

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

На правах рукописи

Азимов Эрустам Адамович

**КОРРЕКЦИЯ ПАТОБИОХИМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ
ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРЕДСТВ ЭНЕРГОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ**

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Быков Илья Михайлович

Краснодар – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Патобиохимические механизмы развития ишемически-реперфузионного синдрома	14
1.2. Особенности ишемически-реперфузионного повреждения печени	19
1.3. Основные подходы к метаболической профилактике ишемически-реперфузионных повреждений печени	24
Глава 2. Материалы и методы исследования	31
2.1. Дизайн эксперимента	31
2.2. Дизайн лабораторной части исследования	34
2.2.1. Определение маркеров цитолиза и состояния энергетического обмена	35
2.2.2. Определение маркеров окислительного стресса	36
2.2.2.1. Определение общей антиоксидантной активности	36
2.2.2.2. Определение концентрации тиолсодержащих соединений .	39
2.2.2.3. Определение активности ферментов системы антиоксидантной защиты	41
2.2.2.4. Определение содержания продуктов окислительных модификаций биомолекул	44
2.2.3. Статистический анализ данных	45
Глава 3. Эффективность использования энерготропных средств для метаболической коррекции ишемически- реперфузионных повреждений печени	47
3.1. Влияние метаболической коррекции на показатели цитолиза гепатоцитов при ишемии-реперфузии печени	47

3.2. Оценка изменений окислительного метаболизма в крови при ишемии-реперфузии печени и проведении энерготропной коррекции	51
Глава 4. Влияние энерготропной коррекции на метаболические показатели печени в условиях ишемически-реперфузионного повреждения	63
Глава 5. Обсуждение результатов	74
Заключение	87
Выводы	99
Практические рекомендации	101
Список сокращений	102
Список литературы	103
Приложения	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Ишемически-реперфузионный синдром широко встречается в клинической практике и является основой развития повреждения различных органов при нарушении и восстановлении их кровоснабжения, что имеет место при развитии сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых хирургических заболеваний, сопровождающихся обтурацией или сдавлением кровеносных сосудов, а также при трансплантации органов [А.В. Шабунин и соавт., 2018]. Ишемические и реперфузионные поражения печени происходят при ее трансплантации и частичной резекции, при пережатии кровеносных сосудов гепатодуоденальной связки во время хирургических операций, при шоке различной этиологии [М.И. Ремизова, 2020; S. Shi et al., 2021]. Поэтому существенный интерес вызывают фундаментальные аспекты развития и течения метаболических изменений при реперфузии органа, а также способы профилактики развивающихся нарушений. В настоящее время разработано большое количество способов коррекции, а молекулярные основы ишемии-реперфузии изучены достаточно подробно [J. Li et al., 2015; M.E. Cornide-Petronio et al., 2020]. Между тем вопрос эффективной коррекции повреждения печени после ее частичной сосудистой изоляции остается нерешенным, тем более ни один из предлагаемых способов не внедрен в клиническую практику. Наиболее эффективным способом профилактики повреждения органа при гипоксии и реоксигенации сегодня считается ишемическое прекондиционирование, реализация которого в реальной клинической ситуации связана с высокими рисками дополнительного повреждения патологически измененного органа [Y. Du et al., 2019; J. Wu et al., 2021]. Поэтому мы считаем, что разработка оптимальной комбинированной схемы коррекции с использованием эндогенных субстратов, коферментов и антиоксидантов имеет наибольшие перспективы использования в хирургической гепатологии.

Степень разработанности темы. Реперфузионный синдром печени сопровождается дисфункцией микроциркуляторного русла и оксидативным стрессом, приводящим к некрозу и апоптозу гепатоцитов. Важную роль в его патогенезе играют токсические вещества, поступающие в системный кровоток, что обуславливающие общую интоксикацию. Восстановление кровотока не способствует устранению этих изменений, наоборот, ситуация усугубляется повреждающим действием свободных радикалов и цитокинов, поступающих в печень по мере реперфузии [I. Prieto, M. Monsalve et al., 2017; A. Ramachandran, H. Jaeschke et al., 2018; E.S. Ali et al., 2021]. Реперфузионные повреждения печени развиваются в 2 фазы. Ранняя развивается в первые 6 часов после восстановления кровотока и рассматривается как результат быстрого изменения редокс-статуса печеночной ткани. Поздняя фаза характеризуется активацией цитокинов и хемокинов с последующим развитием воспаления и инфильтрации печеночной ткани лимфоцитами [X. Yang et al., 2020; J. Wang et al., 2022].

Одним из направлений в исследованиях по профилактике поражения гепатоцитов при ишемии-реперфузии печени была попытка использования химических соединений, влияющих на различные стороны патогенеза, лежащих в основе патологического процесса [А.П. Довгань и соавт., 2018]. Фармакологическая коррекция, работающая на терминальном участке сигнальных защитных путей, представляет собой некоторое упрощение системы, реализующейся в виде всего набора сигнальных защитных путей, часть из которых или все вместе активируется при ишемическом прекондиционировании [J. Li et al., 2015]. Поиск фармакологических средств для прекондиционирования может сводиться к поиску средств, имитирующих ишемическое прекондиционирование. Примеры: аденозин, агонисты рецепторов аденозина, агонисты протеинкиназы С, препараты, открывающие АТФ-зависимые К⁺каналы, доноры оксида азота [А.П. Тарасова, 2018; М.Н. Ходосовский, 2019; К.А. Попов и соавт., 2022;

J.J. Franko et al., 2022]. Перспективные способы профилактики ишемически-реперфузионных нарушений связаны с воздействием на энергетический метаболизм с целью увеличения устойчивости клетки к гипоксии и повышению функциональных возможностей антиоксидантной системы [С. Nu et al., 2021]. Также такие энерготропные средства, как пропионил L-карнитин, оказывает защитное действие от повреждений, вызываемых ишемией/реперфузией, которое обусловлено снижением продукции гидроксил радикалов в реакции Фентона в результате связывания ионов железа. Имеются данные об эффективности использования различных антиоксидантных средств в коррекции ишемических нарушений, в частности перспективными являются ферментные препараты на основе супероксиддисмутазы и каталазы [К. Bavarsad et al., 2019; М. Ferreira-Silva et al., 2022]. Следовательно, коррекция патобиохимических нарушений при ишемически-реперфузионном поражении печени с использованием энерготропных средств может стать основой для разработки новых, научно обоснованных методик, позволяющих улучшить качество трансплантационных и других обширных операций на печени и снизить риск развития послеоперационных осложнений.

Цель исследования: повысить эффективность фармакологической коррекции патобиохимических нарушений при ишемически-реперфузионном поражении печени с использованием энерготропных средств.

Задачи исследования:

1. Определить особенности изменений показателей окислительного гомеостаза на местном и системном уровне в условиях частичной васкулярной эксклюзии печени у крыс.

2. Оценить эффективность метаболической коррекции патобиохимических изменений при ишемически-реперфузионном

повреждении печени крыс с использованием гепатопротектора энерготропного действия – ремаксола.

3. Проанализировать возможности повышения эффективности ремаксола за счет использования в условиях ишемии-реперфузии печени энерготропных средств с разными механизмами действия: уменьшающие степень лактат-ацидоза, компоненты дыхательной цепи, антиоксиданты.

4. Определить особенности влияния энерготропной коррекции на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крови в условии экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс.

5. Определить особенности влияния энерготропной коррекции на состояние окислительного гомеостаза в ткани печени крыс в условии экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения.

Научная новизна. В исследовании впервые:

1. Определено гепатопротекторное действие ремаксола в условии экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс, что выразилось в статистически значимо более низких значениях активности АЛТ и АСТ – на 18–21 % ниже в сравнении с показателями группы животных, которым метаболическая коррекция не проводилась.

2. Определен эффект усиления цитопротективного действия ремаксола при дополнительном введении восстановленного глутатиона и убихинона в условии моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс.

3. Показано отсутствие какого-либо дополнительного эффекта, выражающегося в изменении характеристик цитолитического синдрома или окислительного стресса, при сочетанном введении дихлорацетата натрия или

L-карнитина с ремаксолом в условии моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о развитии и течении ишемически-реперфузионных повреждений печени, роли окислительного стресса на местном и системном уровне и возможности его коррекции для профилактики цитолиза гепатоцитов. Практическая значимость диссертационного исследования заключается в экспериментальном обосновании возможности повышения гепатопротекторной активности ремаксолола при острых повреждениях печени за счет дополнительного введения средств энерготропной направленности с разными механизмами действия, что может послужить основой для разработки и апробации в клинических условиях новых схем терапии или лекарственных средств.

Методология и методы исследования. Исследование проведено с использованием самцов белых беспородных крыс ($n = 90$). Были использованы половозрелые особи массой 200–250 грамм, прошедшие карантин на базе учебно-производственного отдела (вивария) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Животные были разделены на девять групп: контрольная группа животных (1-я группа), 2-я группа сравнения (ИРП без коррекции), 3-я группа – животные с ИРП и введение ремаксолола, 4-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и дихлорацетата натрия, 5-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и убихинона, 6-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и глутатиона, 7-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и L-карнитина, 8-я группа – животные с ИРП с предварительным введением убихинона, 9-я группа –

животные с ИРП с предварительным введением глутатиона. Ишемически-реперфузионное повреждение печени моделировали путем пережатия сосудистых ножек, питающих левую боковую и левую центральную доли на 40 минут. Эксперимент выполняли на фоне общего обезболивания Золетилом 100. После снятия зажима выжидали реперфузионный период длительностью 3 часа с последующим забором крови и ткани печени. Введение средств для метаболической профилактики осуществляли внутрибрюшинно предварительно за сутки до и непосредственно перед выполнением эксперимента. Спектр лабораторных исследований включал определение маркеров цитолиза гепатоцитов – активность АСТ, АЛТ и ЛДГ в плазме крови, маркеров окислительного стресса в крови и гомогенате печени, содержания лактата и пирувата в гомогенате печени.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментальное моделирование повреждения печени в условии 40 минутной частичной ишемии и 3-х часового реперфузионного периода сопровождается увеличением активности аминотрансфераз в плазме крови в 17–19 раз и развитием окислительного стресса, проявления которого в гомогенате печени в 2 раза превышали системные изменения в крови.

2. Ремаксол в условии ишемии-реперфузии печени способен оказывать небольшое гепатопротекторное действие, что подтверждено статистически значимо более низкими значениями активности АЛТ и АСТ – на 18–21 % ниже группы сравнения.

3. Введение на фоне моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени убихинона или глутатиона совместно с ремаксолом позволило увеличить эффективность гепатопротекторного действия.

4. Введения глутатиона совместно с ремаксолом крысам с ишемически-реперфузионным повреждением печени обеспечивало поддержание состояния неферментного звена антиоксидантной системы,

введение убихинона совместно с ремаксолом обеспечивало дополнительную поддержку преимущественно ферментативного звена.

5. Для снижения выраженности цитолитического синдрома на фоне ишемии-реперфузии необходимым является нормализация баланса прооксидантно-антиоксидантной системы, дополнительное снижение уровня лактатацидоза в этих условиях не способствовало усилению гепатопротекторного действия ремаксолола.

Степень достоверности и апробации работы. Экспериментальные работы и лабораторные исследования выполнены на базе учебно-производственного отдела (вивария) и лаборатории кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, оснащенными всем необходимым современным оборудованием. Для выполнения статистической обработки результатов исследования использовали AnalystSoft Inc., StatPlus – программа статистического анализа, версия 7. Обработку данных проводили с учетом проверки нормальности распределения выборок и использования непараметрических критериев.

Диссертационное исследование выполнено в рамках комплексной темы научно-исследовательской работы кафедры фундаментальной и клинической биохимии № 121110900082-3 «Исследование молекулярных механизмов патологических процессов в условиях коморбидных форм социально значимых заболеваний» в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Основные результаты выполненной диссертационной работы доложены и обсуждены на XIII Всемирном конгрессе по астме, аллергии и иммунопатологии, III Международном конгрессе по молекулярной аллергологии (Москва, 2020), III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезде биохимиков России, X Российском симпозиуме «Белки и пептиды», VII Съезде физиологов СНГ

(Сочи – Дагомыс, 2021), научно-практической конференции с международным участием «Биохимия XXI века», посвященной 90-летию кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (Краснодар, 2021).

Внедрение результатов исследования. Основные результаты диссертационного исследования, сформулированные в качестве практических рекомендаций, внедрены в лабораторную практику Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Ключевые теоретические положения, сформулированные в результате выполнения диссертации, внедрены в учебный процесс кафедры общей и клинической патологической физиологии, и кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и используются для чтения лекционного материала и проведения практических занятий по дисциплине «Клиническая биохимия».

Публикации. Всего по материалам диссертационного исследования опубликовано 10 научных работ, из которых 5 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.

Личный вклад автора в исследование. Диссертантом разработан дизайн исследования (90 %), выполнен информационный поиск, включающий анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы (92 %), самостоятельно выполнены все экспериментальные и лабораторные исследования, проведена статистическая

обработка данных (88 %). Соискателем сформулированы выводы, положения, выносимые на защиту, предложения для внедрения и практические рекомендации (90 %). Диссертант принимал непосредственное участие в написании статей (72 %) и тезисов (83 %), подготовил текст, таблицы и рисунки для диссертации (97 %).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, иллюстрирована 12 таблицами и 22 рисунками. Список литературы содержит 139 источников, из которых 33 отечественных и 106 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Ишемия определяется как недостаточное кровоснабжение органа, что сопровождается дефицитом кислорода и нарушениями всех видов клеточного метаболизма, но в особенности энергетического. Реперфузия – это период восстановления кровотока, характеризующийся прогрессирующим повреждением клеток и тканей, что вызвано предшествующим недостатком доставки кислорода и питательных веществ, а также накоплением конечных продуктов метаболизма. Ишемически-реперфузионный синдром широко встречается в клинической практике и является основой развития повреждения различных органов при нарушении и восстановлении их кровоснабжения, что имеет место при развитии сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых хирургических заболеваний, сопровождающихся обтурацией или сдавлением кровеносных сосудов, а также при трансплантации органов [D. Xu et al., 2017; А.В. Шабунин и соавт., 2018; T. Dusabimana et al., 2019; E. Platt et al., 2022]. Ишемические и реперфузионные поражения печени происходят при ее трансплантации и частичной резекции, при пережатии кровеносных сосудов гепатодуоденальной связки во время хирургических операций, при шоке различной этиологии [М.И. Ремизова, 2020; S. Shi et al., 2021; Z. Guo et al., 2022]. Поэтому существенный интерес вызывают фундаментальные аспекты развития и течения метаболических изменений при реперфузии органа, а также способы профилактики развивающихся нарушений. Коррекция патобиохимических нарушений при ишемически-реперфузионном поражении печени с использованием энерготропных средств может стать основой для разработки новых, научно обоснованных методик, позволяющих улучшить качество трансплантационных и других обширных операций на печени и снизить риск развития послеоперационных осложнений [Y.L. Wang et al., 2022].

1.1. Патобиохимические механизмы развития ишемически-реперфузионного синдрома

Синдром ишемии-реперфузии развивается поэтапно, вслед за ишемическим периодом логически наступает период реперфузии или восстановления кровотока. При этом с одной стороны реперфузия органа является критически необходимой для выживания, с другой стороны в этот период усиливается повреждение органа, а также развивается ряд системных нарушений, в том числе полиорганная недостаточность, связанных, прежде всего, с интенсификацией окислительного стресса и активным попаданием эндотоксинов в кровоток [К. Takanori, A.B. Lentsch et al., 2017; R.F. van Golen et al., 2019]. В период реперфузии ключевую роль играет кислород, как основной участник энергетического обмена, так и источник активных форм, оказывающих повреждающее действие на биологические молекулы [Е.К. Choi, D.G. Lim et al., 2022]. В нормальных условиях полное 4-х электронное восстановление кислорода в дыхательной цепи, непосредственно реализуемое цитохромоксидазой на внутренней мембране митохондрий, приводит к образованию воды и энергии, частично запасаемой в форме макроэргического соединения АТФ и рассеиваемой в форме тепла. В ряде физиологических условий, а также при патологии, происходит утечка из митохондрий продуктов неполного 1, 2 или 3-х электронного восстановления кислорода, называемых активными формами кислорода (АФК) [Е.И. Бонь, 2019; Н. Abudhaise et al., 2021]. К АФК относят супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксидный радикал и гидропероксидный радикал. В частности, в условиях кислородной недостаточности, что наблюдается в ишемический период, на фоне относительного избытка электронов в дыхательной цепи, происходит более интенсивное образование АФК, которые в норме должны почти полностью утилизироваться системой антиоксидантной защиты [Р. Mukhopadhyay et al.,

2012; К.А. Попов и соавт., 2020; К.А. Попов и соавт., 2021]. Необходимо отметить, что в нормальных условиях радикалы кислорода, а также реактивных молекулы, такие как пероксид водорода, выполняют некоторые физиологические функции. Так они участвуют в биосинтетических процессах, процессе «окислительного взрыва», а также обеспечивают процессы внутриклеточной сигнализации. В условиях ишемии-реперфузии АФК могут также выступать в качестве посредников ряда метаболических путей [S.J. Han et al., 2018]. Считается, что одними из сигнальных путей реализации протективного действия ишемического preconditionирования, являются пути, опосредуемые АФК. Тем не менее в условиях избыточной продукции свободных радикалов в клетке или недостаточной их утилизации развивается окислительный стресс [V. Anttila et al., 2016; Y. Ikeyama et al., 2020].

Основным регулятором внутриклеточной продукции АФК является содержание в ткани кислорода, доставляемого кровью за счет молекул оксигемоглобина. Разные органы и ткани имеют различную чувствительность к избытку/недостатку кислорода. В тканях с высокой скоростью метаболизма достаточно быстро развивается гипоксическое состояние. Прекращение кровотока кроме того сопровождается прекращением доставки питательных субстратов, регуляторных факторов, а также отток крови характеризуется задержкой в такой ткани продуктов метаболизма и даже распада клеточных структур. В совокупности эти три фактора – гипоксия, отсутствие поставки энергоносителей и задержка выведения эндотоксинов составляют повреждающие факторы ишемии [N.C. Teoh et al., 2011; E. Jung et al., 2022]. В большинстве ситуаций наиболее критичным является напряжение в ткани кислорода, запасы которого наиболее ограничены. Более-менее существенными запасами данной молекулы могут располагать только мышцы за счет молекул миоглобина. Тем не менее экспериментально показано, что даже на фоне полной

сосудистой изоляции органов даже в течение нескольких часов в ишемизированной ткани остается некоторое количество кислорода, способного в этих условиях реализовать продукцию АФК и их повреждающее действие, хотя логика влияния концентрации субстрата на скорость реакции предсказывала снижение образования кислородных радикалов и реактивных молекул [J.K. Shin, S.M. Lee et al., 2017; A. Schlegel et al., 2020]. Данный эффект – усиление продукции АФК при снижении напряжения кислорода в ткани при ишемии было обозначен как «кислородный парадокс». Механизмами этого эффекта является перевосстановленность компонентов цепи переноса электронов, что уже было указано выше, а также активация процесса ROS-induced ROS release, механизм которого не до конца ясен.

Процесс перехода от ишемии к реперфузии должен обеспечить выживание клетки, тем не менее основные события, характеризующиеся усилением окислительных повреждений, происходят именно после восстановления кровотока, что связано с резким притоком большого количества кислорода. В данной ситуации срабатывает эффект относительной гипероксии на скорость продукции АФК [J. Hofmann et al., 2020; A.P. Rosello et al., 2020]. Понимание событий, их последовательности и механизмов, развивающихся в процессе ишемии-реперфузии позволяет ответить на такие вопросы, как, в какой ситуации и в какие временные промежутки следует обеспечивать восстановления кровотока, например, в хирургической практике, а также каким образом можно осуществить профилактику метаболических нарушений [X. Nan et al., 2018; A. Tara et al., 2021].

