

ВИВЧЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ГІДРОКОРТИЗОНУ МЕТОДОМ ПЕРФУЗІЇ ПЕЧІНКИ СОБАК

М. Д. Тронько, Є. М. Горбань

Лабораторія патологічної фізіології і нейрогормональної регуляції кровообігу Київського інституту ендокринології та обміну речовин

Одним з найважливіших питань сучасної ендокринології є вивчення обміну стероїдних гормонів. Особливо це набуває певного значення при деяких ендокринних захворюваннях, коли спостерігається порушення їх метаболізму. При вивченні обміну гормонів найбільш поширений метод інкубації гормонів із зрізами, гомогенатами і різними субклітинними фракціями печінки та інших органів [5]. Проте, в цих умовах можна вивчати лише метаболізм без урахування функціонального стану органа.

Ми досліджували обмін гідрокортизону з допомогою перфузії печінки собак *in situ*. Використовуючи даний метод, можна створити умови, які дозволяють вивчати обмін гормонів в умовах більш близьких до фізіологічних.

Методика досліджень

У п'яти безпородних собак-самців, вагою від 20 до 30 кг, проводили перфузію печінки *in situ* розчином Тироде із збільшеним вмістом бікарбонату і 1,2% розчином поліглюкіну. Під тіопенталовим наркозом собаку фіксували на операційному столі. Черевну порожнину розтинали комбінованим розрізом: спочатку серединним розрізом по білій лінії від мечовидного відростка до лобкового зчленування, а потім — латеральними вправо і вліво по краю реберних дуг.

В печінково-дванадцятипалій зв'язці виділяли і перев'язували шовковими лігатурами спільну печінкову протоку, портальну вену після впадіння в неї пупкових вен і вінцеві вени шлунка, а також накладали лігатуру на судини жовчного міхура разом із жовчною протокою. Заздалегідь, перед перев'язкою, з метою запобігання зсідання крові у судинах печінки внутрішньо вводили гепарин з розрахунку 250—300 од/кг.

Далі приступали до першого етапу створення мішка з каудальної вени для збирання перфузату. З цієї метою в каудальну вену вводили поліхлорвініловий катетер і просовували його в краніальному напрямку до рівня пересічення каудальної вени з діафрагмою і перев'язували лігатурою вену на катетері нижче місця входження в неї печінкових вен. Після цього вводили канюлю у власну артерію печінки безпосередньо перед поділом на внутрішні печінкові гілки і починали пропускати через неї перфузійний розчин для підтримання функціонування печінки під час проведення другого етапу створення мішка з каудальної вени. На відміну від інших авторів [1, 3, 4], застосований нами методичний підхід забезпечує постійне кровопостачання печінки до моменту початку перфузії.

Після цього серединним розрізом по передній поверхні грудної клітки розділяли м'які тканини до груднини. Шкірно-м'язові клапти з обох боків відокремлювали від ребер трохи далі місця з'єднання кісткової та хрящової частин. Реберним ножом розізували хрящі, починаючи з другого, відступивши від місця з'єднання їх з кістковими дугами приблизно на 0,5—1,0 см. Потім грудину разом з нижніми хрящами піднімали, відокремлювали від діафрагми і підлягаючих м'яких тканин і повністю видаляли.

Далі приступали до завершення створення мішка з каудальної вени шляхом перев'язки її вище місця впадіння з неї печінкових вен. Заключним етапом виділяли і перев'язували верхні і нижні діафрагмальні вени, які впадали в каудальну вену в ділянці мішка і висхідних поперекових вен, які мають з ними анастомотичні зв'язки. Тривалість операції від моменту розтину черевної порожнини до початку збору перфузату становила близько 60 хв.

Перед початком і на протязі усього часу перфузії розчин Тироде насичували газовою сумішшю (95% O_2 і 5% CO_2); при цьому вихідна величина рН розчину, яка становила 7,8, знижувалася до 7,3—7,4. Ця величина рН зберігалася на протязі усього часу перфузії.

За допомогою водяної бані на протязі усього досліді температуру перфузійного розчину підтримували в межах 38° С. Умовами проведення досліді забезпечувалась також стабілізація температури перфузованого органа.

На протязі перших 15—25 хв перфузії після створення мішка з каудальної вени відмивали печінку від крові, після цього збирали перфузат порціями по 150 мл. Починали перфузію розчином, який не містив гідрокортизону, а потім продовжували її розчином з гідрокортизоном. Останній в дозі 100 мкг додавали у розчині етанолу, об'єм якого не перевищував 0,1—0,25 мл на 1 л перфузійного розчину Тироде і не впливав на інтенсивність обміну гідрокортизону. Швидкість перфузії у розрахунку на 100 г печінки підтримувалася в межах 1,2—1,5 мл/хв. Тривалість перфузії у середньому становила 5—6 год. Загальна схема перфузії представлена на рис. 1.

