

ВЛИЯНИЕ ПАРАНЕФРАЛЬНОЙ БЛОКАДЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПОЛ В ПОЧКАХ КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Кит О.И.¹, Франциянц Е.М.¹, Димитриади С.Н.¹, Каплиева И.В.¹, Трепитаки Л.К.¹, Черярина Н.Д.¹, Ткаля Л.Д.¹

¹ ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия (344037, Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63), e-mail: super.gormon@yandex.ru

Исследовано влияние новокаиновой паранефральной блокады на уровень образования продуктов перекисного окисления липидов. В гомогенатах тканей коркового слоя правой (ишемизированной) и левой (контралатеральной) почек белых беспородных крыс разного возраста и пола были изучены уровни содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. Для определения эффективности образования вторичных продуктов ПОЛ был рассчитан коэффициент ДК/МДА. Определение проводили в динамике восстановления кровотока (1 ч, 3 ч и 48 ч) и после проведения паранефральной блокады (1 ч и 48 ч). Выявлено, что наиболее устойчивыми к патологическому действию ишемии-реперфузии оказались молодые самки и старые самцы. Предварительное проведение новокаиновой блокады приводило к стойкому одинаковому повышению уровня ДК и снижению уровня МДА в обеих почках в динамике восстановления кровотока, нормализации коэффициента ДК/МДА в корковом веществе левой контралатеральной почки обеих групп животных во все исследуемые сроки и увеличению показателя относительно значений у животных без блокады в правой ишемизированной почке.

Ключевые слова: паранефральная блокада, МДА, ДК

EFFECT OF PARANEPHRIC BLOCK ON INTENSITY OF ACCUMULATION OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS IN RAT KIDNEYS AFTER ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

Kit O.I.¹, Frantsiyants E.M.¹, Dimitriadi S.N.¹, Kaplieva I.V.¹, Trepitaki L.K.¹, Cheryarina N.D.¹, Tkalya L.D.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia (344037, Rostov-on-Don, 14 Line, 63), e-mail: super.gormon@yandex.ru

Effect of procaine paranephric block on formation of lipid peroxidation products was studied. Levels of content of malondialdehyde (MDA) and diene conjugates (DC) were studied in tissue homogenates of cortical layer of the right (ischemic) and left (contralateral) kidneys of white outbred rats of different age and sex. DC/MDA coefficient was calculated to determine effectiveness of formation of secondary products of lipid peroxidation. Determination was performed in dynamics of restoration of blood flow (1 hour, 3 h and 48 h) and after paranephric block (1 h and 48 h). Young females and older males were found to be the most resistant to pathological effects of ischemia-reperfusion injury. Prior procaine block resulted in persistent equal increase in DC level and decrease in MDA level in both kidneys in dynamics of restoration of blood flow, led to normalization of DC/MDA coefficient in cortex of the left contralateral kidney in both groups of animals during all the studied periods and increase in the index in animals without the block in the right ischemic kidney.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, paranephric block, malondialdehyde, diene conjugates

Среди механизмов, приводящих к повреждению биологических мембран клеток, дезинтеграции различных биосистем в условиях гипоксии, выделяют прежде всего активацию свободнорадикального окисления липидов [1, 10]. В настоящее время доказана ведущая роль интенсификации свободнорадикальных процессов (СРП) в патогенезе гипоксических состояний. Убедительно доказана роль активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и при развитии ишемических и реперфузионных повреждений

органов и тканей. Тяжесть течения многих заболеваний и их исход в конечном итоге определяются особенностями вторичных неспецифических метаболических расстройств, степенью дестабилизации клеточных мембран, а также возможностями реактивации структурных и ферментных белков в условиях гипоксии.

Традиционными объектами изучения процессов липопероксидации при различных формах нарушения кровообращения были и остаются сердце и головной мозг. Вместе с тем имеются органы и ткани, в частности почки, которые не менее уязвимы для повреждающих факторов ишемии и реперфузии [8], а нарушение их функций лежит в основе вторичных нарушений кровообращения, водно-солевого обмена и интоксикации организма [7]. Увеличение образования продуктов липопероксидации, а также уменьшение активности антиоксидантных систем в почках установлено в экспериментах с использованием различных моделей гипоксии-реоксигенации, ишемии-реперфузии [3]. Состояние системы свободнорадикального окисления (СРО) является универсальным неспецифическим критерием патологических процессов и представляет собой процесс непосредственного переноса кислорода на субстрат с образованием перекисей, кетонов, альдегидов, причем характерной чертой является его цепной самоиндуцирующийся характер [9].