С учетом вышеописанной роли генерации АФК на всех стадиях ишемически-реперфузионного синдрома, можно сделать заключение о ведущем значении в таких условиях митохондриальной дисфункции. При этом участие митохондрий в жизнедеятельности клетки не ограничивается

только энергообеспечением и окислительным метаболизмом в более широком смысле. Митохондрии участвуют в ряде сигнальных внутриклеточных путей, депонировании ионов кальция, являются ответственными за реализацию запрограммированной гибели клетки [P.H. Willems et al., 2015; A.R. Anzell et al., 2018; К.А. Попов и соавт., 2019; Н. Abudhaise et al., 2021]. Считается, что снижение концентрации АТФ в клетке на 10–20 % сопровождается ингибированием всех энергозатратных процессов на 70–80 %, а это работа активного транспорта, в том числе Na^+K^+ АТФазы, биосинтетические процессы и др. Подавление энергообмена в митохондриях сопровождается нарушениями липидного обмена, ингибированием клиренса внеклеточного глутамата в ЦНС. В условиях ишемии-реперфузии основной причиной развития митохондриальной дисфункции является интенсификация генерации АФК в результате не только перегрузки дыхательной цепи электронами, но также снижении активности цитохромоксидазы и супероксиддисмутазы [N. Rabla, A. Vajwa, 2022]. Подавление активности цитохромоксидазы также является важной причиной усиления продукции супероксидного анион-радикала в реперфузионный период. Снижение защитного потенциала системы антиоксидантной защиты проявляется истощением концентрации глутатиона в матриксе митохондрий, вследствие этого также повышается чувствительность компонентов цепи переноса электронов к свободнорадикальным повреждениям, что в свою очередь дополнительно увеличивает утечку электронов и продукцию АФК [J. Huang et al., 2021; I.N. Mohamed et al., 2021; S.J. Cavalcante et al., 2022; J.S. Teodoro et al., 2022].

Переокисление липидов мембран митохондрий приводит к снижению уровня фосфолипидов, в особенности кардиолипина, накапливаются свободные жирные кислоты [J. Guo et al., 2019; T. Zhang et al., 2019; S. Nakagawa, J. Aruga et al., 2020; Р.А. Халилов и соавт., 2021; Y. Xue et al., 2021]. Высвобождение жирных кислот способно обеспечивать

разобщение тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, что является еще одним механизмом развития гипоэнергетического состояния [M. Klevstig et al., 2019; H. Zhang et al., 2021; S.P. Tang et al., 2022]. Повреждение митохондриальных мембран обеспечивает высвобождение цитохрома С в межмембранное пространство и цитозоль после открытия митохондриальных пор. Это является одним из основных проапоптотических сигналов [S. Zhang et al., 2022].

Другим механизмом митохондриальной дисфункции является повреждение генома митохондрий, имеющего менее совершенные системы репарации, чем ядерный. Повреждение ДНК также реализуется АФК [M. Zhang et al., 2021]. Помимо прямого повреждающего действия на нуклеиновые кислоты, АФК способны оказывать влияние на активность транскрипционных факторов, таких как NF-κB, AP-1, проапоптотический белок p66^{Shc} [Y. Xing et al., 2018; J. Lin et al., 2020; R. Bardallo et al., 2021]. Действие свободных радикалов и реактивных молекул на вышеуказанные молекулярные мишени может способствовать активации воспалительной реакции, развитию гипертрофических и фиброзных процессов [J. Wang et al., 2020; M. Wang et al., 2022].

Участие митохондрий в депонировании внутриклеточного Ca²⁺ вносит свой вклад в ишемически-реперфузионные нарушения. Высвобождение ионов кальция из митохондрий в цитозоль является одним из проапоптотических сигналов. Избыточная концентрация Ca²⁺ в матриксе активирует липолиз компонентов митохондриальных мембран, нарушает функциональную активность дыхательных ферментов [H. Zhang et al., 2021]. В частности, ионы кальция являются активаторами фосфолипазы A₂, показана возможность активации кальций-чувствительной изоформы NO-синтазы [N. Tajeddine et al., 2016; D. Matuz-Mares et al., 2022].

Описанные изменения в условиях ишемии-реперфузии подтверждают мультифакториальность рассматриваемого патологического процесса, в

котором можно выделить повреждение липидов мембран митохондрий, ингибирование активности ферментов цепи переноса электронов, генерацию АФК и высвобождение проапоптотических факторов.

1.2. Особенности ишемически-реперфузионного повреждения печени

Ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) печени является серьезным осложнением во многих клинических ситуациях, таких как резекции печени, трансплантации и травмы. Превентивная сосудистая изоляция печени, выполняющаяся во время хирургических вмешательств для снижения кровопотери, например, маневр Прингла также характеризуются временным ишемическим периодом с последующим восстановлением кровотока. Трансплантация печени включает изолирование и перфузию трансплантатов печени консервирующей жидкостью во время хранения и транспортировки. Понимание процессов, происходящих при ИРП, может способствовать улучшению клинического ведения пациентов, перенесших оперативные вмешательства с длительным периодом ишемии, частичными резекциями печеночной паренхимы или подвергшихся трансплантации органа. Экспериментальные исследования ИРП сформировали детальные представления о клеточных и молекулярных механизмах развития повреждений [S. Li et al., 2018; X.J. Zhang et al., 2018; T. Miyauchi et al., 2019; T. Miyauchi et al., 2022].

В процессе ИРП выделяют две основные фазы: раннюю и позднюю (рисунок 1.1). Ранняя фаза повреждения печени характеризуется быстрой активацией клеток Купфера в реперфузионном периоде. Активированные клетки Купфера продуцируют АФК, в том числе супероксид анион-радикал и перекись водорода, которые вызывают окислительный стресс и повреждения паренхимы и сосудов [R.F. van Golen et al., 2012; S. Wen et al., 2020].

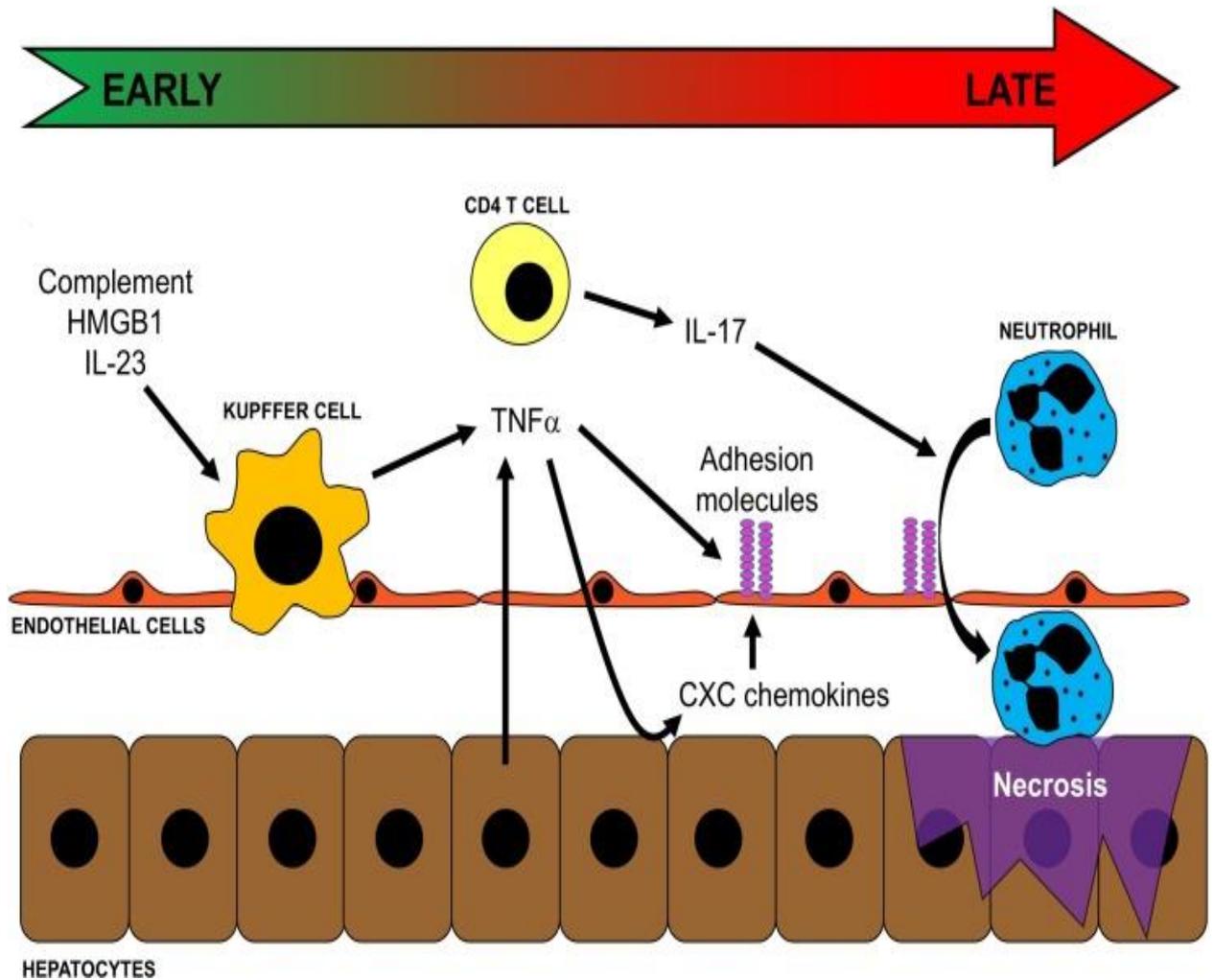


Рисунок 1.1 – Активация воспаления в процессе и после ишемически-реперфузионного повреждения печени

В этом смысле особенность повреждения печени является сравнительно большая вовлеченность в развитие окислительного стресса причин и механизмов, не связанных с митохондриальной дисфункцией. Другим мощным источником АФК в печеночной ткани при ИРП является система цитохрома P₄₅₀ испытывающая серьезные нагрузки в условиях интенсификации образования эндотоксинов и также как дыхательная цепь, работающая в условии нехватки кислорода в ишемический период и относительной гипероксии после восстановления кровотока [W. Yu et al., 2016; Y. Yang et al., 2022]. Ингибирование активности клеток Купфера перед ИРП снижает тяжесть развивающихся нарушений и выраженность

повреждения ткани печени [Е.Н. Солянская, М.А. Покатило, 2021; N.M. Patel et al., 2022]. Активация Купферовских клеток только запускает каскад последующих событий, включающий синтез и секрецию провоспалительных медиаторов, активацию лейкоцитов и значительному усилению повреждения печени [К. Takanori, A.V. Lentsch et al., 2017; Н. Hirao et al., 2022].

В условии ИРП высвобождаются клеточные белки, запускающие активацию системы комплемента и инициацию воспалительного ответа. Ингибирование компонентов системы комплемента также снижает выраженность ИРП при моделировании патологического процесса на крысах. Так исследования показали, что дефицит С3 компонента комплемента или антагонист С5aR уменьшают повреждение при ИРП, что связано с более низким привлечением нейтрофилов в очаг поражения. Основная функция комплемента при ишемически-реперфузионном синдроме – активация клеток Купфера [Т.Н. Oliveira et al., 2018; Н. Hirao et al., 2022].

Другим важным медиатором воспалительного ответа при ИРП являются Toll-подобные рецепторы (TLR). TLR экспонируются на различных типах клеток печени, включая клетки Купфера, дендритные клетки и собственно гепатоциты. Основной задачей TLR является распознавание молекулярных паттернов (DAMP) и патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) для развития и усиления воспалительного ответа. В результате ИРП окислительный стресс способствует высвобождению амфотерина (HMGB1), уровень которого повышается уже через 60 минут после начала реперфузии и который является эндогенным лигандом TLR4. Передача сигналов TLR в непаренхимных клетках, клетках Купфера и дендритных клетках необходима для усиления регуляции провоспалительных медиаторов, включая TNF- α , IL-6 и ICAM-1 [S.P. Tang et al., 2022]. Сигнальные пути TLR4 гепатоцитов включают молекулы-адаптеры, MyD88 и содержащий TIR-домен адаптер, индуцирующий IFN- β (TRIF) [Т. Ito et al., 2021; Н. Hirao et al., 2022; S. Moulding et al., 2022].

В постишемическую печень достаточно быстро привлекаются CD4 T-лимфоциты. В эксперименте было показано, что у мышей с дефицитом T-клеток и истощением антител CD4 T-лимфоцитами значительно ослабляется повреждение после ИРП. CD4 T-лимфоциты регулируют повреждение в ходе ИРП вероятнее всего за счет изменения количества нейтрофилов [M. Huang et al., 2022; S.P. Tang et al., 2022]. CD4 T-лимфоциты после ишемии-реперфузии высвобождают IL-17, индуцирующего секрецию хемокинов эпителиальными клетками, фибробластами и эндотелиальными клетками, что облегчает привлечение нейтрофилов в очаг патологического процесса. Активация же самих CD4 T-лимфоцитов в условиях ИРП реализуется с помощью АФК, IL-6 и TNF- α , продуцируемых клетками Купфера [P. Hashemi et al., 2022; J. Wang et al., 2022].

Центральную роль в прогрессировании воспалительной реакции при ИРП играют цитокины. Секреция цитокинов при ишемии-реперфузии печени начинается с IL-12 и IL-23, экспрессия которых наблюдается в течение первых часов после восстановления кровотока. Другим цитокином раннего воспалительного ответа может быть IL-1 β обеспечивающий амплификацию воспалительного ответа после ишемии-реперфузии [M.A. Morsy et al., 2022]. Наиболее известным медиатором воспаления при ИРП считается TNF- α , высвобождаемый многими клетками печени, но в особенности клетками Купфера [A. Parente et al., 2020]. TNF- α в свою очередь стимулирует гепатоциты и клетки Купфера к выработке нейтрофильных хемоаттрактантов. Инактивация TNF- α наиболее мощно подавляет развитие воспаления после ИРП и развитие структурных и функциональных повреждений органа [L.M. Ocuin et al., 2012; Z.Z. Yan et al., 2019; S.P. Tang et al., 2022].

В условиях ИРП заметную роль играет активация транскрипционного ядерного фактора NF- κ B. На ранней стадии ИРП NF- κ B активируется окислительным стрессом и провоспалительными факторами, что

обеспечивает дополнительное увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии. В клетках Купфера активация NF-κB способствует экспрессии TNF-α и IL-6. В гепатоцитах активация NF-κB стимулирует синтез и секрецию TNF-α. Активация NF-κB в эндотелиальных клетках приводит к экспрессии хемокинов семейства IL-8 и молекул адгезии E-селектина, ICAM-1 и VCAM-1 [R. Bardallo et al., 2021; P. Du et al., 2022].

Поздняя фаза ИРП характеризуется процессом рекрутирования нейтрофилов в постишемическую ткань печени, повреждением гепатоцитов путем окислительного стресса и активации протеолиза [В.З. Харченко и соавт., 2016; K. Nakamura et al., 2017]. Привлечение нейтрофилов в печеночную ткань зависит от скоординированного действия хемотаксических агентов и молекул адгезии сосудистых клеток. В условиях ИРП активно экспрессируются хемокины ELR⁺ CXC, а также некоторые нехемокиновые хемоаттрактанты, такие как лейкотриен B₄ [M. Huang et al., 2019; M.L. Alvarez, F. Lorenzetti, 2021]. Значительная роль в развитии и прогрессировании ишемически-реперфузионных повреждений печени принадлежит газотрансмиттерам [М.Н. Ходосовский, 2018; М.Н. Ходосовский, 2019; Е.Н. Солянская, 2020; G.J. Dugbartey et al., 2021; I. Mateus, C. Prip-Buus, 2022]. В позднюю фазу ИРП основное повреждение гепатоцитов обеспечивается продукцией АФК активированными нейтрофилами, тогда как в начальную фазу повреждения основная продукция свободных радикалов обеспечивалась самими клетками печени. Генерация АФК в нейтрофилах реализуется путем активации NADPH оксидазы. Кроме того, миелопероксидаза, высвобождаемая из гранул нейтрофилов, обеспечивает генерацию хлорноватистой кислоты (НОСl), относящейся к активным формам хлора. Значительная роль генерации АФК по этому пути подтверждается снижением последствий ишемии-реперфузии печени в условии ингибирования активности НАДФН-оксидазы.

Дополнительно активированные нейтрофилы высвобождают большое количество протеолитических ферментов (эластаза, катепсин G, гепараназа, коллагеназа и др.), которые способны непосредственно повреждать мембранные структуры гепатоцитов [Г.Ш. Гараев и соавт., 2018; Г.Ш. Гараев, С.О. Шахмамедова, 2018; M. Panel et al., 2019; С.О. Шахмамедова и соавт., 2020; A. Ashraf et al., 2022].

1.3. Основные подходы к метаболической профилактике ишемически-реперфузионных повреждений печени

Основные механизмы повреждения печени в условиях ишемии-реперфузии, описанные выше, позволяют сформулировать несколько направлений метаболической профилактики или коррекции развивающихся повреждений органа. Одним из активно развивающихся направлений является использование энерготропных средств, в том числе средств антиоксидантной направленности действия (рисунок 1.2) [J. Li et al., 2015; М.М. Fang et al., 2021; P.P. Wang et al., 2021; H. Ingram et al., 2022; S.F. Zou et al., 2022]. Среди таких соединений, эффективность которых апробировалась на моделях ишемии-реперфузии печени можно выделить кроцин – водорастворимый каротиноид.

В работе [S.A. Mard et al., 2017] проанализировали не только действие кроцина, но и совместный его эффект при добавлении цинка сульфата. Цинк в данной ситуации рассматривается как важный элемент-антиоксидант, входящий в состав одной из форм супероксиддисмутазы – Cu,Zn-СОД. Исследователи показали на модели 45-ти минутной частичной (в объеме 70 % органа) ишемии печени с 60-ти минутной реперфузией, что кроцин, ионы цинк и их комбинация обеспечивает гепатопротективное действие. Это было подтверждено и проявлялось усилением экспрессии белка Nrf2, снижением сывороточных уровней miR-122 и miR-34a, снижение активности

активности ферментов общих путей катаболизма. Тем не менее имеются данные, указывающие на способность альфа-кетоглутаровой кислоты (альфа-кетоглутарат, α -КГ) снижать последствия ИРП. Показано, что синтез α -КГ по глутаминолитическому пути играет важную регуляторную роль (рисунок 1.3).