Екстракцію та очистку перфузату проводили за методом Купфера [9]. Заздалегідь проводили гідроліз перфузату бета-глюкоронідазою. Для вивчення якісної сторони обміну гідрокортизону ми використали метод тонкошарової хроматографії на пластинках «Силуфол». Екстракт хроматографували в двох системах: I система — хлороформ : етанол (95 : 5), II система — ефір : бензол : ацетон (50 : 30 : 20). З метою ідентифікації окремих метаболітів гідрокортизону порівнювали рухливість цих сполук з рухливістю відповідних стандартів у різних хроматографічних системах, а також проводили реакції, які характеризували молекулу сполуки [2]. Знімали спектри хромогенів виділених сполук у концентрованій сірчаній кислоті і порівнювали із спектром хромогенів відповідних стандартів.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень показали, що печінка собак *in situ* здатна метаболізувати гідрокортизон і виділяти в перфузат продукти обміну гормона.

При хроматографії екстракту перфузату було виявлено шість продуктів обміну гідрокортизону. Чотири з них були ідентифіковані, решта — охарактеризовані частково (рис. 2).

Сполука I — тетрагідрокортизол (ТНФ). У першій та другій системах рухливість досліджуваної сполуки співпадала з рухливістю стандарту ТНФ. Дана сполука не виявлена в ультрафіолетовому світлі, що вказує на відсутність Δ^4 -кетогрупи, але ця сполука відновлювала тетразоловий синій, що свідчить про наявність α -кетольної групи. Максимум поглинання сполуки в концентрованій сірчаній кислоті спостерігається при довжині хвиль 330, 410 і 510 мкм і повністю співпадає із спектром поглинання стандарту ТНФ.

Сполука II — гідрокортизон. Ця сполука дає позитивну реакцію з тетразоловим синім і флюоресценцію в ультрафіолетовому світлі, що вказує на наявність у стероїдній молекулі α -кетольного бокового ланцюга і подвійного зв'язку у кільці А. Рухливість сполуки у I і II хроматографічних системах повністю співпадала із стандартами гідрокортизону.

Сполука III — тетрагідрокортизон (ТНЕ). Ця сполука рухалася паралельно із стандартом ТНЕ. Вона мала α -кетольну групу, але не мала подвійного зв'язку у кільці А. Про це свідчить її позитивна реакція із тетразоловим синім і відсутність даної сполуки в ультрафіолетовому світлі. Спектр хромогенів сполуки в концентрованій сірчаній кислоті повністю співпадає із спектром поглинання стандарту ТНЕ.

Сполука IV — кортизон (Е). При хроматографії в I і II системах мала рухливість подібну до стандарту Е. Сполука реагувала з тетразоловим синім і поглинала ультрафіолетове світло. Спектр її хромогенів у концентрованій сірчаній кислоті мав мінімум поглинання при довжині хвиль 285, 345 і 410 мкм і співпадає із спектром хромогенів стандартного розчину кортизону.

Відносно хімічної структури сполук V і VI можна припустити, що у стероїдній молекулі сполуки, яка позначена на хроматограмі номером VI, є кетольно-діоксiacетоновий ланцюг і подвійний зв'язок у кільці A. Це припущення базується на тому, що дана сполука відновлює тетразолловий синій і поглинає ультрафіолетове світло. Відносно сполуки V можна стверджувати, що вона має α -кетольну групу, але не має подвій-

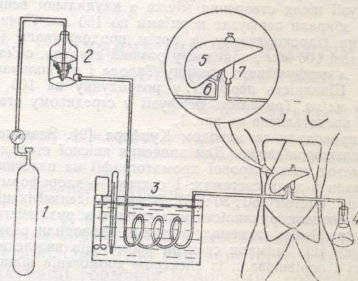


Рис. 1. Схема перфузії печінки собаки *in situ*.

1 — балон з газовою сумішшю для аерації перфузійного розчину; 2 — підйомна посудина для забезпечення регулювання швидкості перфузії; 3 — водяна баня; 4 — посудина для збирання порцій перфузату; 5 — канюля; 6 — канюля для перфузії, введена у власну артерію печінки; 7 — канюля для збирання перфузату, введена у мішок, створений з каудальної вени.

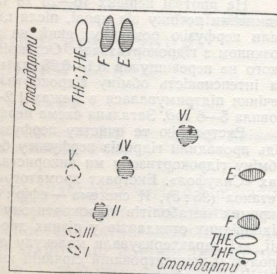


Рис. 2. Метаболіти гідрокортизону, виділені з перфузату печінки собаки. Умовні позначення на хроматограмі: F — гідрокортизон; E — кортизон; THE — тетрагідрокортизон; THF — тетрагідрокортизон; V, IV, III, II, I — сполуки, які виділилися в ультрафіолетовому світлі.

ного зв'язку у кільці A. Про це свідчить її позитивна реакція з тетразолловим синім і відсутність даної сполуки в ультрафіолетовому світлі. Підсумовуючи ці факти, можна припустити, що останні дві сполуки також є продуктами обміну гідрокортизону.