Механизмы, определяющие особенности липопероксидации при ишемическом повреждении почек, вызванном остановкой системного кровообращения, и реперфузии, требуют дальнейшего изучения.

Целью настоящего раздела работы явилось изучение влияния новокаиновой паранефральной блокады на уровень образования продуктов ПОЛ в корковом веществе почек крыс разного возраста и пола в динамике острой ишемии-реперфузии.

Материалы и методы

В работе использованы 60 белых беспородных крыс обоего пола массой 200–250 г (молодые животные) и 300–350 г (старые животные). Исследование проводилось на модели «две почки, один зажим». Наркотизированные животные размещались в положении «на спине». Шерсть на животе удаляли, операционное поле обрабатывали 70°-ным этиловым спиртом. Разрез проводили вдоль белой линии живота от мечевидного отростка грудины до лобка, рассекали кожу и соединительную ткань. Выделяли сосудистую ножку правой почки, которую затем клипировали зажимом Холстеда на 20 мин. Рану на протяжении периода ишемии прикрывали салфеткой, смоченной стерильным физраствором. Через 20 мин зажим с почечной ножки снимали, тем самым восстанавливали кровоснабжение ишемизированной почки (реперфузия), операционную рану ушивали послойно. Через определенные промежутки времени от момента реперфузии (1 ч, 3 ч, 48 ч) крыс умерщвляли декапитацией на гильотине. Для исследования забирали правую (ишемизированную) и контралатеральную

почки, выделяли корковый слой; 100 мг ткани промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), гомогенизировали в 1 мл 1x PBS и оставляли на ночь при -20°C . Для полного разрушения клеточных мембран проводили два цикла замораживания-оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при 5000 g ($2-8^{\circ}\text{C}$). Супернатант отбирали, делили на аликвоты и хранили при -20°C или -80°C . Перед измерением размороженные образцы центрифугировали.

Блокаду паранефральной клетчатки осуществляли путем введения 0,1 мл 2%-ного раствора новокаина непосредственно перед проведением процедуры ишемии и повторно перед реперфузией. В гомогенатах тканей коркового слоя левой и правой почек были изучены уровни содержания малонового диальдегида [4] и диеновых конъюгатов [2].

Статистическая обработка материала проводилась с помощью программы Statistica 6,0 с определением средних значений с указанием стандартных отклонений. Значимость различий средних показателей оценивалась с помощью критерия суммы рангов Вилкоксона. Существенными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Первичными продуктами ПОЛ являются диеновые конъюгаты, которые относятся к токсическим метаболитам, оказывающим повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты [6]. В исследовании Симион А.Ю. и соавт. [5] показана интенсификация перекисного окисления липидов при ишемическом повреждении тканей печени, сердца и головного мозга, что может быть причиной дезинтеграции биологических мембран в условиях гипоксии. А наиболее высокий уровень первичных продуктов ПОЛ, который был выявлен в кардиомиоцитах, по мнению авторов, свидетельствует о высокой чувствительности ткани сердечной мышцы к гипоксии.

В нашем исследовании при ишемии-реперфузии почки в зависимости от пола и возраста лабораторных животных не получено подтверждения этому постулату. Напротив, в корковом веществе правой и левой почек интактных молодых самок и старых самцов, оказавшихся самыми устойчивыми к повреждающему действию указанных факторов, уровень диеновых конъюгатов (ДК) оказался в 2 и более раз выше, чем в аналогичных тканях старых самок и молодых самцов как наиболее чувствительных к патологическому действию ишемии-реперфузии (табл. 1).

Таблица 1

Влияние новокаиновой блокады на содержание диеновых конъюгатов (мкМ/г тк) в корковом веществе почки, подвергнутой ишемии-реперфузии, и контралатеральной почки крыс разного пола и возраста

Группы крыс	Старые самки	Молодые самки	Старые самцы	Молодые самцы
-------------	--------------	---------------	--------------	---------------