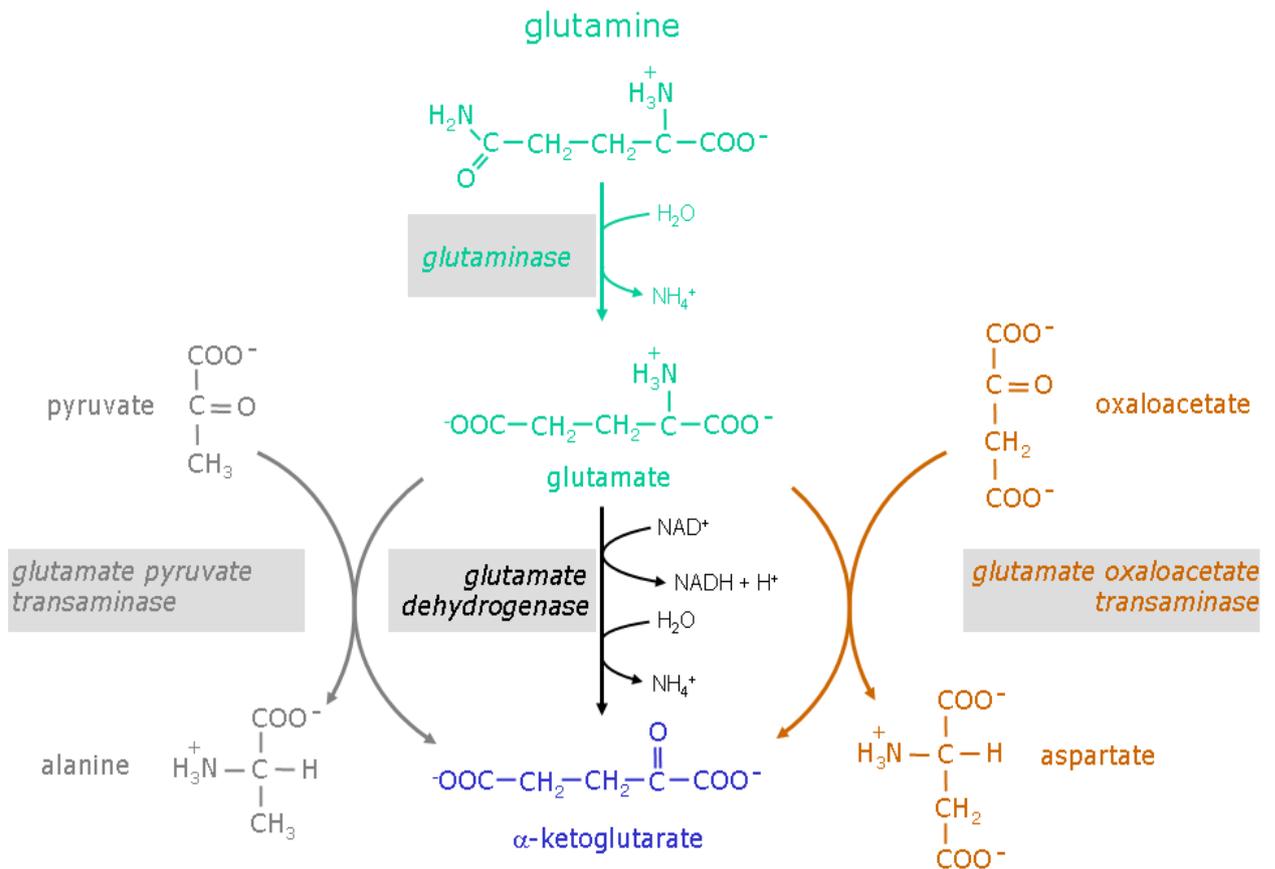


Рисунок 1.3 – Образование альфа-кетоглутарата из глутамина

α -КГ является ключевым метаболитом цикла Кребса, является предшественником глутамата и глутамина, а также играет важную роль в росте и пролиферации клеток, системы иммунного гомеостаза, развития скелета и обмена веществ в опухолевых клетках. Есть 2 пути синтеза α -КГ: цикл трикарбоновых кислот и глутаминолитический путь. α -КГ в условиях ИРП способствует активации M2 макрофагов (антивоспалительные) и

ограничивает M1 поляризацию макрофагов (провоспалительные). Поскольку макрофаги играют ключевую роль в индукции воспаления в печеночной ткани при ее ишемии-реперфузии, то и регуляция их поляризации способна модифицировать повреждение печеночной паренхимы. Более того в условиях исследований на клеточных культурах введение экзогенного α -КГ способно имитировать эффекты эндогенного, образующегося из глутамина [G. Merlen et al., 2019; E.Cienfuegos-Pecina et al., 2021].

Активным антиоксидантом является альфа-токоферол, концентрация которого значительно снижается в печени в течение первого часа ишемии. Внутримышечное введение высоких доз альфа-токоферола (до 300 мг/кг) на ранней стадии реперфузии способно улучшить процесс продукции АТФ в митохондриях и снизить проявление окислительного стресса. Введение альфа-токоферола при этом оказывает существенный протективный эффект на модели ишемии миокарда со стеатозной печенью, на фоне выполнения ишемического preconditionирования дополнительной защиты витамин Е не оказывает. Использование аскорбиновой кислоты продемонстрировало другой характер влияния. Только в условиях предварительного выполнения ишемического preconditionирования введение аскорбиновой кислоты (100 мг/кг, в/в) за 5 минут до ишемии способствовало дополнительному ослаблению митохондриальной дисфункции. При этом самостоятельное введение аскорбиновой кислоты протективного эффекта не оказывало на ИРП (10 минут ишемии + 10 минут реперфузии), а самостоятельное применение ишемического preconditionирования не оказывало такого выраженного протективного действия, как комбинация анализируемых терапевтических подходов.

Мелатонин – гормон эпифиза, способный оказывать выраженное антиоксидантное действие. Введение мелатонина крысам, подвергавшимся 60-ти минутной ишемии и 2-х часовой реперфузии обеспечивало поддержание

энергетического статуса, снижая продукцию TNF- α и подавляя экспрессию NO-синтазы [J.W. Kang et al., 2016; N. Prieto-Domínguez et al., 2016].

Выраженное антиоксидантное действие на модели ИРП оказывает введение альфа-липоевой кислоты. Препрекондиционирование с помощью введения 600 мг альфа-липоевой кислоты в/в за 15 минут до васкулярной эксклюзии печени демонстрирует возможность снижения уровня печеночных ферментов в сыворотке крови после ИРП.

В экспериментальных условиях показана возможность использования таких косвенных антиоксидантов для защиты печени при развитии ишемически-реперфузионного синдрома как десфероксамин (хелатор ионов железа) и триметазидин. В ряде работ показана эффективность использования аскорбиновой кислоты, биолавоноидов и других растительных антиоксидантов [S.G. Ibrahim et al., 2020; H. Küçükaslan et al., 2021; W. Hou et al., 2021; S. Celepli et al., 2022; F. Gori et al., 2022; X. Lu et al., 2022].

Перспективным может быть использование мощного внутриклеточного антиоксиданта – глутатиона (рисунок 1.4). Тем не менее данные об его эффективности противоречивы. Предполагается, что сравнительно крупный размер молекулы глутатиона может затруднять его поглощение клетками печени. Поэтому интерес представляет использование другого тиолсодержащего антиоксиданта – *N*- ацетилцистеина, который может также выступать в роли предшественника глутатиона. Данное соединение имеет общепризнанные гепатотропные эффекты и является одним из препаратов выбора при лечении молниеносной печеночной недостаточности вследствие отравления парацетамолом. Введение *N*- ацетилцистеина при моделировании ИРП способствует улучшению показателей функции печени, микроциркуляции и оксигенации ткани печени. Потенцировать эффекты друг друга способны *N*- ацетилцистеина и мелатонин при совместном введении перед ИРП [Y. Ntamo et al., 2022].

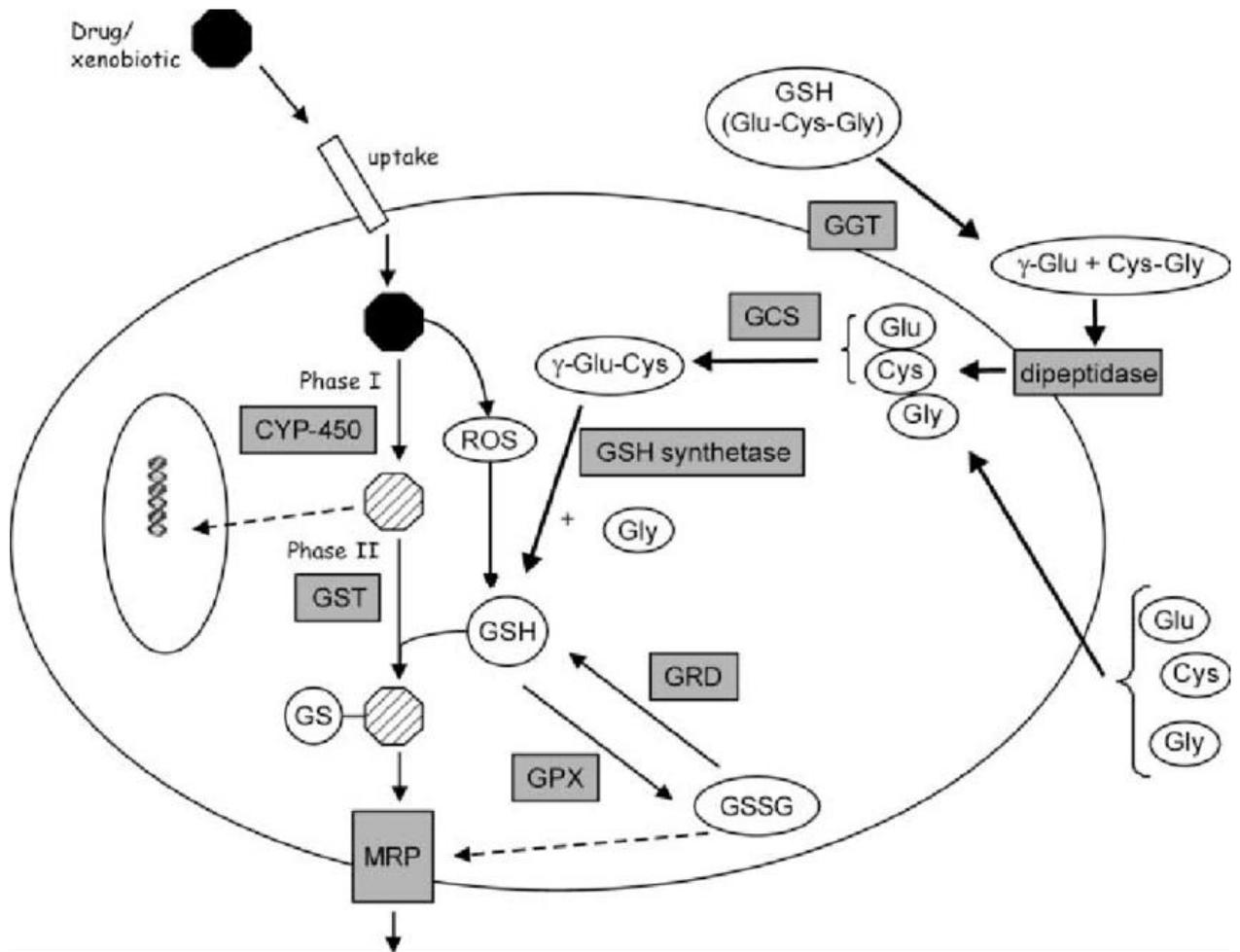


Рисунок 1.4 – Метаболизм глутатиона в клетке

Сложная организация эндогенной системы антиоксидантной защиты подразумевает использование ферментов для инактивации АФК. Это создает основу для разработки методов энзимотерапии ИРП [И.Ю. Цымбалюк и соавт., 2016; К.А. Попов и соавт., 2018; Р.А. Халилов и соавт., 2019; А.Е. Гордеева и соавт., 2021]. Среди таких ферментов наиболее распространены препараты супероксиддисмутазы, в том числе отечественный препарат – Рексод. Тем не менее результаты применения этого фермента при моделировании ИРП показали неоднозначные результаты, что может быть связано с быстрым распадом фермента в крови (в среднем 6 минут) и сложностью доставки фермента в клетки ввиду его высокой молекулярной массы. Аналогичные проблемы связаны и с

использованием каталазы и ее аналогов в качестве терапевтических агентов. Здесь также уместно указать возможности использования аллопуринола – ингибитора ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы – ферментов-индукторов образования АФК. Показано, что предварительное введение аллопуринола в высоких дозах (50 мг/кг) оказывает протективное действие на модели ИРП у крыс [X.L. Mao et al., 2022].

Таким образом, ИРП – патологический процесс, затрагивающий не только печень, но и сложный системный процесс, имеющий ряд системных осложнений. ИРП может нарушить функции печени вплоть до развития печеночной недостаточности, которая вызывает каскад реакций, ведущих к полиорганной дисфункции. В регуляции ИРП участвуют многие факторы, включая анаэробный метаболизм, повреждение митохондрий, окислительный стресс, внутриклеточная перегрузка ионами кальция, цитокины и хемокины, продуцируемые клетками Купфера и нейтрофилами, а также NO. Наиболее важные пути ИРП инициируются окислительным стрессом, анаэробным метаболизмом и ацидозом, что в дальнейшем приводит к повреждению клеток за счет индукции апоптоза и иммунных реакций. На ранних стадиях реперфузии отек эндотелиальных клеток, сужение сосудов, захват лейкоцитов и внутрисосудистый гемостаз приводят к нарушению микроциркуляции и обширные участки печеночной паренхимы остаются ишемизированными после начала реперфузии. Вторая фаза является результатом продукции воспалительных цитокинов и АФК. С учетом значительной роли АФК в ИРП в настоящее время апробированы в экспериментальных условиях многие известные антиоксиданты, некоторые из них продемонстрировали обнадеживающие результаты, сравнимые с эффективностью ишемического preconditionирования. Тем не менее разработка стратегии энерготропной и антиоксидантной коррекции ИРП является актуальной темой современной экспериментальной и клинической гепатологии.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн эксперимента

Исследование проведено с использованием самцов белых беспородных крыс ($n = 90$). Были использованы половозрелые особи массой 200-250 грамм, прошедшие карантин на базе учебно-производственного отдела (вивария) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Животные были разделены на следующие семь основных групп (рисунок 2.1):

1. Контрольная группа животных: ложнооперированные животные без выполнения моделирования патологического процесса после срединной лапаротомии ($n = 10$).

2. Группа сравнения (без коррекции): животные после выполнения моделирования ишемии печени в течение 40 минут и реперфузии в течение 3 часов ($n = 10$).

3. Группа животных, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения печени и коррекции с использованием ремаксол ($n = 10$).

4. Группа животных, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения печени и коррекции с использованием комбинированной смеси, содержащей ремаксол и дихлорацетат натрия ($n = 10$).

5. Группа животных, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения печени и коррекции с использованием комбинированной смеси, содержащей ремаксол и кофермент Q (убихинон) ($n = 10$).

6. Группа животных, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения печени и коррекции с использованием

комбинированной смеси, содержащей ремаксол и восстановленный глутатион (n = 10).

7. Группа животных, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения печени и коррекции с использованием комбинированной смеси, содержащей ремаксол и L-карнитин (n = 10).



Рисунок 2.1 – Дизайн исследования – группы испытуемых животных.

Примечание: ИРП – ишемия-реперфузия печени, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон.

После того, как были получены положительные данные о влиянии глутатиона и убихинона на гепатопротекторную активность ремаксола были сформированы еще 2 дополнительные подгруппы сравнения лабораторных животных по 10 особей в каждой:

8. Группа животных, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения печени и коррекции с использованием коэнзима Q (n = 10).

9. Группа животных, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения печени и коррекции с использованием восстановленного глутатиона (n = 10).

Ишемически реперфузионное повреждение печени моделировали путем пережатия сосудистых ножек, питающих левую боковую и левую центральную доли зажимом типа Бульдог на 40 минут (рисунок 2.2).

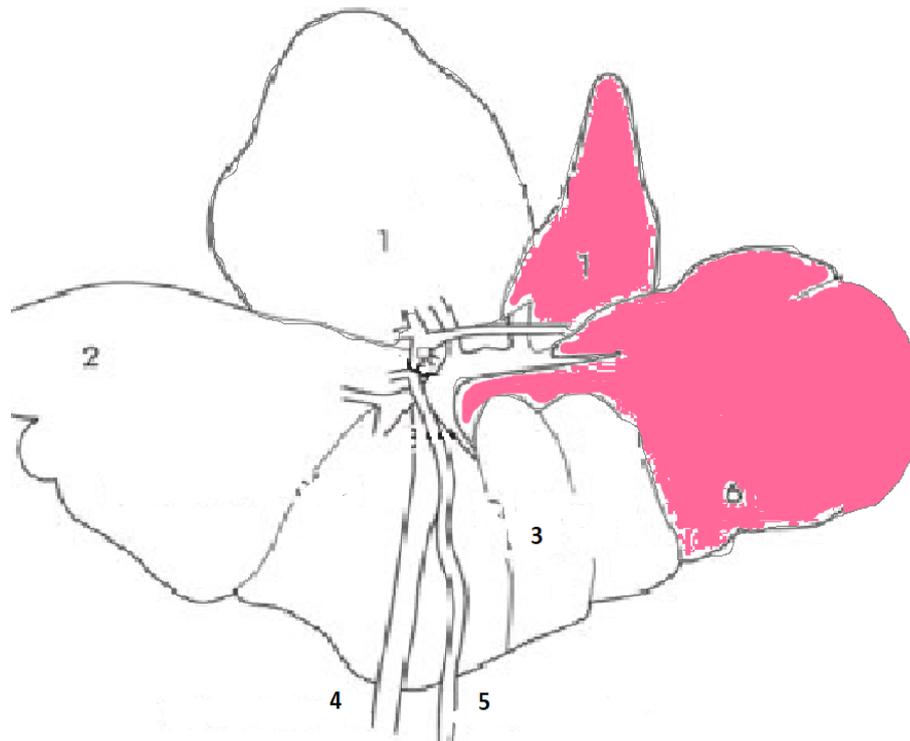


Рисунок 2.2 – Схема выполнения эксперимента – выделены доли, подвергавшиеся ишемии.

Примечание: 1 – правая и левая центральные доли, 2 – правая боковая доля, 3 – добавочная и хвостатая доли, 4 – воротная вена, 5 – желчный проток, 6 – левая боковая доля.

Эксперимент выполняли на фоне общего обезболивания Золетилом 100 после выполнения срединной лапаротомии. После снятия зажима и восстановления кровотока выжидали реперфузионный период длительностью 3 часа с последующим забором крови и ткани печени для выполнения лабораторных исследований. Введение средств для метаболической профилактики осуществляли внутривентриально предварительно за сутки до эксперимента и непосредственно после выполнения срединной лапаротомии. Ремаксол вводили в объеме 2 мл, дихлорацетат вводили в дозировке 100 мг/кг, восстановленный глутатион вводили в дозировке 50 мг/кг, убихинон вводили в дозировке 100 мг/кг, карнитин вводили в дозировке 100 мг/мл. Выбор дозировок был обоснован литературными данными и необходимостью достижения эффекта на фоне острого повреждения печеночной паренхимы и двукратного введения препаратов [П.В. Васильев и соавт., 2020].

Проведение экспериментальных работ с лабораторными животными было одобрено на заседании независимого этического комитета ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 80 от 27.09.2019 г.) и было основано на этических принципах, изложенных в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986). Все болезненные манипуляции выполняли только после общего обезболивания с использованием препарата «Золетил 100» (Франция).

2.2. Дизайн лабораторной части исследования

Для оценки эффективности коррекции выполняли определение маркеров цитолиза гепатоцитов – активность АСТ, АЛТ и ЛДГ в плазме крови. Для оценки особенностей протекания энергетических процессов в гомогенате ткани печени было определено содержание молочной и пировиноградной кислот. Для характеристики свободнорадикального

гомеостаза в крови и гомогенате печени были определены: активность ферментов антирадикальной защиты (каталаза, супероксиддисмутаза, ферменты метаболизма глутатиона), содержание восстановленной формы глутатиона, уровень белковых тиоловых групп, продукция активных форм кислорода и накопление продуктов окислительных повреждений биомолекул (малоновый диальдегид, диеновые и триеновые конъюгаты, битирозин).

Использованное оборудование: мультимодальный планшетный ридер FluostarOmega (BMG, Германия), анализатор биохимический автоматический многоканальный Super Z (Китай), однолучевой сканирующий спектрофотометр UNICO 2800 (США) с системой проточной термостатируемой кюветы, спектрофлуориметр CM2203 (Solar, Беларусь), универсальная центрифуга с охлаждением Centrifuge 5424 R (Eppendorf, Германия), гомогенизатор IKA Ultra-Turrax T18 digital (IKA, Германия), рН-метр рН-150МИ, термостаты, автоматические дозаторы, лабораторные центрифуги, аналитические весы, химические реактивы и посуда, компьютерная техника.

2.2.1. Определение маркеров цитолиза и состояния энергетического обмена

Для оценки выраженности цитолиза гепатоцитов, развивающегося в результате ишемически-реперфузионного повреждения печени, определяли традиционные печеночные маркеры – активность в плазме крови аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [К.А. Попов и соавт., 2020]. Определение активности данных ферментов было основано на энзиматическом методе, реализованном в коммерческих реагентах Randox (Великобритания), адаптированных для использования на автоматическом биохимическом анализаторе.

