объясняется активацией защитных и адаптационных функций организма.

Литература

1. Гублер, Е.В. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. – М.: Медицина, 1969. – 28 с.
2. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. – Страсбург, 1986. – 13 с.
3. Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. проф. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1989. – С. 168–169; 174–176.
4. Eipel, C. Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited / C. Eipel, K. Abshagen, B. Vollmar // World journal of gastroenterology. – 2010. – Vol. 16, № 48. – P. 6046–6057.
5. Fondevila, C. The membrane attack complex (C5b-9) in liver cold ischemia and reperfusion injury / C. Fondevila [et al.] // Liver transplantation. – 2008. – Vol. 14, № 8. – P. 1133–1114.
6. Hirota, K. Opical ketamine inhibits albumin extravasation in chemical peritonitis in rats / K. Hirota [et al.] // Acta Anaesthesiol. Scand. – 1995. – Vol. 39 (2). – P. 174–178.
7. Li, B. Cell apoptosis and fas gene expression in liver and renal tissues after ischemia-reperfusion injury in liver transplantation / B. Li [et al.] // Transplantation proceedings. – 2010. – Vol. 42, № 5. – P. 1550–1556.

8. Liao, S. Inflammation-induced lymphangiogenesis and lymphatic dysfunction / S. Liao, P.Y. von derWeid // *Angiogenesis*. – 2014. – Vol. 17 (2). – P. 325–334.
9. Manzini, G. Reperfusion of liver graft during transplantation: techniques used in transplant centres within Eurotransplant and meta-analysis of the literature / G. Manzini [et al.] // *Transpl. Int.* – 2013. – Vol. 26 (5). – P. 508–516.
10. Song, A.T. Liver transplantation: Fifty years of experience / A.T. Song [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20 (18). – P. 5363–5374.
11. Szijártó, A. Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia–reperfusion model: Effects on microcirculation and antioxidant status in rats / A. Szijártó [et al.] // *Clinical Nutrition*. – 2007. – Vol. 26. – Issue 5. – P. 640–648.

G.Sh. Garayev, J.R. Gafarova, R.E. Jafarova

Changes in the composition of proteins in the blood during the period of ischemia-reperfusion syndrome, modeled by a violation of blood flow in the liver

Abstract. *On the experimental model of liver ischemia-reperfusion, quantitative changes in protein composition in the blood of white outbred rats were investigated. It was found that against the background of a 10-minute ischemia, the total protein content decreased by 0,9%, albumins by 1,5% ($p<0,05$). The content of globulins practically did not change, and the content of fibrinogen increased by 33,3% ($p<0,05$). In the corresponding periods of reperfusion compared with intact values, the content of total protein and albumins decreased, and globulins and fibrinogen increased. The intensity of changes in the quantitative and qualitative content of proteins in the blood of animals depended on both the duration of the ischemia period and the duration of reperfusion. At the same time, the increase in the level of globulins in the blood occurred more intensively during reperfusion after 20 minutes of ischemia. Thus, against the background of ischemia, there are changes in the quantitative composition of plasma proteins (total protein, albumins, globulins, fibrinogen). As the duration of ischemia increases, pathological changes increase. With reperfusion, the process continues unidirectionally, but against the background of a deeper ischemia lasting 20 minutes, some parameters of the pathological changes in the blood composition are less pronounced than against a background of reperfusion after a 10-minute ischemia. This phenomenon is explained by the activation of the protective and adaptive functions of the body.*

Key words: liver, ischemia, reperfusion, whole protein, albumin, globulin, antithrombin

Контактный телефон: +994-505-516-832; e-mail: rjafarova@bk.ru