почка	правая	левая	правая	левая	правая	левая	правая	левая
интактн	7,9± 0,6	5,5± 0,4	15,8± 1,3	14,6± 1,1	14,1± 0,8	12,3± 1,3	6,2± 0,7	6,6± 0,6
1 ч	12,7± 1,1 ¹	3,2± 0,3 ¹	3,3± 0,4 ¹	5,9± 0,6 ¹	7,2± 0,8 ¹	7,3± 0,6 ¹	9,2± 0,7 ¹	2,2± 0,3 ¹
1 ч + блокада	22,5± 1,3 ^{1,2}	22,2± 1,8 ^{1,2}	-	-	22,5± 1,6 ^{1,2}	21,0± 1,4 ^{1,2}	-	-
3 ч	5,5± 0,5 ¹	7,9± 0,8 ¹	3,2± 0,5 ¹	5,7± 0,6 ¹	7,8± 0,9 ¹	7,6± 0,8 ¹	16,9± 1,5 ¹	9,1± 0,7 ¹
48 ч	5,7± 0,6 ¹	14,2± 1,1 ¹	3,8± 0,4 ¹	5,4± 0,4 ¹	7,4± 0,7 ¹	7,7± 0,5 ¹	5,7± 0,6	14,1± 1,2 ¹
48 ч + блокада	19,3± 1,7 ^{1,2}	18,8± 1,6 ^{1,2}	-	-	21,8± 1,9 ^{1,2}	21,0± 1,3 ^{1,2}	-	-

Примечание: ¹ — достоверно по отношению к показателю в интактной ткани;
² – достоверно по отношению к показателю без блокады

В динамике восстановления кровотока содержание первичных продуктов ПОЛ в корковом веществе почки, подвергнутой процедуре ишемии-реперфузии, и контралатеральной почки было специфическим. Так, у молодых самок и старых самцов в сроки 1 ч, 3 ч и 48 ч после восстановления кровотока уровень ДК снизился: в корковом веществе правой почки у самок – в среднем в 4,6 раза, у самцов – в 1,9 раза; левой почки у самок – в среднем в 2,6 раза, у самцов – в 1,6 раза.

Иная динамика отмечена в корковом веществе почек старых самок и молодых самцов. Через 1 ч после восстановления кровотока в корковом веществе правой и левой почек найдены разнонаправленные изменения содержания ДК: в правой – увеличение в 1,6 раза и 1,5 раза у самок и самцов соответственно; в левой – падение в 1,7 раза и 3 раза соответственно. Через 3 ч и 48 ч после восстановления кровотока снова отмечены разнонаправленные колебания уровня ДК в правой и в левой контралатеральной почках старых самок и молодых самцов (табл. 1).

Активация процессов ПОЛ формирует цепи окисления с участием первичных (диеновые конъюгаты), промежуточных и конечных продуктов перекисидации. Эти приводит к изменению проницаемости плазматических мембран, активности ферментов, изменяются свойства мембранных белков. По выраженности процессов ПОЛ можно судить о степени повреждения клеток.

Колебания уровня первичных продуктов ПОЛ сопровождалось стойким накоплением одного из конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) в динамике восстановления кровотока в органах всех групп животных. Вместе с тем в срок 48 ч после реперфузии уровень МДА в корковом веществе почки, подвергнутой ишемии-реперфузии, и контралатеральной почки молодых самок и старых самцов был значимо ниже, чем в органах старых самок и молодых самцов (табл. 2).

Таблица 2

Влияние новокаиновой блокады на содержание малонового диальдегида (нМ/г тк) в корковом веществе почки, подвергнутой ишемии-реперфузии, и контралатеральной почки крыс разного пола и возраста

Группы крыс	Старые самки		Молодые самки		Старые самцы		Молодые самцы	
	правая	левая	правая	левая	правая	левая	правая	левая
почка								
интактн	6,2± 0,7	10,1± 0,9	11,9± 1,3	10,0± 0,8	11,0± 1,2	10,6± 1,1	9,0± 0,7	10,9± 1,1
1 ч	57,7± 5,3 ¹	35,2± 4,1 ¹	18,0± 1,6 ¹	32,4± 2,4 ¹	39,9± 3,7 ¹	49,7± 5,0 ¹	17,1± 1,6 ¹	26,7± 2,2 ¹
1 ч + блокада	34,1± 3,1 ^{1,2}	21,3± 1,8 ^{1,2}	-	-	23,2± 1,6 ^{1,2}	19,7± 1,4 ^{1,2}	-	-
3 ч	48,2± 4,3 ¹	48,2± 4,7 ¹	35,2± 3,1 ¹	29,1± 2,7 ¹	57,1± 5,4 ¹	50,2± 4,6 ¹	58,7± 6,2 ¹	30,2± 2,9 ¹
48 ч	47,1± 5,2 ¹	48,3± 4,6 ¹	32,2± 2,9 ¹	36,2± 3,4 ¹	31,9± 3,3 ¹	37,5± 3,8 ¹	50,4± 4,6 ¹	46,0± 4,3 ¹
48 ч + блокада	33,0± 3,1 ^{1,2}	36,6± 3,5 ^{1,2}	-	-	23,6± 2,5 ^{1,2}	19,4± 1,7 ^{1,2}	-	-

Примечание: ¹ — достоверно по отношению к показателю в интактной ткани;
² – достоверно по отношению к показателю без блокады.