Для оценки активности анаэробных процессов в печеночной ткани выполняли определение метаболитов энергообмена – концентрации молочной кислоты (лактата) и пировиноградной кислоты (пирувата). Для оценки концентрации лактата в плазме крови (полученной при заборе крови в пробирки с фторидом натрия, помимо антикоагулянта) и гомогенате печени использовали набор реагентов Randox (Великобритания), основанный на энзиматическом способе, также адаптированным для автоматического биохимического анализатора. Для определения содержания пирувата в плазме крови (полученной при заборе крови в пробирки с фторидом натрия, помимо антикоагулянта) и гомогенате печени использовали наборы реагентов ПИРУВАТ UV-АБРИС+ (Россия).

2.2.2. Определение маркеров окислительного стресса

Для проведения комплексной оценки состояния окислительного гомеостаза определяли традиционные маркеры оксидативных повреждений биомолекул – содержание ТБК-реактивных продуктов и уровень остатков битирозина. С целью характеристики нарушений в работе системы антиоксидантной защиты, что также является важным лабораторным проявлением оксидативного стресса, определяли восстанавливающую активность биожидкостей, способность биожидкостей сорбировать (нейтрализовать) радикалы, содержание тиоловых групп (SH) в плазме крови, концентрацию глутатиона (GSH) в эритроцитах и гомогенате печени, активность некоторых ферментов – каталазы (КАТ), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО).

2.2.2.1. Определение общей антиоксидантной активности

Определение общей антиоксидантной активности (АОА) является одним из центральных вопросов лабораторной диагностики окислительного стресса ввиду интегрального характера данного показателя. Для определения

антиоксидантной активности (антиокислительной емкости) использовали железо-восстанавливающий метод, принцип которого описан на рисунке 2.3.

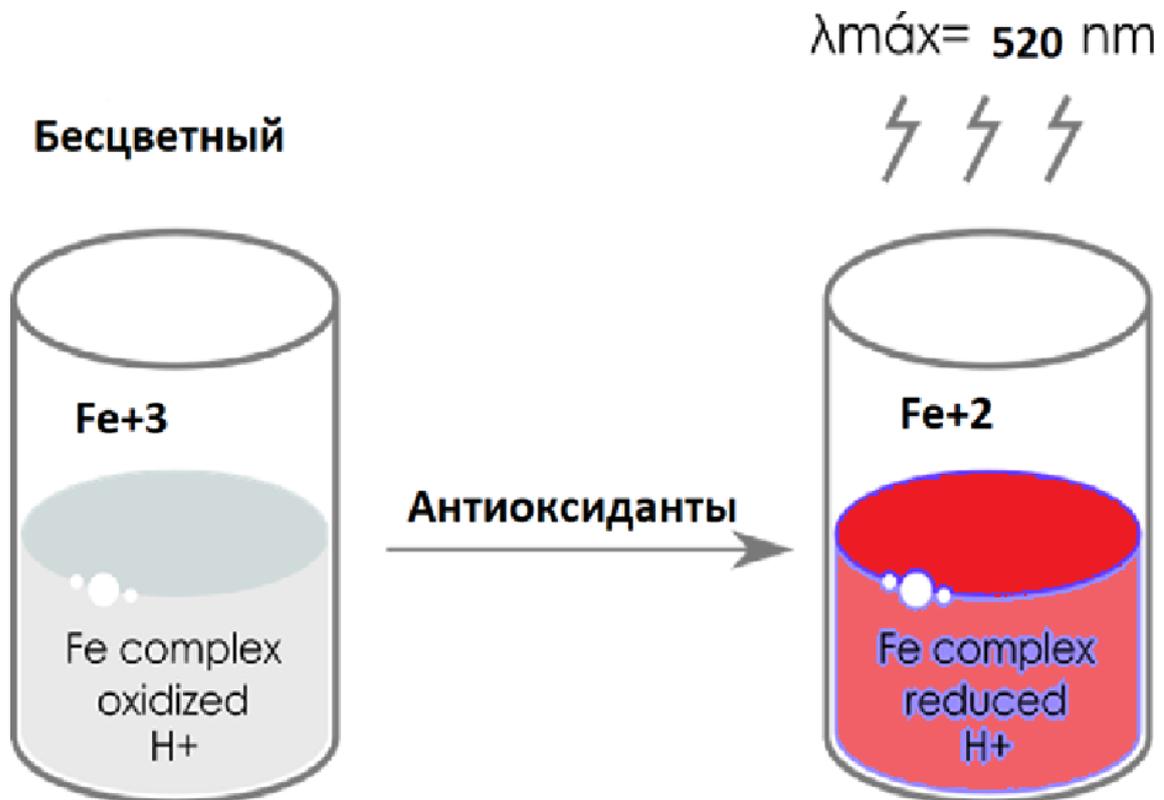


Рисунок 2.3 – Принцип определения общей антиоксидантной активности плазмы крови железо-восстанавливающим методом

Для выполнения методики 0,05 мл неразбавленной плазмы крови вносили в реакцию смесь, содержащую 10 мМ FeCl_3 и 7 мМ 2,2'-дипиридила в 0,1 М ацетатном буферном растворе с $\text{pH} = 3,6$, общим объемом 1,8 мл. Реакционную смесь инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 минут после чего фотометрировали при 520 нм против холостой пробы, содержащей дистиллированную воду вместо биожидкости. Полученные данные, выраженные в единицах оптической плотности, сравнивали с калибровочными данными, полученными при определении железо-восстанавливающей способности раствора аскорбиновой кислоты в концентрациях 0,1–5 мМ. Выражали конечные данные соответственно в мМ раствора аскорбиновой кислоты.

В рамках оценки общей антиоксидантной активности плазмы крови и гомогената ткани также определяли способность радикальной сорбции при использовании катиона радикала 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо кислоты) или ABTS^{*+}. Предварительно подготавливали рабочий раствор ABTS^{*+} путем растворения 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо кислоты) в 2,45 мМ растворе персульфата калия до конечной концентрации 7 мМ. Полученную смесь инкубировали в течение суток в защищенном от света месте при комнатной температуре [I.R. Pyasov et al., 2020] (рисунок 2.4).

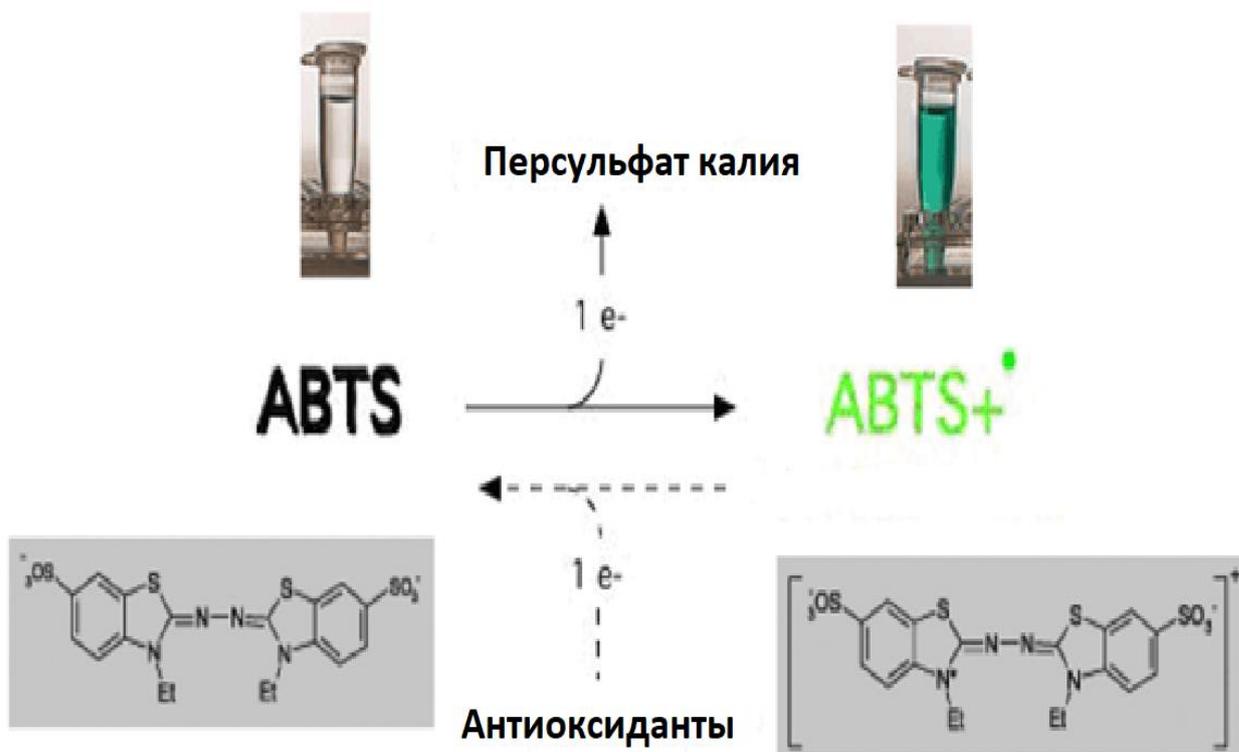


Рисунок 2.4 – Принцип определения способности радикальной сорбции биожидкостей

Непосредственно перед выполнением определения способности радикальной сорбции разводили полученный рабочий раствор дистиллированной водой до получения раствора со значением оптической

плотности $0,7 \pm 0,02$ при контроле на спектрофотометре на длине волны 734 нм. Выполнение методики заключалось во внесении 0,05 мл биожидкости (разведенная плазма крови физиологическим раствором в 3 раза или гомогенат печени с концентрацией белка 5 мг/мл) в 1,5 раствора ABTS^{*+} с отслеживанием снижения оптической плотности в течение 3-х минут. Расчет определяемого показателя осуществляли по формуле:

$$\text{способность радикальной сорбции (\%)} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100;$$

где A_0 – поглощение только реакционной смеси, а A_1 – поглощение реакционной смеси после окончания инкубации с биожидкостью.

Полученные данные, выраженные в %, сравнивали с данными, полученными при исследовании калибровочных растворов аскорбиновой кислоты в концентрациях 0,1–5 мМ. Также, как и в предыдущей методике конечный результат был выражен в мМ аскорбиновой кислоты, для возможности сравнения с результатами других исследователей.

2.2.2.2. Определение концентрации тиолсодержащих соединений

В качестве тиолсодержащих антиоксидантов нами рассматривались общие тиоловые группы плазмы крови, в основном представленные остатками цистеина белков, а также восстановленная форма глутатиона, локализованного преимущественно внутриклеточно. Для определения обоих параметров использовали метод, основанный на реакции SH-групп с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) или реактивом Элмана [И.В. Вережкина и соавт., 1977; К.А. Попов и соавт., 2017; И.М. Быков и соавт., 2018] (рисунок 2.5).

Для определения тиоловых групп белков плазмы крови 0,15 мл биожидкости вносили в 1,5 мл 0,1 М натрий-калиевого фосфатного буферного раствора и добавляли 25 мкл 0,6 %-го метанольного раствора

ДТНБ. Оптическую плотность раствора измеряли при 412 нм до внесения раствора ДТНБ и через 30-ть минут после. Полученные данные выражали в единицах оптической плотности с поправкой на концентрацию белка в биологической жидкости.

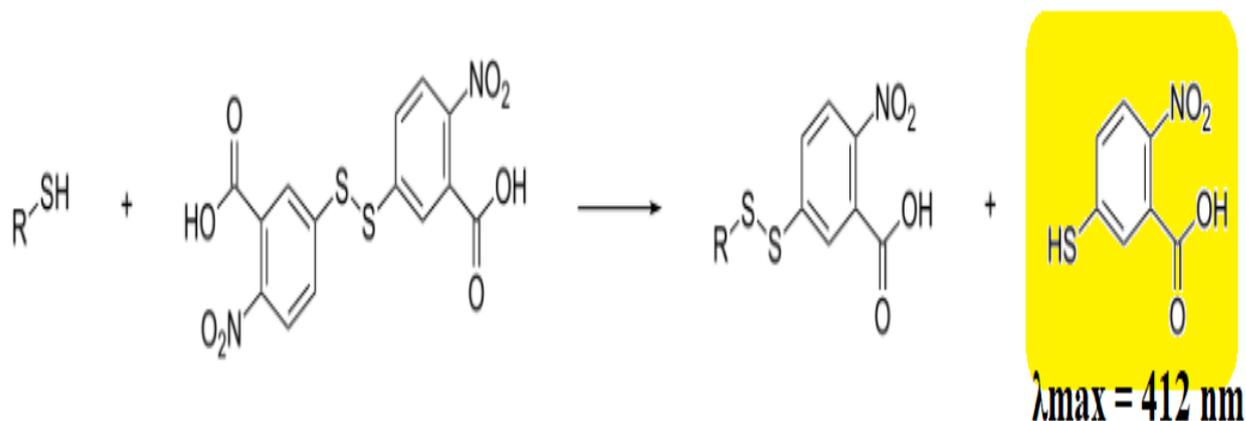


Рисунок 2.5 – Принцип определения тиолсодержащих соединений

Для определения концентрации восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси и гомогенате печени предварительно выполняли осаждение белков, мешающих определению. Использовали гемолизат эритроцитарной взвеси, разведенной холодной дистиллированной водой в десять раз и гомогенат печени с концентрацией белка 5 мг/мл. Для депротеинизации смешивали 0,6 мл биожидкости и 0,2 мл 20 %-й сульфосалициловой кислоты. После центрифугирования отбирали 0,2 мл надосадочной жидкости и вносили в 2,5 мл 0,1 М трис-НСl буферного раствора с рН = 8,5 и 0,01 % ЭДТА. Несколько более щелочной характер среды был необходим для нейтрализации ранее использованной сульфосалициловой кислоты. К полученной реакционной смеси добавляли 25 мкл 0,6 %-го метанольного раствора ДТНБ. Фотометрировали раствор при 412 нм, сравнивали полученные данные с результатами испытаний в аналогичных условиях калибровочных растворов глутатиона с концентрацией 0,1-5 мкмоль/мл.

2.2.2.3. Определение активности ферментов системы антиоксидантной защиты

Для комплексной характеристики состояния ферментативного звена системы антиоксидантной защиты была определена активность каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в эритроцитарной взвеси и гомогенате печени крыс. Все энзиматические методики были основаны на регистрации истощения субстрата в ходе реакции [А.И. Карпищенко, 2002; И.М. Быков и соавт., 2018].

Для определения активности каталазы использовали ее способность разрушать перекись водорода, концентрацию которого определяли фотометрически при 260 нм. Использовали гемолизат эритроцитов, приготовленный путем разбавления эритроцитарной взвеси холодной дистиллированной водой в 1000 раз, и гомогенат печени с концентрацией белка 0,02 мг/мл. Исследуемую биожидкость или гомогенат ткани в объеме 0,2 мл вносили в 2,5 мл буферного раствора, содержащего перекись водорода в концентрации 0,3 %. Реакцию останавливали через 5 минут путем внесения 0,3 мл 50 %-го раствора трихлоруксусной кислоты. Об исходной концентрации пероксида водорода и его неферментативной убыли судили по оптической плотности контрольной пробы, в которую заблаговременно вносили трихлоруксусной кислоты, еще до внесения биожидкости. Активность каталазы выражали в количестве пероксида водорода, определенного как разница между концентрацией в контрольной и опытной пробах, разрушенного в ходе реакции за 5-ть минут. Каталазную активность выражали в моль/(л·мин).

Об активности глутатионпероксидазы судили по скорости расходования восстановленного глутатиона при разложении гидроперекиси трет-бутила (рисунок 2.6). Использовали гемолизат эритроцитов, приготовленный путем разбавления эритроцитарной взвеси холодной дистиллированной водой в 200 раз, и гомогенат печени с концентрацией

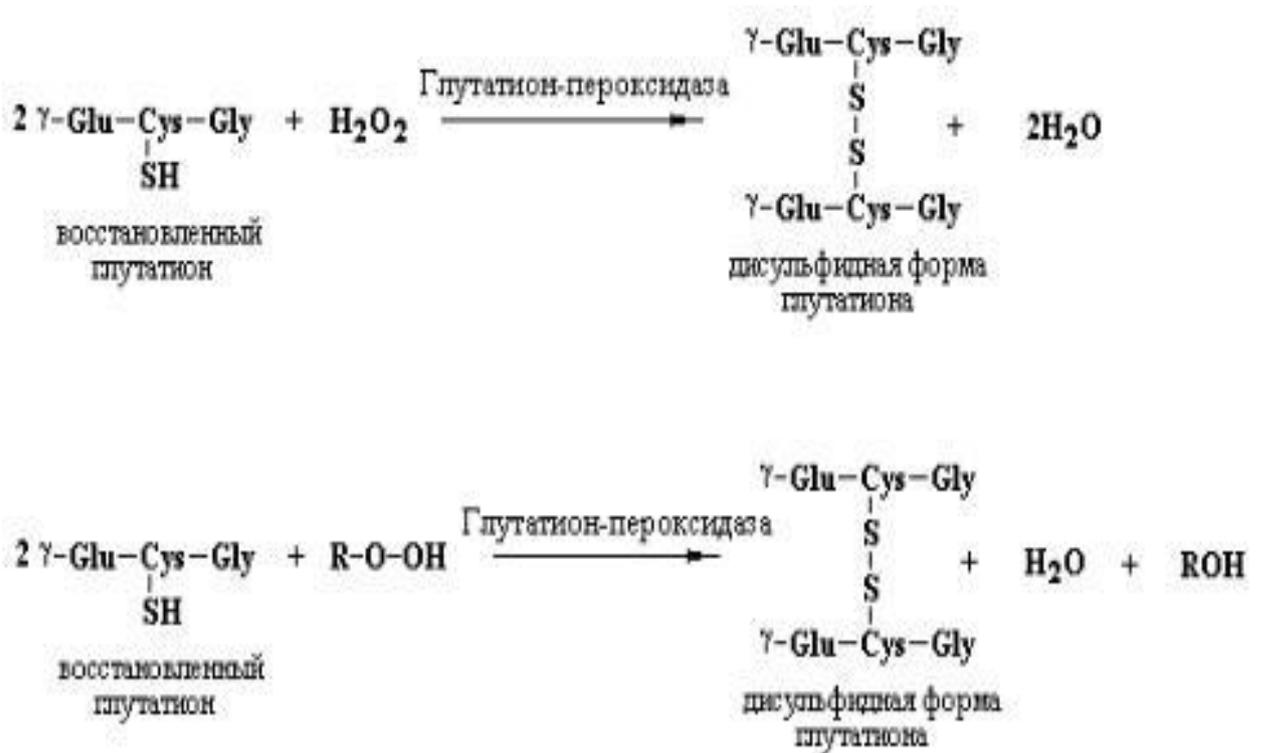


Рисунок 2.6 – Реакции, катализируемые глутатионпероксидазой

белка 0,5 мг/мл. Исследуемую биожидкость или гомогенат ткани в объеме 0,2 мл вносили в 0,73 мл сложного буферного раствора, содержащего 0,15 % восстановленного глутатиона и 0,08 % NaN_3 , приготовленного непосредственно перед исследованием. После 10-ти минутной инкубации в термостате при 37°C к реакционной смеси добавляли 0,05 мл 0,05 % раствора гидропероксида трет-бутила. После проведения реакции в течение 10-ти минут также в термостате, при аналогичных описанным выше условиям, останавливали работу фермента внесением 0,2 мл 20 %-го раствора трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования отбирали 0,1 мл надосадочной жидкости в которой определяли остаточную концентрацию восстановленного глутатиона по способу, описанному выше в подразделе 2.2.2.2. Параллельно ставили контрольную пробу, в которую трихлоруксусную кислоту вносили заблаговременно, еще до внесения биопробы. Активность фермента рассчитывали с учетом убыли концентрации глутатиона в течение 10-ти минут и выражали в ммоль/(л·мин).

Активность глутатионредуктазы определяли по способу, основанному на регистрации убыли НАДФН в ходе восстановления окисленной формы глутатиона (рисунок 2.7). Использовали гемолизат эритроцитов, приготовленный путем разбавления эритроцитарной взвеси холодной дистиллированной водой в 10 раз, и гомогенат печени с концентрацией белка 1 мг/мл. В ходе выполнения методики 0,05 мл биожидкости или гомогената печени добавляли к 1,8 мл 0,1 М натрий-калий фосфатному буферному раствору с рН = 7,0. К реакционной смеси добавляли по 0,1 мл 1,2 % раствора окисленного глутатиона и 0,15 % раствора НАДФН. Убыль НАДФН регистрировали в УФ-области спектра света при 340 нм в течение 3-х минут. Активность выражали в ммоль/(л*мин).