Отже, наведені дані свідчать, що головним органом, де протікають основні перетворення гідрокортизону, є печінка. Порівнюючи метаболізм гідрокортизону *in vivo*, *in vitro* та при перфузії печінки собак *in situ*, необхідно констатувати їх деяку відмінність. Вона насамперед полягає в характері спектра метаболітів та особливостях їх перетворення. Це пояснюється тим, що обмін в умовах *in vivo* відбувається не тільки метаболізм гормону, здійснюваний у печінці, але і його периферичний обмін. Однак, за цих умов він не відображає участі того чи іншого органа у загальному процесі метаболічних змін стероїдів, локалізації ферментів, які беруть участь в обміні гормонів. Дане питання може бути вирішеним при вивченні метаболізму в умовах *in vitro*. Водночас він не дає справжньої інформації про картину метаболізму, що здійснюється *in vivo*, оскільки мають місце артефакти, обумовлені порушеннями цілісності органа, відсутністю кровопостачання та інервациї, зміною проникності тканин тощо.

Використовуючи ж метод тканинної перфузії, можна одержати більш повну інформацію, оскільки метаболізм гормону у перфузованому органі наближається до умов *in vivo*. Проте, цей метод також не позбавлений недоліків і, передусім, невідомо, чи протікає метаболізм в умовах, коли тканина органа чутлива до гормону [6—8, 10].

Study of Hydrocortisone Metabolism

Отже, необхідно відділити метаболіти гідрокортизону для вивчення метаболізму. Печінка собак *in situ* діляти в перфузат такі метаболіти: тетрагідрокортизон, кортизон.

1. Метод перфузії печінки собак *in situ* для вивчення метаболізму.
2. Печінка собак *in situ* діляти в перфузат такі метаболіти: тетрагідрокортизон, кортизон.

1. Пыцкий В. И., Гуляй Ю. А.
2. Юдаев Н. А. — Химия метаболитов, М., «Медицина», 1961
3. Axelrod L., Miller L.
4. Axelrod L., Canis F., M.
5. David E., Half H. — Amer.
6. Dorfman R., Ungar F.
7. Forchioni E., Dorfman R.
8. Fraayssinet Ch. — J. de
9. Kupfer D., Peets L. — Biochem.
10. Schiff L., O'Donnell F.

STUDY OF HYDROCORTISONE METABOLISM

OF LIVER

N. D.

Laboratory of Neurohormones and Pathophysiology, Institute of Medicine, Academy of Sciences of the USSR

The dog liver was perfused in situ with a solution containing 1.2% polyglukin solution at the rate of 1.2-1.5 mg/min per 10 g of liver. It was established that the dog liver does not secrete the following metabolites: tetrahydrocortisone, cortisol, cortisone, and corticosterone.

Отже, необхідно відзначити, що для більш повноцінного вивчення обміну стероїдних гормонів, поряд із вивченням даного процесу в умовах *in vivo* та *in vitro*, може бути застосований і метод перфузії печінки та інших органів *in situ*.

Висновки

1. Метод перфузії печінки собак *in situ* становить зручну модель для вивчення метаболізму стероїдних гормонів.
2. Печінка собак *in situ* здатна метаболізувати гідрокортизон і виділяти в перфузат такі продукти обміну гормона: тетрагідрокортизол, тетрагідрокортизон, кортизон і деякі інші.

Література

1. Пыцкий В. И., Гуляй Ю. Л.— Патол. физиол., 1968, 4, 12.
2. Юдаев Н. А.— Химич. методы определения стероидных гормонов в биол. жидкостях, М., «Медицина», 1961, 22.
3. Axelrod L., Miller L.— Arch. Biochem. a. Biophys., 1954, 49, 248.
4. Axelrod L., Canis F., Miller L.— J. Biol. Chem., 1956, 216, 841.
5. David E., Half H.— Amer. J. Physiol., 1967, 1, 219.
6. Dorfman R., Ungar F.— Metabolism of Steroid Hormones, Minneapolis, 1953.
7. Forchielli E., Dorfman R.— J. Biol. Chem., 1969, 223, 443.
8. Frayssinet Ch.— J. de Physiol., 1963, 2, 141.
9. Kupfer D., Peets L.— Biochem. Pharmacol., 1966, 15, 573.
10. Schiff L., O'Donnell F.— Acta hepatosplenologica, 1962, 3, 222.

Надійшла до редакції
5.VI 1974 р.

STUDY OF HYDROCORTISONE METABOLISM BY THE METHOD OF LIVER PERFUSION IN DOGS

N. D. Tron'ko, E. N. Gorban'

Laboratory of Neurohormonal Regulation of Reproduction and Laboratory
of Pathophysiology, Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev

Summary

The dog liver was perfused *in situ* by the Tirode solution with a higher bicarbonate content, 1.2% polyglukin solution and hydrocortisone in a concentration of 100 µg with the rate of 1.2-1.5 mg/min per 10 g of the liver weight. As a result of the studies carried out it was established that the dog liver *in situ* is able of metabolizing hydrocortisone and of secreting the following metabolites of the hormone into the perfusate: tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone, cortisone, etc. The perfusion method *in situ* is a convenient model for studying metabolism of steroid hormones.