Далее мы изучили влияние новокаиновой паранефральной блокады почки на образование первичных и одного из вторичных продуктов ПОЛ — МДА в корковом веществе почки, подвергнутой ишемии-реперфузии, и контралатеральной почки старых самок (неустойчивые) и старых самцов (устойчивые). Результаты отражены в таблицах 1 и 2. Оказалось, что проведение новокаиновой блокады приводило к стойкому одинаковому повышению уровня ДК в обеих почках в динамике восстановления кровотока. Так, через 1 ч содержание первичного продукта ПОЛ в корковом веществе почек животных обеих групп составило в среднем 22,1 мкМ/г тк, через 48 ч — 20,2 мкМ/г тк. Показатели не имели достоверных различий ни между животными разного пола, ни между опытной и контралатеральной почками, ни по времени восстановления кровотока.

Проведение новокаиновой блокады приводило к снижению уровня МДА. Так, через 1 ч в корковом веществе старых самок снижение составило в среднем 1,7 раза в правой и левой почках относительно показателей без блокады. В этот срок исследования в корковом веществе почек самцов снижение уровня МДА составило 1,7 раза и 2,5 раза соответственно в правой и контралатеральной левой почке.

Через 48 ч от момента восстановления кровотока в корковом веществе почек старых самок уровень МДА снизился в среднем в 1,4 раза относительно аналогичного срока без блокады. Для самцов такое снижение составило 1,4 раза и 1,9 раза в правой и левой почках соответственно.

Очевидно, что проведение новокаиновой блокады структур, иннервирующих почки животных, вызывало повышение уровня первичных продуктов ПОЛ при одновременном снижении вторичных продуктов.

Учитывая такие колебания уровня ДК и МДА в корковом веществе почек между группами животных, устойчивых и неустойчивых к воздействию ишемии-реперфузии, мы сочли целесообразным рассчитать эффективность образования вторичных продуктов ПОЛ по коэффициенту ДК/МДА (табл. 3).

Таблица 3

Влияние новокаиновой блокады на эффективность образования вторичных продуктов ПОЛ (ДК/МДА) в корковом веществе почки, подвергнутой ишемии-реперфузии, и контралатеральной почки крыс разного пола

Группы крыс	Старые самки		Старые самцы	
	правая	левая	правая	левая
интактн	1274,2±132,8	544,6±53,1	1281,8±116,5	1160,4±120,4
1 ч	220,1±18,3 ¹	90,9±8,4 ¹	180,5±16,9 ¹	167,0±14,2 ¹
1 ч + блокада	659,8±53,3 ^{1,2}	606,6±48,9 ²	969,8±85,3 ^{1,2}	1066,0±94,6 ²
48 ч	121,0±9,4 ¹	243,6±23,1 ¹	231,9±18,4 ¹	205,3±18,6 ¹
48 ч + блокада	584,8±53,6 ^{1,2}	513,7±46,1 ²	923,7±94,5 ^{1,2}	1185,6±87,5 ²

Примечание: ¹ — достоверно по отношению к показателю в интактной ткани;
² – достоверно по отношению к показателю без блокады.

Установлено, что в динамике ишемии-реперфузии повышалась интенсивность перехода первичных продуктов ПОЛ во вторичные продукты, в данном случае – МДА. Так, через 1 ч после восстановления кровотока в корковом веществе правой ишемизированной почки показатель ДК/МДА снижался у старых самок в 5,8 раза, а у старых самцов – в 7,1 раза. В корковом веществе левой почки снижение составило 6 раз и 7 раз соответственно относительно показателя у интактных животных соответствующего пола и возраста. Через 48 ч в корковом веществе правой ишемизированной почки показатель ДК/МДА снижался у старых самок в 1,8 раза относительно предыдущего срока исследования и в 10,5 раз относительно показателя у интактных животных соответствующего пола и возраста, а в левой контралатеральной почке показатель, напротив, увеличился в 2,7 раза, но оставался в 2,2 раза ниже контрольных величин. В корковом веществе правой почки старых самцов в этот срок исследования коэффициент ДК/МДА увеличивался в 1,3 раза относительно предыдущего срока исследования, но оставался в 5,5 раза ниже относительно показателя у интактных животных соответствующего пола и возраста.