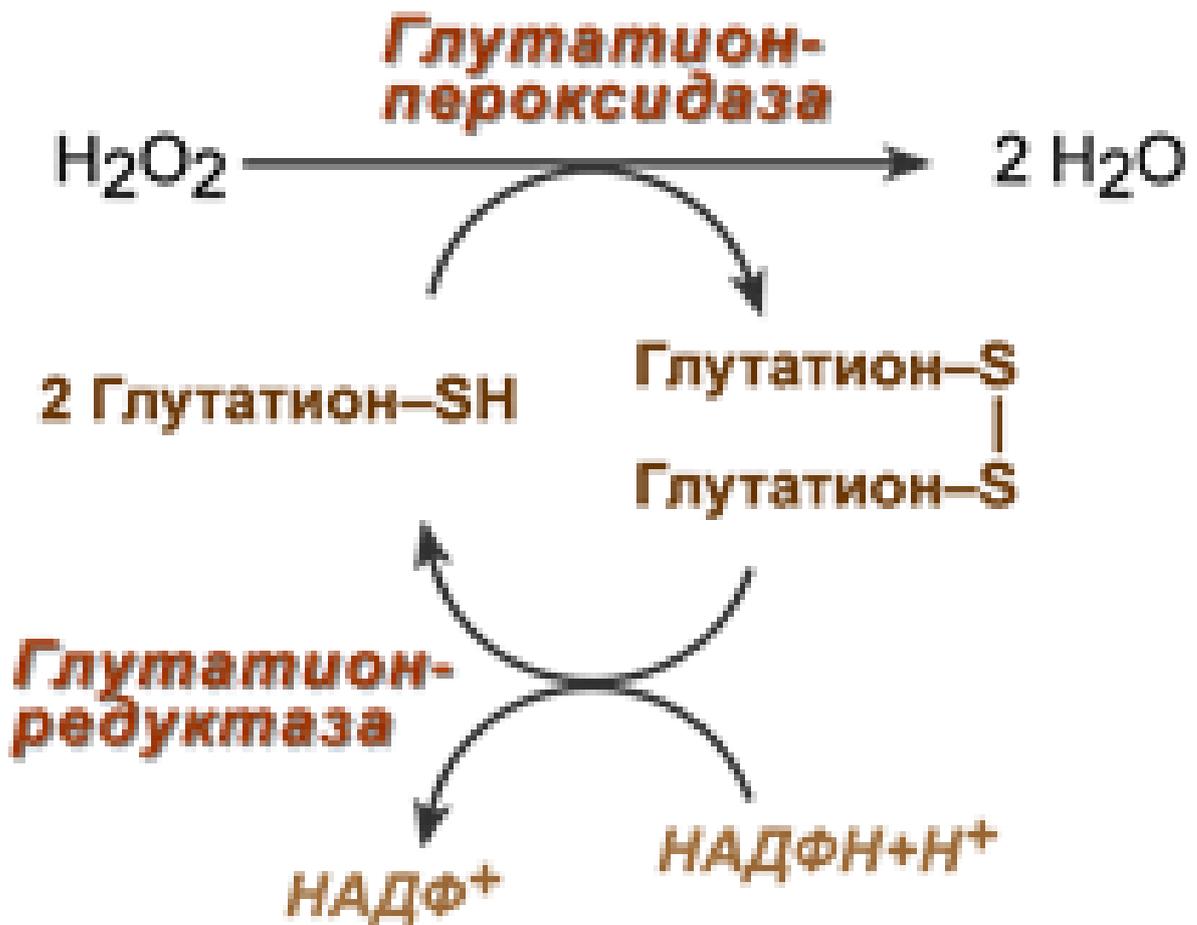


Рисунок 2.7 – Реакции, катализируемые ферментами системы глутатиона

2.2.2.4. Определение содержания продуктов окислительных модификаций биомолекул

Об активности протекания свободнорадикальных процессов судили о накоплении продуктов окислительных модификаций биомолекул, в качестве которых определяли ТБК-реактивные продукты, образующиеся в ходе перекисного окисления липидов (рисунок 2.8), и остатки битирозина – продукта окислительных повреждений белков [В.С. Камышников, 2004].

Перекисное окисление липидов

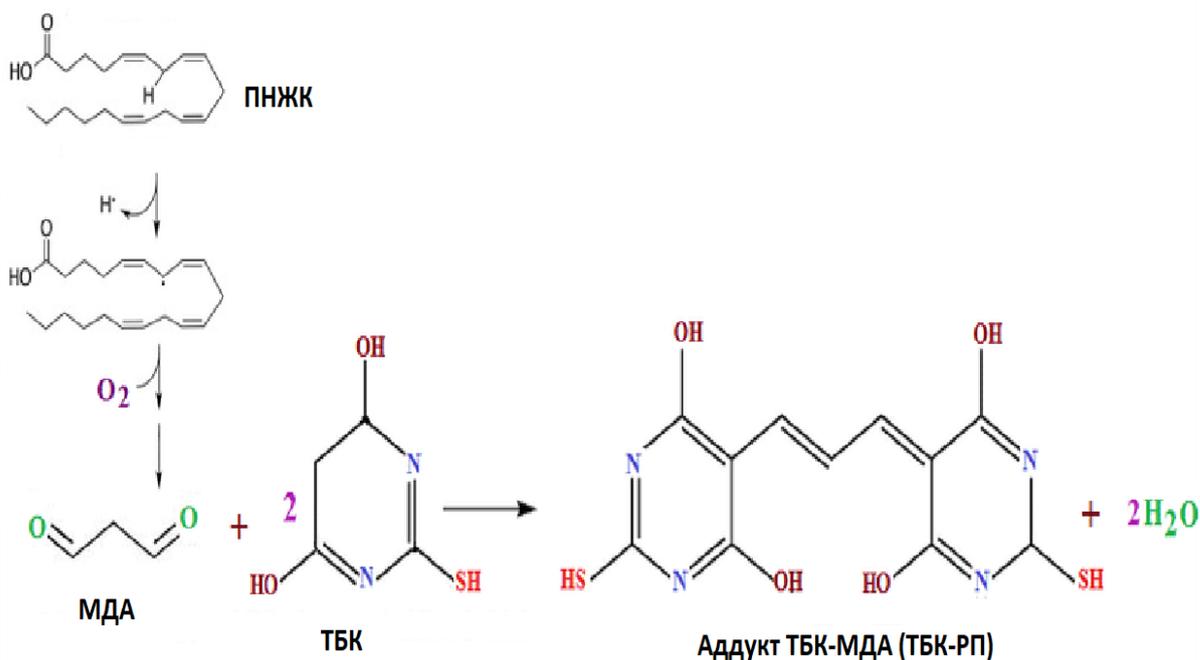


Рисунок 2.8 – Схема образования ТБК-реактивных продуктов

Для определения ТК-реактивных продуктов использовали трижды отмытую эритроцитарную взвесь и гомогенат печени с концентрацией белка 5 мг/мл. Биожидкость или гомогенат печени в объеме 0,5 мл разбавляли таким же объемом физиологического раствора и инкубировали в течение 60 минут в термостате при 37 °С. После чего реакцию смесь депротеинизировали внесением 0,5 мл 20 %-го раствора трихлоруксусной кислоты. К полученной смеси добавляли 0,5 мл 0,8 % раствора

2-тиобарбитуровой кислоты и кипятили на водяной бане в течении 15-ти минут. После центрифугирования и отделения осадка, фотометрировали надосадочную жидкость на 2-х длинах волн – 450 и 532 нм. Результаты выражали как тиобарбитуровое число (ТБЧ) биопробы – сумма оптического поглощения растворов на 2-х вышеописанных длинах волн.

Определение остатков битирозина в составе белков плазмы крови (рисунок 2.9) было основано на способности их испускать флуоресценцию света длиной волны 418 нм при возбуждении светом длиной волны 325 нм. Для определения использовали плазму крови, предварительно разбавленную физиологическим раствором в 50 раз. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре СМ 2203 (Solar, Беларусь).

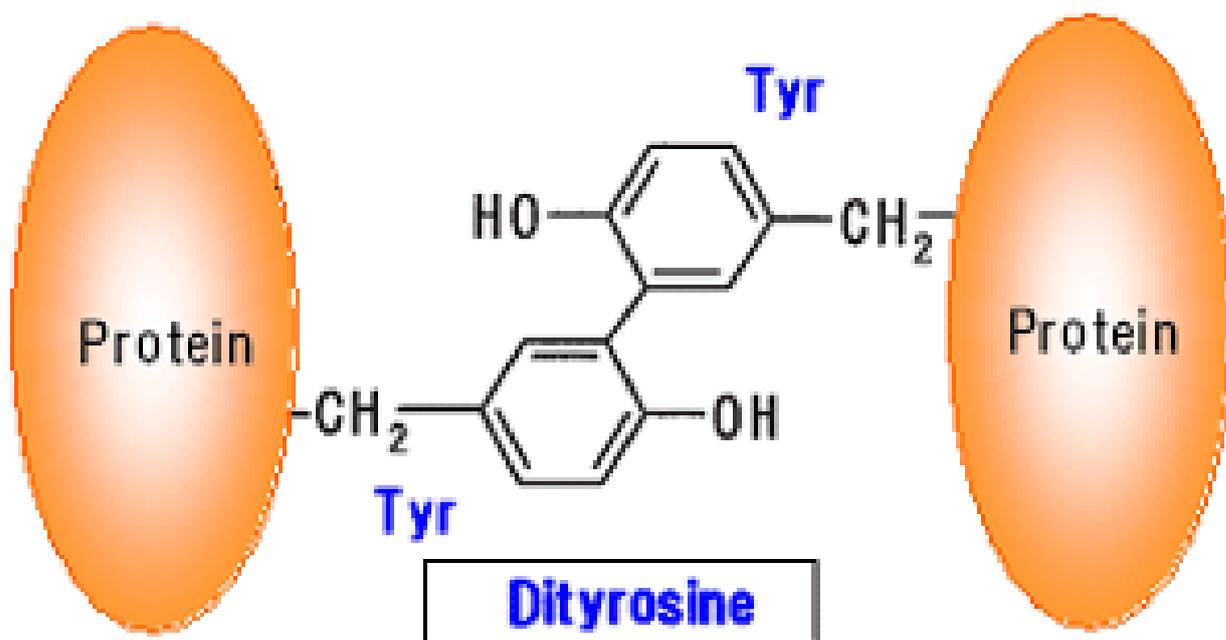


Рисунок 2.9 – Остатки битирозина в составе белков

2.2.3. Статистический анализ данных

Для выполнения статистической обработки результатов исследования использовали AnalystSoft Inc., StatPlus – программа статистического анализа. Версия 7. См. www.analystsoft.com/ru/. Для проверки нормальности

распределения выборок, с учетом их малого размера был выбран критерий Шапиро-Уилка. В большинстве случаев нулевая гипотеза об отсутствии отличий распределения от нормального была отклонена. В этой связи данные в диссертационной работе были представлены в виде медианы (Me) и процентилей (P_{25} и P_{75}). Для сравнения показателей использовали непараметрический критерий – критерий Краскела – Уоллиса, являющийся непараметрическим аналогом однофакторного дисперсионного анализа. Различия показателей при сравнении выборок считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. При условии обнаружения статистически значимых различий между группами в целом проводили попарные сравнения. Для этого был использован критерий Манна – Уитни с поправкой на число попарных сравнений.

ГЛАВА 3

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНЕРГОТРОПНЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ

Оценка эффективности использования средств энерготропной направленности действия, таких как ремаксол, дихлорацетат натрия, коэнзим Q (убихинон), глутатион и карнитин, в условиях ишемически-реперфузионного повреждения печени (ИРП) включала обязательное определение маркеров цитолиза гепатоцитов в крови и маркеров окислительного стресса. При этом изменения маркеров цитолиза гепатоцитов – ферменты печени (активность АЛТ, АСТ, ЛДГ и др.) позволяют судить об объеме поражения печеночной паренхимы и разрушения гепатоцитов. Оценка изменений маркеров окислительного стресса является обязательной ввиду ключевой роли АФК в развитии патобиохимических и патофизиологических изменений при ишемии-реперфузии тканей и с учетом направленности действия используемых метаболических корректоров, связанной с прямой или косвенной антиоксидантной активностью.

3.1. Влияние метаболической коррекции на показатели цитолиза гепатоцитов при ишемии-реперфузии печени

Для оценки выраженности цитолиза гепатоцитов у животных после частичной ишемии в течение 40 минут и 3-х часового реперфузионного периода в плазме крови определяли активность ферментов – АЛТ, АСТ и ЛДГ, рассматривающиеся как классические показатели повреждения клеток печени. Ожидаемо на фоне моделирования экспериментального ишемически-реперфузионного поражения печени наблюдалось резкое увеличение значений активности рассматриваемых лабораторных показателей.

Активность АЛТ на фоне ИРП в результате частичной васкулярной эксклюзии в течение 40-ка минут и 3-х часового реперфузионного периода была увеличена в плазме крови в 17 раз, до медианных значений – 668,5 ед/л (таблица 3.1). На фоне введения средств для метаболической коррекции наблюдались несколько сниженные значения активности данной аминотрансферазы, относительно показателя группы сравнения. В 3-й группе сравнения на фоне введения ремаксолола активность АЛТ была ниже показателя крыс 2-й группы на 18 %. Приблизительно в тех же пределах находилась активность аминотрансферазы после введения ремаксолола совместно с дихлорацетатом натрия или карнитином. У крыс 4-й и 7-й групп активность АЛТ была ниже показателя 2-й группы сравнения на 17–22 %. Наиболее значительное отличие от показателя группы сравнения наблюдалось на фоне введения животным 5-й и 6-й групп убихинона и глутатиона соответственно. Так у животных 5-й группы активность АЛТ была на 27 % ниже аналогичного параметра 2-й группы, а у животных 6-й группы – на 32 %.

Таблица 3.1 – Изменения активности АЛТ в плазме крови при ишемии-реперфузии печени крыс на фоне энерготропной коррекции (Ме (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Активность АЛТ, ед/л
1 (контрольная)	38,9 (35,3/40,3)
2 (ИРП без коррекции)	669,0 (640,5/775,8)*
3 (ИРП+ремаксол)	549,5 (529,0/567,8)^
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	524,5 (505,8/562,3)^
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	488,0 (473,5/510,3)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	455,0 (435,0/460,3)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	552,0 (533,3/579,3)^

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: АЛТ – аланинаминотрансфераза, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Изменения активности АСТ во многом повторяли рассмотренные выше изменения активности другой аминотрансферазы – АЛТ. Так на фоне ИРП у крыс 2-й группы отмечались увеличенные в 19 раз значения активности АСТ относительно контроля (рисунок 3.1). Также, как и в случае анализа активности АЛТ, на фоне введения энерготропных средств наблюдались более низкие значения активности рассматриваемого фермента. Наиболее низкие значения активности АСТ среди основных групп лабораторных животных были выявлены в 6-й группе крыс, получавших ремаксол и глутатион. В плазме крови животных этой группы активность анализируемой аминотрансферазы была ниже показателя группы сравнения на 32 %. Похожий результат был характерен для 5-й группы животных, у которых в плазме крови активность аналогичного маркера была снижена относительно 2-й группы на 30 %. Для остальных групп лабораторных животных были характерны приблизительно одинаковые значения активности АСТ – на 21–23 % ниже уровня показателя группы сравнения.

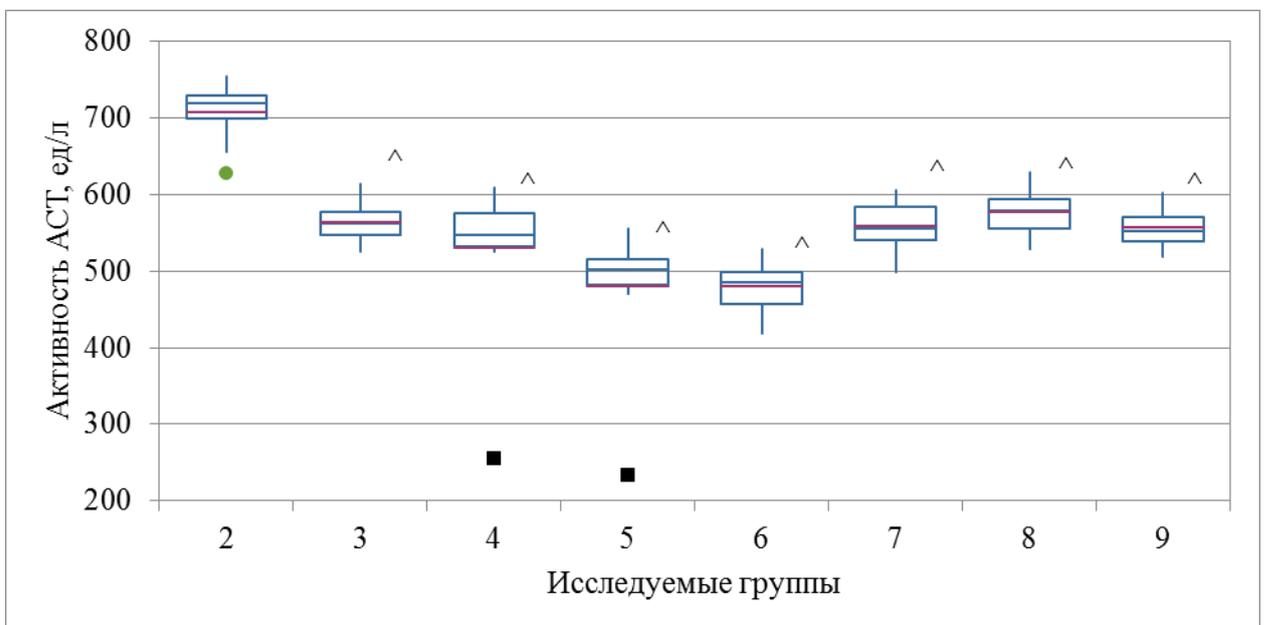


Рисунок 3.1 – Изменения активности АСТ в плазме крови при ишемии-реперфузии печени крыс на фоне энерготропной коррекции (Ме (P25/P75)).

Примечание: ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

Изменения активности ЛДГ подтвердили описанные выше данные, изменения активности аминотрансфераз. На фоне ИРП увеличение активности анализируемого фермента достигало 8,3 раз, а на фоне метаболической коррекции были зарегистрированы сниженные значения, но в меньшей степени, чем для АЛТ и АСТ (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Изменения активности ЛДГ в плазме крови при ишемии-реперфузии печени крыс на фоне энерготропной коррекции (Ме (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Активность ЛДГ, ед/л
1 (контрольная)	157,3 (146,0/168,0)
2 (ИРП без коррекции)	1336,5 (1274,5/1480,0)*
3 (ИРП+ремаксол)	1280,5 (1176,3/1356,3)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	1129,5 (1002,3/1188,8)
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	1034,0 (965,8/1125,5)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	936,5 (885,8/1018,0)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	1255,0 (1181,5/1304,0)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

На фоне введения ремаксола, а также ремаксола и карнитина одновременно не было выявлено статистически значимых изменений активности ЛДГ относительно показателя 2-й группы крыс. Введение ремаксола совместно с дихлорацетатом натрия способствовало меньшему росту активности ЛДГ на фоне ИРП – на 14 % ниже показателя группы сравнения. Еще более низкие значения активности ЛДГ были определены в плазме крови животных 5-й группы – на 22 % ниже показателя группы сравнения. Наиболее низкие значения активности ЛДГ, как и для

аминотрансфераз, были определены на фоне сочетанного введения ремаксола и глутатиона. У крыс 6-й группы уровень активности рассматриваемого фермента в плазме крови был на 29 % ниже уровня аналогичного параметра животных 2-й группы.

Выявленные наиболее низкие значения активности ферментов-маркеров цитолитического синдрома у крыс 5-й и 6-й групп, которым вводили ремаксол совместно с убихиноном или глутатионом, обусловили необходимость формирования 2-х дополнительных групп лабораторным животным, которым на фоне моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени вводили только апробируемые антиоксиданты. Это необходимо для решения вопроса изолированного действия антиоксидантов, которое могло превосходить эффективность ремаксола. Тем не менее определение активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в плазме крови животных 8–9-й групп показало наличие цитопротективного действия аналогичного действию ремаксола. Дальнейшие исследования состояния системы антиоксидантной защиты и энергообмена в крови и печени животных 8–9-й групп не были выполнены, так как достаточно было оценки уровня цитолиза гепатоцитов для вывода о синергетическом действии ремаксола, убихинона и глутатиона.

3.2. Оценка изменений окислительного метаболизма в крови при ишемии-реперфузии печени и проведении энерготропной коррекции

Для оценки состояния окислительного гомеостаза на системном уровне проводили определение общей антиоксидантной активности железо-восстанавливающим методом и способом оценки радикальной сорбции. Оценка данного интегрального показателя состояния системы антиоксидантной защиты показала сниженные ее значения на 20 % после ИРП в течение 40 минут частичной васкулярной эксклюзии и 180 минут реперфузии (рисунок 3.2).

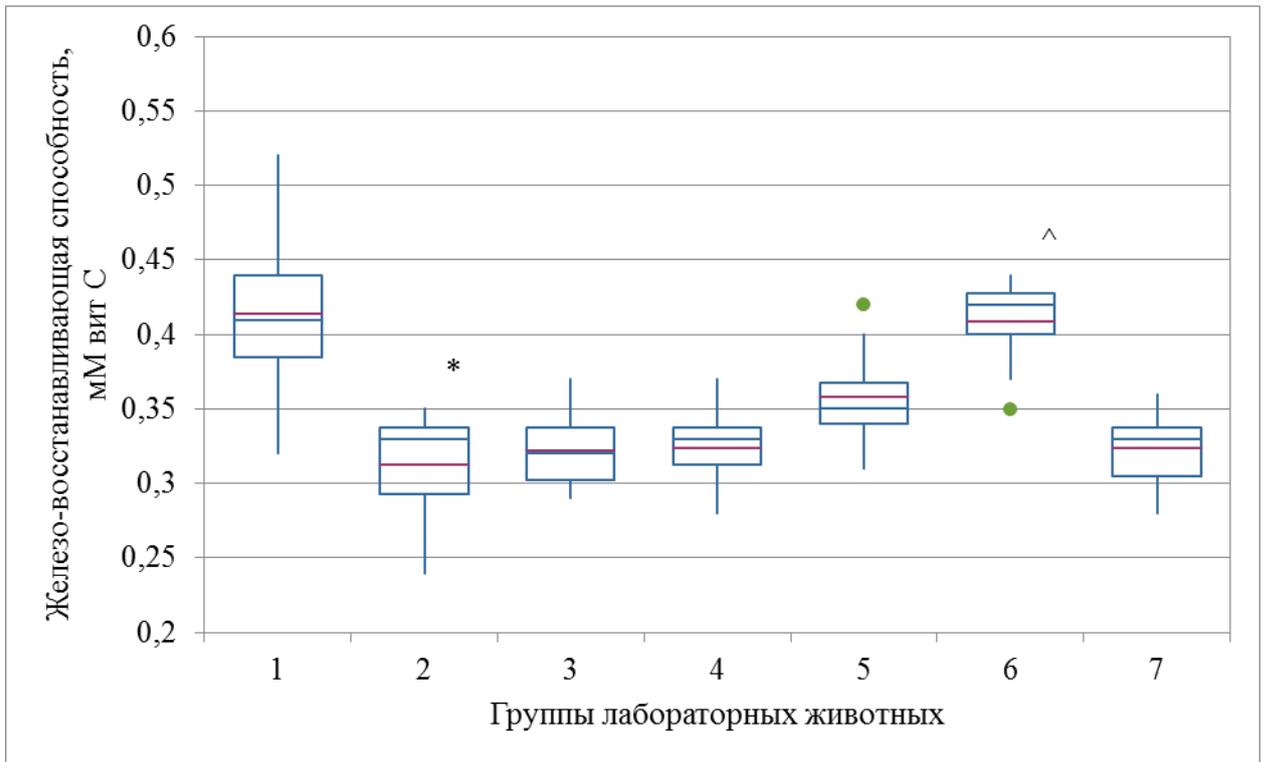


Рисунок 3.2 – Изменения железо-восстанавливающей способности плазмы крови крыс при ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).
Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

На фоне проведения метаболической коррекции было определено статистически значимое увеличение железо-восстанавливающей способности плазмы крови животных только 6-й группы, получавшей ремаксол совместно с глутатионом. В этом случае антиоксидантная активность была не только выше уровня показателя сравнения, но и не отличалась от контрольного значения соответствующего параметра. В остальных опытных группах лабораторных животных уровень рассматриваемого показателя оставался ниже контрольных цифр, как и во 2-й группе сравнения, на 15–22 %, несмотря на использование средств энерготропной направленности действия (рисунок 3.2).

Определение общей антиоксидантной активности способом оценки сорбции катионного радикала ABTS показала схожие результаты с данными, полученными предыдущей методикой. Так после частичной ишемии

печеночной ткани в течение 40 минут и 3-х часового реперфузионного периода уровень анализируемого параметра был ниже контроля на 22 % (таблица 3.3). Более высокие цифры, чем во 2-й группе сравнения, были получены только при превентивном введении крысам 5-й группы ремаксола и убихинона, а также крысам 6-й группы ремаксола и глутатиона. При этом в обоих случаях уровень способности радикальной сорбции оставался ниже контроля. В плазме крови крыс 5-й группы данный показатель был на 16 % ниже контроля, а в плазме крови животных 6-й группы – на 10 %.

Таблица 3.3 – Изменения способности сорбировать радикал АВТS плазмой крови крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Ме (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Общая АОА-АВТS, мМ вит С
1 (контрольная)	0,50 (0,49/0,52)
2 (ИРП без коррекции)	0,39 (0,36/0,40)*
3 (ИРП+ремаксол)	0,37 (0,36/0,39)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	0,38 (0,36/0,40)
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	0,42 (0,40/0,44)
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	0,45 (0,44/0,48)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	0,40 (0,37/0,42)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: АОА – антиоксидантная активность, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Определение уровня тиоловых групп белков плазмы крови показала схожие результаты с оценкой общей антиоксидантной активности. Так уровень тиоловых групп в плазме крови крыс 2-й группы после ишемически-реперфузионного поражения печени был ниже контрольного показателя на 19 % (рисунок 3.3). Для остальных групп лабораторных животных были

характерны несколько более высокие цифры. Однако, значение содержания SH-групп белков плазмы крови статистически значимо отличалось от уровня аналогичного показателя 2-й группы сравнения только у крыс 6-й группы. У животных 6-й группы, получавших ремаксол и глутатион, уровень тиоловых групп соответствовал контрольному значению аналогичного параметра. Для животных 3–5-й, а также 7-й групп были характерны сниженные относительно контроля значения содержания SH-групп в плазме крови на 13–16 %.

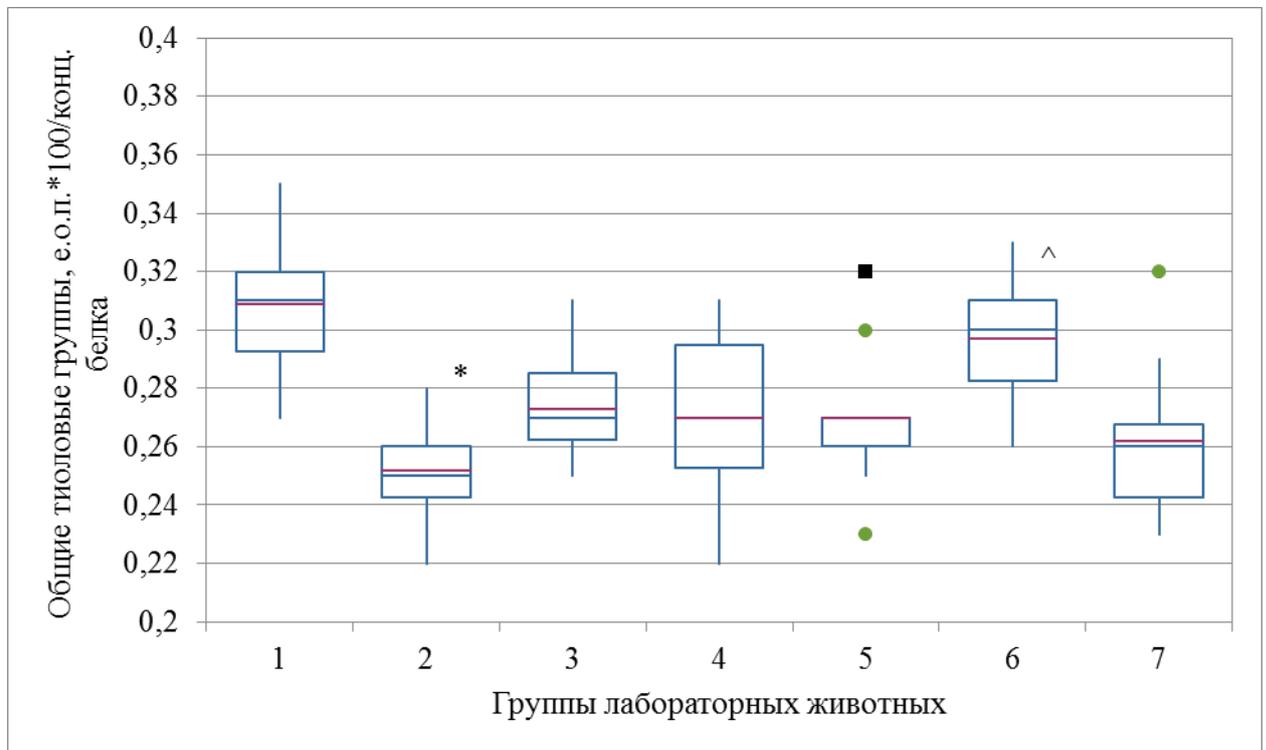


Рисунок 3.3 – Изменения содержания SH-групп в плазме крови крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

Определение концентрации восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси практически продублировало результаты, полученные в ходе исследования других звеньев системы антиоксидантной защиты, а также маркеров цитолиза гепатоцитов. Ожидаемо на фоне ИРП

концентрация глутатиона снижалась в эритроцитах на 17 %, относительно контроля (таблица 3.4). Проведение метаболической коррекции ни одним из способов, кроме сочетанного введения ремаксола и глутатиона, не способствовало статистически значимо более высоким значениям анализируемого параметра. Только у крыс 6-й группы, которые перед моделированием ИРП получали ремаксол и восстановленный глутатиона одновременно, концентрация рассматриваемого метаболита эритроцитарной взвеси превышала значения соответствующего параметра 2-й группы сравнения на 12 %. Однако и в данной группе уровень трипептида гамма-глутамилцистеинилглицина была ниже контрольных цифр на 8 %.

Таблица 3.4 – Изменения концентрации глутатиона в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Ме (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Концентрация глутатиона, мкмоль/мл
1 (контрольная)	2,46 (2,42/2,51)
2 (ИРП без коррекции)	2,04 (1,98/2,11)*
3 (ИРП+ремаксол)	2,08 (2,02/2,14)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	2,14 (2,05/2,19)
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	2,15 (2,07/2,21)
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	2,29 (2,25/2,38)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	2,10 (2,04/2,16)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Более детальный анализ состояния системы антиоксидантной защиты включал определение активности компонентов ее ферментативного звена: каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Каталазная

активность на фоне ИРП была существенно снижена и составляла только 57 % от контрольного уровня (рисунок 3.4).

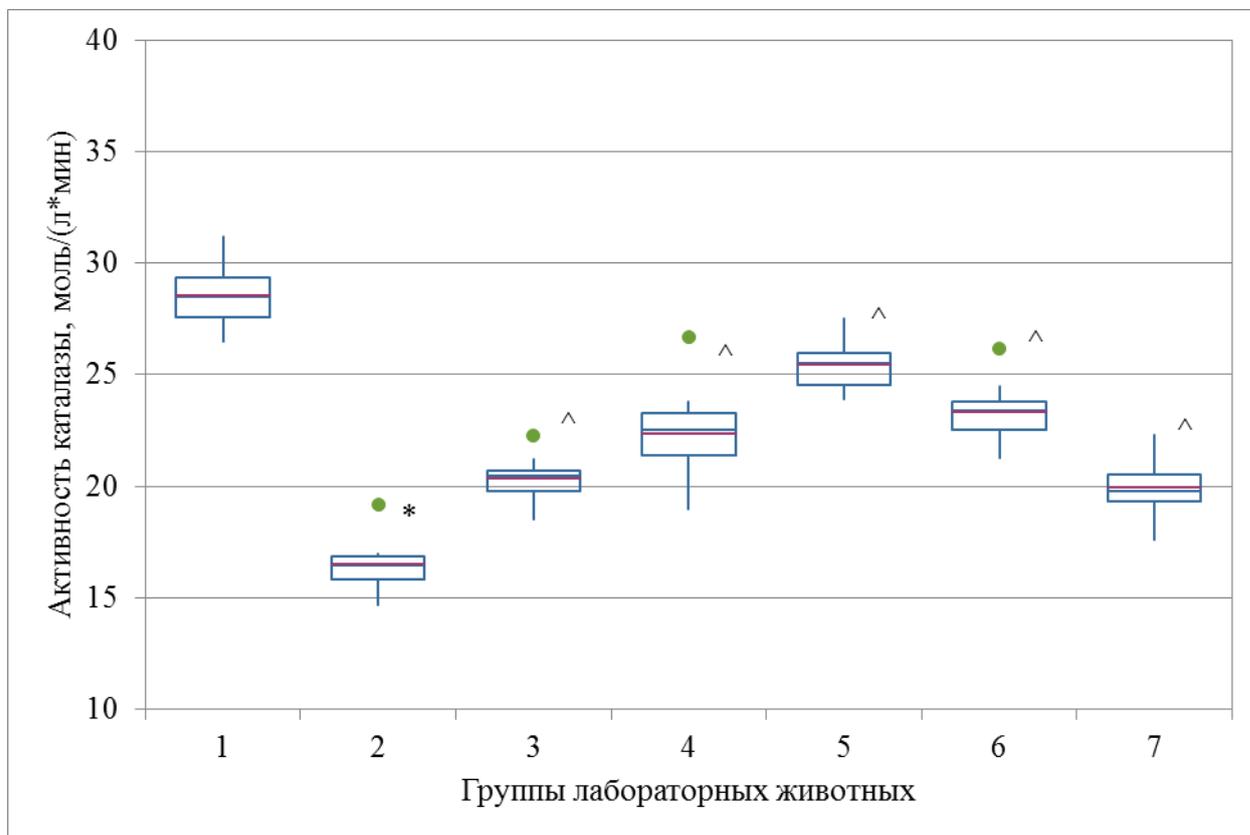


Рисунок 3.4 – Изменения активности каталазы в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

На фоне метаболической коррекции ишемически-реперфузионных нарушений наблюдались более высокие значения активности рассматриваемого фермента. На фоне введения ремаксолола или ремаксолола вместе с карнитином каталазная активность была выше, чем во 2-й группе сравнения, на 21–25 %. Совместное введение ремаксолола с дихлорацетатом натрия или восстановленным глутатионом характеризовалось значением активности анализируемого фермента антиоксидантной защиты на 38–43 % выше уровня показателя 2-й группы сравнения. Наиболее высокие значения каталазной активности были определены в эритроцитарной взвеси крыс 5-й

группы на фоне совместного введения ремаксола и убихинона. В этой группе лабораторных животных рассматриваемый показатель на 55 % превышал значение соответствующего параметра группы животных, которым не проводилась коррекция. В тоже время и в этом случае активность каталазы оставалась сниженной относительно контроля на 11 %.

Активность глутатионпероксидазы изменялась аналогично каталазной активности. На фоне ИРП активность данного фермента в эритроцитарной взвеси была ниже уровня контрольного показателя на 38 % (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Изменения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Ме (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Активность ГПО, ммоль/(л*мин)
1 (контрольная)	320 (305/337)
2 (ИРП без коррекции)	200 (192/206)*
3 (ИРП+ремаксол)	235 (215/243)^
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	239 (230/248)^
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	275 (268/291)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	260 (248/263)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	228 (221/234)^

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ГПО – глутатионпероксидаза, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

На фоне проведения коррегирующих мероприятий глутатионпероксидазная активность имела тенденцию к более высоким значениям, чем у крыс 2-й группы сравнения. Наиболее высокие значения активности фермента были также характерны для группы животных, которым вводили ремаксол сочетано с коэнзимом Q. Для этой группы

животных были характерны значения активности глутатионпероксидазы на 38 % выше уровня показателя группы сравнения. Близкие значения активности фермента были характерны для группы крыс, которым вводили ремаксол и глутатион. В эритроцитарной взвеси 6-й группы крыс уровень данного показателя превышал значение параметра группы сравнения на 30 %. Для остальных групп крыс были характерны более низкие значения глутатионпероксидазной активности, превышающие уровень 2-й группы сравнения на 14–20 %.

Активность глутатионредуктазы в меньшей степени зависела от проведения метаболической профилактики ишемически-реперфузионного повреждения печени. При этом на фоне экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени активность этого фермента была также ниже контрольного уровня на 30 % (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Изменения активности глутатионредуктазы в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Активность ГР, ммоль/(л*мин)
1 (контрольная)	255 (244/271)
2 (ИРП без коррекции)	178 (168/188)*
3 (ИРП+ремаксол)	195 (184/203)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	191 (179/195)
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	204 (195/219)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	190 (186/194)
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	192 (186/202)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ГР – глутатионредуктаза, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Проведение коррекции с использованием ремаксола и убихинона сопровождалось статистически значимым ростом активности глутатионредуктазы, достигающим 15 % от уровня показателя 2-й группы сравнения. На фоне введения других энерготропных средств активность анализируемого фермента была ниже контрольных значений соответствующего параметра на 24–25 % и статистически значимо не отличалась от уровня показателя группы крыс, не получавших никакой коррекции.

В качестве традиционных маркеров окислительного стресса использовали показатели, характеризующие накопление продуктов окислительных модификаций биомолекул. В качестве таких продуктов перекисного окисления липидов было определено в эритроцитарной взвеси содержание ТБК-реактивных продуктов, основной среди которых – малоновый диальдегид, а в качестве продукта окисления белков было определено содержание остатков битирозина в плазме крови. В результате оценки содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси животных после моделирования ИРП было установлено увеличение данного параметра в 4,6 раза относительно контроля (рисунок 3.5). В результате проведения метаболической коррекции по любой из предложенных схем наблюдался более низкий уровень тиобарбитурового числа. Снижение данного показателя в среднем составляло 13–35 % от уровня параметра крыс 2-й группы сравнения. Наиболее заметное снижение относительно группы сравнения было зафиксировано при определении содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитах животных 5-й и 6-й групп, составившее 30–35 %. При этом уровень рассматриваемого показателя крыс 5–6-й групп оставался существенно выше контроля – в 3,0–3,2 раза. Коррекция с использованием изолированного введения ремаксола, введения ремаксола совместно с дихлорацетатом натрия или карнитином сопровождалась сниженными значениями уровня ТБК-реактивных продуктов относительно группы сравнения на 13–19 %.