Предварительное проведение новокаиновой блокады паранефральной клетчатки проводило к нормализации коэффициента ДК/МДА в корковом веществе левой контралатеральной почки обеих групп животных во все исследуемые сроки. В правой почке старых самок новокаиновая блокада вызывала увеличение показателя относительно значений у животных без блокады: через 1 ч после восстановления кровотока – в 3 раза, через 48 ч – в 4,8 раза, но оно оставалось ниже показателя у интактных животных в 2,2 раза. В правой почке старых самцов новокаиновая блокада вызывала увеличение показателя относительно значений у животных без блокады: через 1 ч после восстановления кровотока – в 5,4 раза, через 48 ч – в 4 раза, оставаясь при этом ниже показателя у интактных животных лишь в 1,4 раза.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что, с одной стороны, в исследовании подтвержден факт влияния ишемии-реперфузии на накопление продуктов свободнорадикального окисления, с другой — не совсем понятно синхронное изменение содержания ДК и МДА в контралатеральной почке. Нет ясности в том, отражает ли это изменение активацию ПОЛ в ткани почки, как подвергнутой ишемии-реперфузии, так и контралатеральной, либо другой конкретный ферментативный, генетически обусловленный процесс синтеза эйкозаноидов — большого семейства высокоактивных соединений, обладающих необычайно широким спектром биологических эффектов. Арахидоновая кислота является наиболее широко распространенным и, вероятно, самым важным предшественником эйкозаноидов. Известно, что образующиеся в процессе ее окисления гидроперекиси и циклические перекиси не могут накапливаться в организме, они разлагаются до жирных альдегидов, например малонового. Арахидоновая кислота образует 3 молекулы малонового диальдегида. Продукты расщепления кислоты подвергаются дальнейшему окислению с образованием малоновой кислоты, простагландинов, в дальнейшем из ПГН₂ в отдельных метаболических путях образуются другие простагландины, тромбоксан и простациклин.

Нормализация эффективности образования МДА в обеих почках, т.е. подвергнутой ишемии-реперфузии и контралатеральной, под действием блокады паранефральной клетчатки новокаином, не обладающим антиоксидантными свойствами, также не совсем понятна и требует дальнейших исследований.

Список литературы

1. Бизенкова М.Н. Общие закономерности метаболических расстройств при гипоксии различного генеза и патогенетическое обоснование принципов их медикаментозной коррекции: диссертация ... кандидата медицинских наук, Саратов, 2008.

2. Казимирко В.К., Иваницкая Л.Н., Крутовой В.В., Дубкова А.Г., Силантьева Т.С. Перекисное окисление липидов противоречие, проблемы // Украинский ревматологический журнал, 2014. — № 3 (57). — С. 13–17.
3. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов // Вопросы мед. химии. 1984. № 4. С. 125–127.
4. Макаренко В.С., Жизневская Н.Г., Колтыгина Т.Н. и др. Интенсивность перекисного окисления липидов в почках при нефротоксической острой почечной недостаточности // Урология. 2000. — № 1. — С. 26–29.
5. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М.: Медицина. 1977. С. 392.
6. Симион А.Ю. Макеева А.В., Лидохова О.В. Сравнительная оценка образования первичных продуктов ПОЛ при ишемическом повреждении различных тканей // <http://www.scienceforum.ru/2015/895/7820>
7. Тарасов Н.И., Тепляков А. Т., Малахович Е.В. и др. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения // Тер.архив. 2002. № 12. С. 12–15.
8. Ahmadiasi N., Banaei S., Alihemmati A. Combination Antioxidant Effect of Erythropoietin and Melatonin on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats // Iran J. Basic Med. Sci. – 2013. – Vol. 16, № 12. – P. 1209–1216.
9. Hueper K., Gutberlet M., Rong S., Hartung D., Mengel M., Lu X., Haller H., Wacker F., Meier M., Gueler F. Acute kidney injury: arterial spin labeling to monitor renal perfusion impairment in mice-comparison with histopathologic results and renal function // Radiology. – 2014. – Vol. 270, № 1. – P. 117–24.
10. Pavlick K.P., Laroux F.S., Fuseler. et.al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease// Free Radical Biol. Med., 2002 . — Vol. 33. № 3. — P. 311–322.
11. Stadtman E.R., Levine R.L. Chemical modification of proteins by reactive oxygen species. In: Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield D.A., eds). Redox Proteomics - From Protein Modifications to Cellular Dysfunctions and Diseases. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, 2006. — P. 3–23.

Рецензенты:

Геворкян Ю.А., д.м.н., профессор, отделения «ОАО-2» ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;
Ушакова Н.Д., д.м.н., профессор, врач анестезиолог-реаниматолог ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.