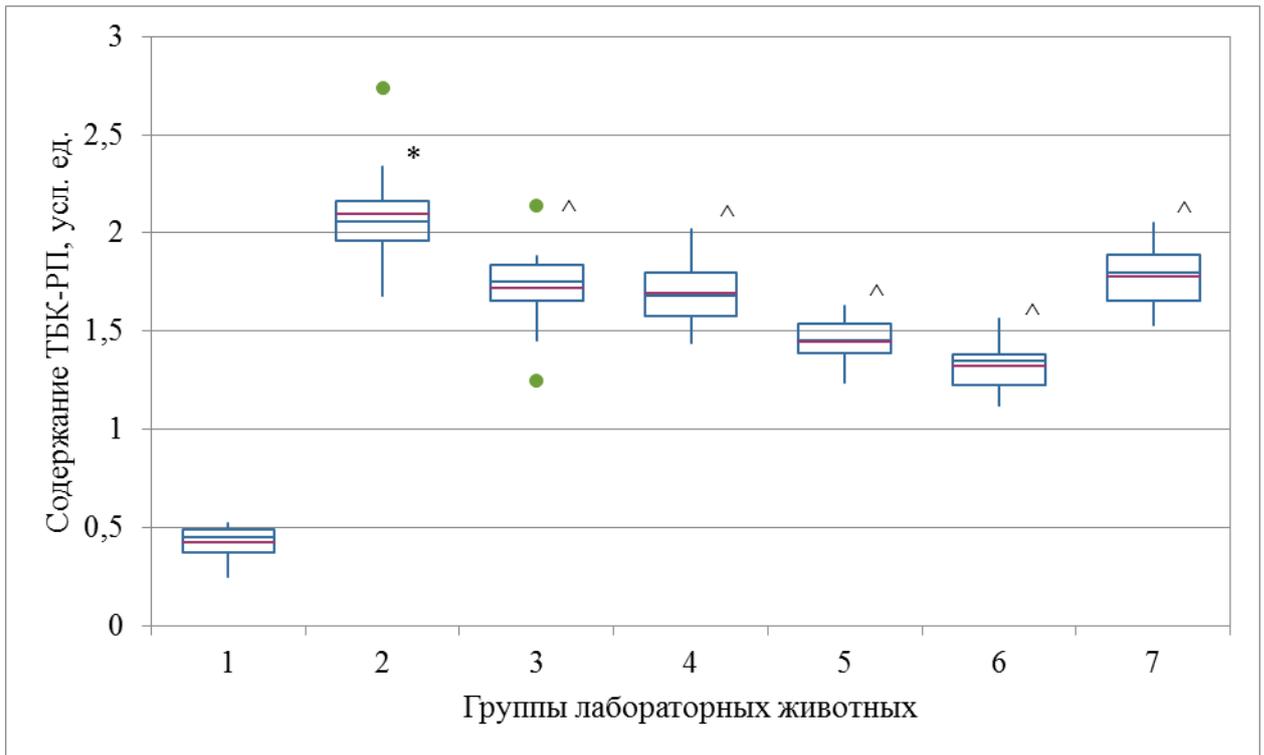


Рисунок 3.5 – Изменения содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).
Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

Оценка содержания остатков битирозина в плазме крови оказалась не такой информативной, как остальные вышеперечисленные маркеры окислительного стресса и состояния системы антиоксидантной защиты. Тем не менее и в этом случае были выявлены статистически значимые отличия между разными группами крыс. Так в условии моделирования ишемии-реперфузии печени у крыс без проведения коррекции было определено увеличенное на 36 % содержание остатков битирозина – продукта окислительных модификаций белков (таблица 3.7). Введение ремаксола, ремаксола совместно с дихлорацетатом натрия или карнитином не сопровождалось какими-либо статистически значимыми изменениями анализируемого параметра относительно группы сравнения. Введение ремкксола совместно с восстановленным глутатионом или убихиноном наоборот характеризовалось более низкими значениями содержания остатков

битирозина – статистически значимо не отличающимся от контрольного уровня данного показателя.

Таблица 3.7 – Изменения содержания битирозина в плазме крови крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Содержание битирозина, усл. ед.
1 (контрольная)	0,11 (0,10/0,12)
2 (ИРП без коррекции)	0,15 (0,14/0,16)*
3 (ИРП+ремаксол)	0,14 (0,13/0,15)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	0,13 (0,11/0,14)
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	0,12 (0,11/0,13)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	0,12 (0,10/0,12)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	0,14 (0,13/0,15)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Данные, представленные в этой главе, показали возможность коррекции ишемически-реперфузионных повреждений печени с использованием энерготропного средства – ремаксола, а также возможность усиления эффекта последнего за счет комбинации его с веществами различной направленности действия. Особенно эффективной оказалась комбинация использования ремаксола с убихиноном или восстановленным глутатионом. Такие промежуточные выводы подтверждены оценкой маркеров цитолиза гепатоцитов, маркеров окислительного стресса и состояния системы антиоксидантной защиты на системном уровне – в крови. Для более подробного описания эффективности использования

метаболической коррекции необходима оценка локальных изменений маркеров окислительного стресса в гомогенате печени, что будет рассмотрено в следующей главе.

ГЛАВА 4
ВЛИЯНИЕ ЭНЕРГОТРОПНОЙ КОРРЕКЦИИ
НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ
В УСЛОВИИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО
ПОВРЕЖДЕНИЯ

Оценка влияния энерготропной терапии на развитие и течение ишемически-реперфузионного синдрома при васкулярной эксклюзии печени не является полной без характеристики изменений на местном уровне – в ткани печени. В предыдущей главе представлены данные, отражающие изменения на системном уровне – в крови, которые позволяют сформировать общую картину эффективности действия тех или иных средств, а также связи изменений маркеров цитолиза и маркеров окислительного стресса. Тем не менее данные, характеризующие состояние окислительного гомеостаза непосредственно в печени могут быть более полезными при более подробном описании механизма действия прямых или косвенных антиоксидантов. Поэтому в данной главе представлены результаты исследований состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса в гомогенате печени животных в условиях ишемически-реперфузионного повреждения печеночной паренхимы.

Определение концентрации молочной кислоты (лактата) в гомогенате печени показало увеличенные значения этого показателя после ишемии-реперфузии (рисунок 4.1). Без проведения метаболической коррекции уровень концентрации лактата достигал 2, 3 уровня контрольного показателя. На фоне проведения энерготропной коррекции лактат в ткани печени накапливался в меньшем количестве. Так концентрация молочной кислоты в печени на фоне ремаксола, ремаксола вместе с убихиноном или карнитином превышала контрольные цифры в 1,7–1,8 раза. На фоне введения ремаксола совместно с глутатионом концентрация лактата в печени была в 1,6 раза выше контроля, а наиболее низкие значения содержания молочной кислоты

были определены после ИРП и предварительного введения ремаксола и дихлорацетата натрия. В печени крыс 4-й группы уровень анализируемого показателя превышал контрольные значения аналогичного параметра на 46 % и был на 37 % ниже уровня параметра группы сравнения.

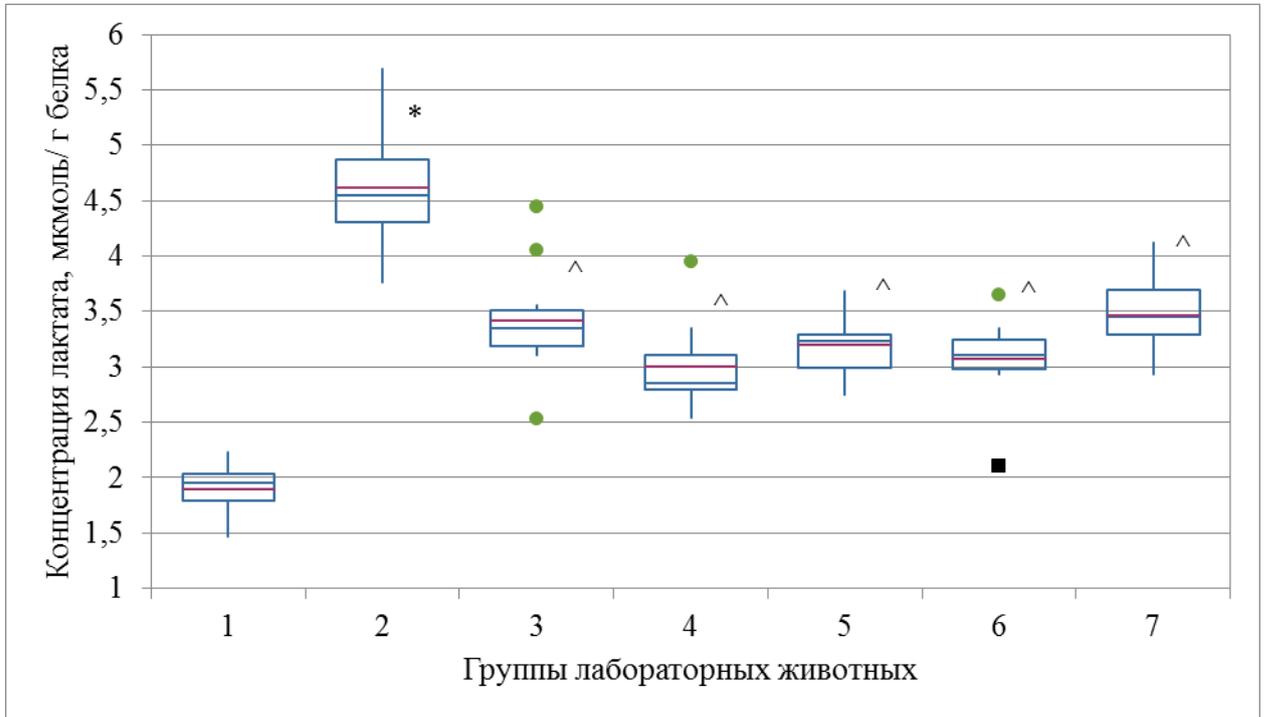


Рисунок 4.1 – Изменения содержания концентрации лактата в печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

Концентрация пировиноградной кислоты после экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печеночной паренхимы также, как и концентрация лактата, увеличивалась. После ишемии-реперфузии без проведения коррекции уровень накопления пирувата в ткани печени превышал контрольные значения аналогичного параметра на 60 % (таблица 4.1). Проведение метаболической терапии с использованием средств энерготропной направленности действия не оказывало существенного влияния на анализируемый показатель. Только совместное

введение ремаксола и дихлорацетата натрия способствовало статистически значимо более низкому уровню концентрации пирувата в гомогенате печени по сравнению с показателем группы сравнения. В печени крыс 4-й группы уровень пировиноградной кислоты был ниже показателя 2-й группы на 22 %, но все же превышал контрольные значения на 25 %.

Таблица 4.1 – Изменения содержания концентрации пирувата в печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Ме (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Концентрация пирувата, мкмоль/г белка
1 (контрольная)	0,20 (0,18/0,22)
2 (ИРП без коррекции)	0,30 (0,29/0,33)*
3 (ИРП+ремаксол)	0,34 (0,32/0,35)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	0,25 (0,23/0,26)^
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	0,33 (0,31/0,35)
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	0,30 (0,28/0,32)
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	0,35 (0,32/0,35)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Оценка продукции АФК в гомогенате печени закономерно показало резкий рост данного показателя после моделирования ишемически-реперфузионного повреждения (рисунок 4.2). Более чем в 3 раза (в 3,15 раза) вырос данный показатель в ткани печени лабораторных животных 2-й группы. Введение ремаксола совместно с дихлорацетатом натрия не способствовало каким-либо статистически значимым изменениям рассматриваемого показателя. На фоне введения остальных энерготропных средств наблюдалось небольшое снижение генерации АФК при сравнении с

показателем 2-й группы. На фоне самостоятельного введения ремаксола или введения его совместно с карнитином уровень продукции АФК превышал контрольные цифры в 2,6–2,7 раза. Более низкий уровень генерации свободных радикалов наблюдался после введения ремаксола вместе с убихиноном или восстановленным глутатионом. В этом случае анализируемый параметр превышал контрольные цифры в 2,2–2,3 раза или был ниже параметра группы сравнения на 28–32 %.

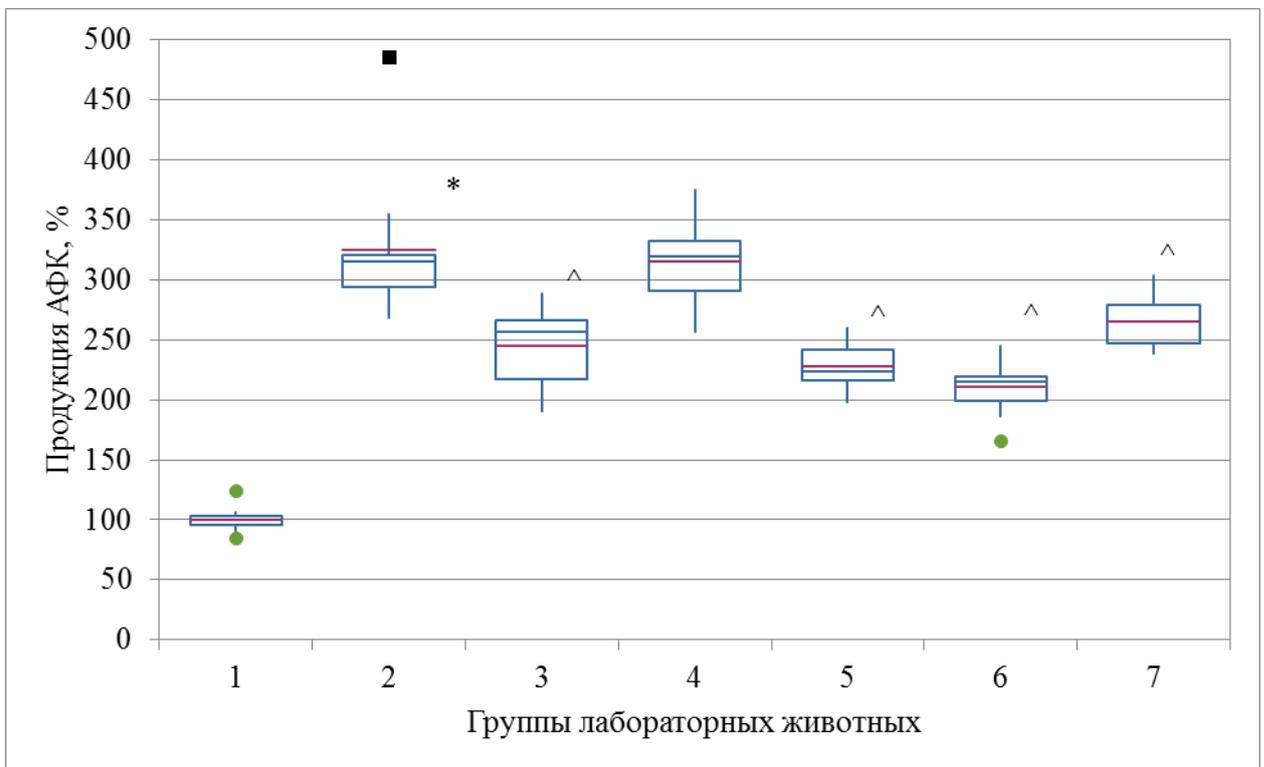


Рисунок 4.2 – Изменения интенсивности продукции активных форм кислорода в печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

Другим, связанным с маркерами окислительного стресса, является показатель способности сорбции катионного радикала АВТS. Данный показатель, который можно также рассматривать как общую антиоксидантную активность, достоверно снижался после моделирования ИРП в ткани печени животных всех групп сравнения и опытных групп.

Наиболее заметное снижение способности сорбции радикалов было определено в гомогенате печени крыс 2-й группы – на 56 % относительно контроля (таблица 4.2). Проведение коррекции с использованием ремаксола, а также дихлорацетата натрия и карнитина, сопровождалось более высокими значениями анализируемого маркера, превышающими показатель 2-й группы сравнения на 23–31 %. Более выраженный рост относительно группы крыс, не получавшей метаболической коррекции, был зафиксирован при использовании ремаксола с глутатионом или убихиноном. В этом случае показатель сорбции радикала ABTS в гомогенате печени был на 49–60 % выше, но оставался статистически значимо ниже контрольного уровня.

Таблица 4.2 – Изменения способности сорбции радикала ABTS гомогенатом печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	АОА-ABTS, мМ аскорбиновой кислоты/г белка
1 (контрольная)	1,35 (1,29/1,37)
2 (ИРП без коррекции)	0,65 (0,61/0,75)*
3 (ИРП+ремаксол)	0,84 (0,77/0,90)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	0,80 (0,75/0,86)
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	0,97 (0,93/1,02)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	1,04 (0,96/1,10)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	0,85 (0,79/0,88)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: АОА – антиоксидантная активность, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Концентрация глутатиона в гомогенате печени изменялась после ИРП и проведения метаболической коррекции аналогично рассмотренному выше

параметру способности радикальной сорбции. Так после частичной ишемии-реперфузии печеночной ткани наблюдалось снижение концентрации восстановленной формы глутатиона в 2 раза (рисунок 4.3). На фоне введения исследуемых препаратов антиоксидантной и энерготропной направленности действия были определены более высокие значения концентрации анализируемого метаболита окислительного гомеостаза. Введение ремаксола совместно с дихлорацетатом натрия или карнитином, а также самостоятельное введение ремаксола характеризовалось увеличенными на 13–22 % значениями концентрации глутатиона относительно 2-й группы сравнения. Для лабораторных животных 5–6-й экспериментальных групп были характерны увеличенные на 33–50 % значения аналогичного показателя относительно 2-й группы.

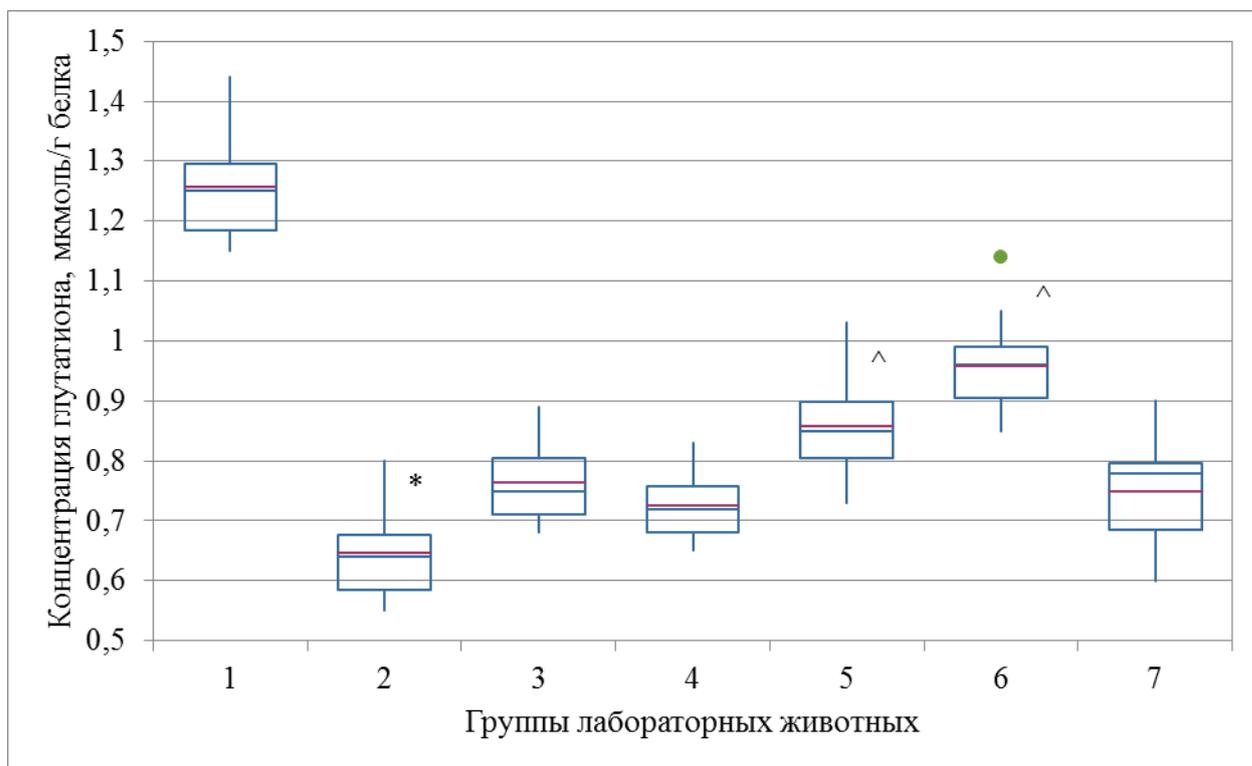


Рисунок 4.3 – Изменения концентрации глутатиона в печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

Каталазная активность гомогената печени после ИРП была увеличена, что отличалось этот показатель от изменений в крови. Так у крыс 2-й группы в гомогенате печени уровень каталазной активности был увеличен на 52 % относительно контрольных цифр (таблица 4.3). При этом проведение экспериментальной терапии оказывало не такое значительное влияние на этот маркер, как на рассмотренные выше. В частности, в гомогенате печени лабораторных животных 3-й, 4-й и 7-й групп уровень каталазной активности не отличался от значения аналогичного показателя 2-й группы сравнения. Только на фоне введения ремаксола с коэнзимом Q или восстановленным глутатионом активность рассматриваемого фермента несколько снижалась относительно параметра 2-й группы. Так каталазная активность в гомогенате крыс 5–6-й групп превышала контрольные значения соответствующего показателя на 26–28 %.

Таблица 4.3 – Изменения активности каталазы в печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Активность КАТ, моль/(л*мин)
1 (контрольная)	14,8 (14,5/15,2)
2 (ИРП без коррекции)	22,5 (20,8/22,6)*
3 (ИРП+ремаксол)	23,0 (21,8/23,3)
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	21,4 (20,3/22,3)
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	18,6 (17,6/19,3)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	19,1 (18,5/19,8)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	21,7 (20,2/22,3)

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: КАТ – каталаза, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Активность глутатионпероксидазы в гомогенате печени снижалась на фоне моделирования патологического процесса. У крыс 2-й группы снижение данного показателя относительно контроля составляло 41 %, для животных других групп были характерны более высокие значения ферментативной активности (таблица 4.4). Так на фоне введения ремаксола животным 3-й группы или ремаксола совместно с дихлорацетатом натрия, карнитином активность анализируемого фермента была на 24–32 % выше уровня 2-й группы сравнения. Введение антиоксидантов убихинона или глутатиона вместе с ремаксолом способствовало еще более высоким значениям глутатионпероксидазной активности – на 49–58 % выше значения соответствующего параметра крыс 2-й группы.

Таблица 4.4 – Изменения активности глутатионпероксидазы в печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Активность ГПО, ммоль/(л*мин)
1 (контрольная)	15,7 (14,8/17,2)
2 (ИРП без коррекции)	9,1 (8,6/10,0)*
3 (ИРП+ремаксол)	11,3 (11,2/12,0)^
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	12,0 (11,3/12,4)^
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	13,6 (13,2/14,4)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	14,4 (13,9/15,2)^
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	11,8 (11,4/12,4)^

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ГПО – глутатионпероксидаза, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Активность глутатионредуктазы в гомогенате печени крыс изменялась похожим образом. На фоне моделирования патологического процесса – ишемии-реперфузии печени активность данного фермента была снижена на

24 % относительно контроля (таблица 4.5). Проведение коррекции способствовало более высокой активности рассматриваемого фермента, кроме, использования самого восстановленного глутатиона. Так у животных 3-й и 7-й групп глутатионредуктазная активность была на 18–24 % выше значения соответствующего параметра животных 2-й группы. Наиболее высокие значения активности данного фермента, соответствующие контрольному уровню, были обнаружены в гомогенате печени крыс 4-й и 5-й групп. Для животных 6-й группы было характерно значение активности глутатионредуктазы, сниженное относительно контроля на 19 % и статистически значимо не отличающееся от значения аналогичного параметра крыс 2-й группы сравнения.

Таблица 4.5 – Изменения активности глутатионредуктазы в печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Ме (P₂₅/P₇₅))

Группы лабораторных животных	Активность ГР, ммоль/(л*мин)
1 (контрольная)	41,2 (40,3/42,2)
2 (ИРП без коррекции)	31,1 (30,6/32,2)*
3 (ИРП+ремаксол)	38,7 (38,2/39,5)^
4 (ИРП+ремаксол+ДХА)	42,3 (41,6/42,9)^
5 (ИРП+ремаксол+КоQ)	40,6 (39,9/41,1)^
6 (ИРП+ремаксол+GSH)	33,4 (33,0/36,3)
7 (ИРП+ремаксол+карнитин)	36,8 (36,6/37,9)^

Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы. Обозначения: ГР – глутатионредуктаза, ДХА – дихлорацетат натрия, КоQ – убихинон, GSH – восстановленный глутатион.

Среди маркеров окислительных повреждений биомолекул в гомогенате печени лабораторных животных определяли содержание ТБК-реактивных продуктов, образующихся в ходе перекисного окисления липидов клеточных

мембран. В результате проведенных исследований было установлено значительное увеличение данного параметра в паренхиме печени крыс, подвергавшихся моделированию ишемически-реперфузионного повреждения левой боковой и центральной долей органа. В гомогенате животных 2-й группы уровень ТБК-реактивных продуктов статистически значимо превышал значение соответствующего показателя контрольной группы в 8 раз (рисунок 4.4).

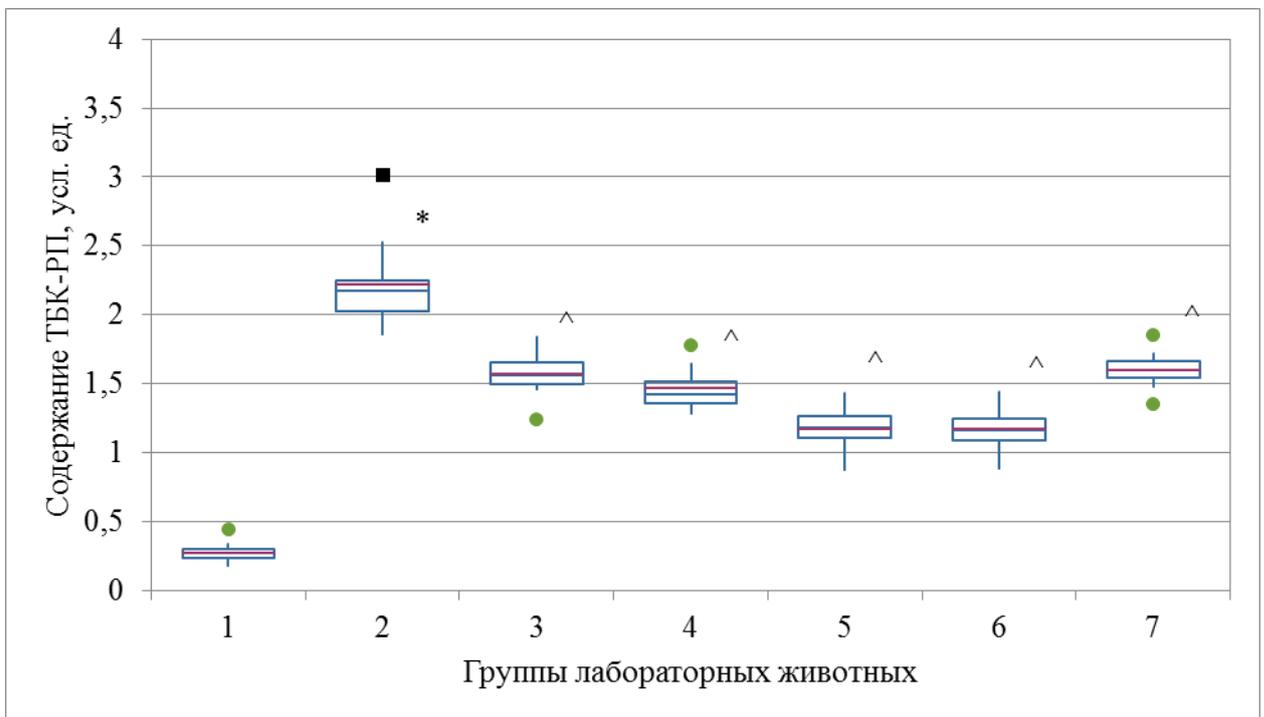


Рисунок 4.4 – Изменения содержания ТБК-реактивных продуктов в ткани печени крыс после ишемии-реперфузии печени на фоне энерготропной коррекции (Me (P25/P75)).
Примечание: * – статистически значимые отличия при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; ^ – статистически значимые отличия при сравнении с показателем 2-й группы.

Превентивное введение средств для метаболической коррекции способствовало более низкому уровню накопления продуктов перекисного окисления липидов в гомогенате печени после ишемии-реперфузии. Так на фоне введения ремаксола уровень содержания ТБК-реактивных продуктов был ниже значения соответствующего показателя 2-й группы сравнения на 28 %. Модификация состава ремаксола дополнительным введением

карнитина не способствовала усилению его эффекта. Дополнительное введение дихлорацетата натрия сопровождалось сниженным относительно 3-й группы сравнения содержанием продуктов перекисного окисления липидов в гомогенате печени на 10 %. Заметно снижался уровень анализируемого маркера на фоне введения ремаксола совместно с убихиноном или глутатионом – на 46–47 % относительно 2-й группы сравнения.

Анализ данных, полученных при исследовании лабораторных маркеров в гомогенате печени после моделирования ИРП и проведения метаболической коррекции позволил выявить некоторые характерные особенности, отличные от изменений показателей на системном уровне – в крови. Было установлено значительное влияние дихлорацетата натрия на показатели энергообмена – уровень лактата и пирувата в ткани печени. Ключевое влияние на показатели состояния баланса прооксидантно-антиоксидантной системы оказывало дополнительное введение убихинона или восстановленного глутатиона. Ферментные системы, обеспечивающие антиоксидантную защиту, в меньшей степени зависели от типа введения энерготропного средства. Общим промежуточным выводом является возможность усиления эффективности ремаксола за счет введения одного из проанализированных средств, но большей степени за счет убихинона и глутатиона.

ГЛАВА 5

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одной из основных гипотез при планировании и проведении исследования была возможность усиления комбинированного состава ремаксолола за счет дополнительного введения средств энерготропной направленности действия, но с разными механизмами влияния на это звено метаболизма. Сам ремаксолол (РЕМАКСОЛ® (REMAXOL®), ООО «НТТФ «Полисан», Россия, Санкт-Петербург) представляет собой комплекс физиологически активных компонентов (янтарная кислота, метионин, инозин и никотинамид), то есть является уже комбинированным средством, включающим субстраты и коферменты энергетического обмена. Сегодня достаточно хорошо известны его гепатопротекторные эффекты, доказанные в экспериментальных работах и апробированные в клинических исследованиях. Тем не менее на наш взгляд потенциал данного препарата может быть раскрыт еще более широко за счет усиления его состава. В настоящее время имеется большой арсенал средств, оказывающих влияние на отдельные звенья окислительного гомеостаза. Например, на уровень лактатацидоза оказывает мощное влияние дихлорацетат натрия за счет активации пируватдегидрогеназного комплекса и запуска использования молочной и пировиноградной кислот в клетке. Известно большое количество витаминов или витаминоподобных соединений, активные формы которых выполняют функцию кофакторов энергообмена. К таким веществам можно отнести никотинамид, а также убихинон (коэнзим Q). Первый, кроме того входящий в состав ремаксолола, играет роль кофермента дегидрогеназ общих путей катаболизма – окислительного декарбоксилирования пирувата и цикла трикарбоновых кислот. Второй (убихинон) – один из компонентов цепи переноса электронов на внутренней мембране митохондрий, с работой которого связана в том числе генерация АФК в ходе утечки электронов.

Поэтому данное соединение рассматривается и как непосредственно кофактор энергообмена и как мощный антиоксидант. Важным элементов окислительного гомеостаза является продукция и нейтрализация свободных радикалов. Ключевым клеточным регулятором редокс-гомеостаза является трипептид – глутатион, который также может быть использован в качестве лекарственного средства, особенно при парентеральном введении. За счет наличия SH-группы и относительно низкой молекулярной массы этот метаболит обладает наиболее низким редокс-потенциалом и выступает в роли основного антиоксиданта, способного не только самостоятельно нейтрализовать АФК, но и регенерировать поврежденные молекулы и использованные (окисленные) антиоксиданты другой химической природы. Карнитин также рассматривается как важный элемент энергетического обмена, механизм влияния которого заключается в обеспечении транспорта ацильных групп (остатков жирных кислот) в митохондриальный матрикс для использования в ходе β -окисления, самого энергоемкого процесса в клетке. Комбинация ремаксола с вышеописанными соединениями на наш взгляд может обеспечить повышение его эффективности, что было апробировано на экспериментальной модели ишемически-реперфузионного повреждения печеночной паренхимы в ходе выполнения частичной васкулярной эксклюзии путем пережатия сосудистым зажимом ножек, питающих левую боковую и центральную доли печени крыс.

Об эффективности коррекции ишемически-реперфузионного синдрома с использованием средств энерготропной направленности действия судили прежде всего по изменению маркеров цитолитического синдрома в плазме крови. На кафедре фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России тематика исследования ишемии-реперфузии печени в последние 5–7 лет является одной из основных. В ходе таких исследований было показано, что максимальный рост активности АЛТ, АСТ и ЛДГ наблюдается спустя 180 минут после начала реперфузионного периода

после васкулярной эксклюзии печени [К.А. Попов и соавт., 2020]. Поэтому данный временной промежуток был выбран для оценки активности аминотрансфераз и ЛДГ в плазме крови крыс исследуемых групп. В результате проведенных исследований было показано, что ремаксол действительно способен оказывать гепатопротекторное действие на модели ишемии-реперфузии печеночной паренхимы, что выразалось в статистически значимо более низких значениях активности АЛТ и АСТ, на 18–21 % ниже в сравнении с показателями 2-й группы. Такие данные не получится рассматривать как какой-либо успех, поскольку имеется большое количество подходов ишемического или фармакологического preconditionирования, обеспечивающих намного лучший результат. Вероятно, что данный препарат больше подходит для метаболической терапии хронических заболеваний печени. Тем не менее, полученные данные также являются свидетельством возможности и целесообразности модификации состава ремаксолола с целью повышения его эффективности при острых повреждениях печени. По данным анализа изменений активности аминотрансфераз в плазме крови, а также ЛДГ, дополнительное снижение активности цитолитического синдрома наблюдалось при дополнении ремаксолола убихиноном или восстановленным глутатионом. В остальных случаях результат был аналогичен использованию только ремаксолола у животных 3-й группы сравнения. Причем снижение активности АЛТ и АСТ в плазме крови животных 5-й и 6-й групп достигало 27–32 % при сравнении со значением параметра 2-й группы лабораторных животных. Также только в этих экспериментальных группах (5-й и 6-й) было определено статистически значимое снижение уровня ЛДГ. Несколько более низкая активность ЛДГ в плазме крови крыс 4-й группы, по сравнению со 2-й группой, может быть объяснена потенциальной способностью самого дихлорацетата конкурентно ингибировать фермент, являясь структурным аналогом пирувата или лактата. Нами не было получено прямых доказательств этого явления, но имеется ряд косвенных эффектов, свидетельствующих о такой возможности.

Определение активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в плазме крови животных 8–9-й групп (животные, которым вводили только убихинон или глутатион без ремаксола) показало наличие цитопротективного действия аналогичного действию ремаксола. Это позволило сделать вывод о синергетическом действии совместного введения ремаксола с убихиноном или восстановленным глутатионом.

Дальнейшие исследования состояния системы антиоксидантной защиты и энергообмена в крови и печени животных 8–9-й групп не были выполнены, так как достаточно было оценки уровня цитолиза гепатоцитов для вывода о синергетическом действии ремаксола, убихинона и глутатиона.

Таким образом, собственно основную задачу усиления эффективности ремаксола удалось решить за счет дополнительного использования убихинона или восстановленного глутатиона. Более детальный анализ патобиохимических изменений в крови и ткани печени животных после ишемически-реперфузионного повреждения позволил раскрыть еще ряд особенностей влияния средств энерготропной направленности действия.

Оценка влияния на основные параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса включала определение общей антиоксидантной активности и накопления продуктов окислительных повреждений биомолекул. В результате оценки железо-восстанавливающей способности плазмы крови было показано, что увеличение данного параметра возможно только за счет введения восстановленного глутатиона, что ожидаемо, учитывая его прямую антиоксидантную активность, то есть способность непосредственно выступать в роли восстановителя. Тем не менее отсутствие изменений в других группах, относительно 2-й группы сравнения, свидетельствует о том, что этот маркер вряд ли является основным, а его поддержание не коррелирует с эффективностью коррекции. Оценка способности радикальной сорбции показала более перспективные результаты. В данном случае была отмечена тенденция к росту данного показателя на фоне введения не только

глутатиона, но и убихинона, хотя в остальных случаях уровень рассматриваемого маркера оставался низким. Проявление способности нейтрализации радикалов может быть характерно и для соединений, не обладающих ярко выраженными восстановительными свойствами, поэтому этот показатель может быть более подходящим для прогнозирования эффективности метаболической коррекции.

Определение накопления продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитарной взвеси показало возможность коррекции окислительного стресса с использованием всех изученных энерготропных средств. При этом наибольшая эффективность профилактики образования ТБК-реактивных продуктов была характерна для ремаксолола при введении его с убихиноном или глутатионом. Здесь следует отметить, что необязательно снижение генерации АФК и их повреждающего действия, как и повышение антиоксидантной активности, оказывает протективное действие в условиях ишемически-реперфузионных повреждений органов. Известно, что АФК могут выступать в роли сигнальных молекул – медиаторов протективного действия ишемического прекондиционирования, в связи с чем использование антиоксидантов совместно с выполнением ишемического прекондиционирования может даже нивелировать его защитные эффекты. Тем не менее в настоящем исследовании наиболее выраженное протективное действие оказывало использование прямого антиоксиданта – глутатиона и косвенного – убихинона.

Определение содержания остатков битирозина – продукта окисления белковых молекул было менее информативным, в сравнении с ТБК-реактивными продуктами. Это было связано, с тем что данный параметр увеличивался на фоне ИРП не в разы, а только на 36 %. Кроме того, использование ремаксолола изолированно или совместно с введением дихлорацетата натрия и карнитина не способствовало статистически значимому снижению данного маркера, а введение ремаксолола с убихиноном

и глутатионом наоборот характеризовалось значением анализируемого параметра в пределах контрольных значений. Вероятно, что этот показатель плохо подходит для оценки тяжести или мониторинга ишемически-реперфузионного синдрома, в том числе контроля эффективности коррекции, хотя он и подтвердил наибольшую эффективность метаболической коррекции, проводимой в 5-й и 6-й группах.

Таким образом, введение ремаксола совместно с убихиноном или глутатионом оказывало наиболее выраженное влияние на развитие ишемически-реперфузионного повреждения печеночной паренхимы у лабораторных животных в эксперименте. Это было подтверждено статистически значимо более низкими значениями активности маркеров цитолитического синдрома и сравнительно менее выраженным дисбалансом прооксидантно-антиоксидантной системы. Тем не менее, более детальный анализ состояния отдельных звеньев системы антиоксидантной защиты крови, позволил определить и особенности влияния других изученных средств энерготропной направленности действия.

Так анализ уровня тиоловых групп белков плазмы крови позволил определить, что только дополнительное введение глутатиона способно поддержать данное звено антиоксидантной системы, повышая уровень данного маркера до контрольного значения соответствующего параметра. Сам трипептид глутатион является тиолсодержащим соединением, однако концентрация его в плазме крови обычно пренебрежимо мала, в том числе после 3-х часов его парентерального введения. Это прежде всего внутриклеточный метаболит. Увеличенные значения содержания SH-групп в этом случае могут быть обусловлены защитой их глутатионом в активной фазе развития ишемически-реперфузионных повреждений в плазме крови. В этом случае защита белковых сульфгидрильных групп низкомолекулярными тиолами заключается во временном образовании между ними дисульфидных связей. Этот процесс в условиях *in vivo* является

обратимым, поэтому по мере снижения концентрации глутатиона в плазме крови, тиоловые группы белков могли высвободиться уже по мере стихания патологического процесса. При этом в самую активную фазу развития патобиохимических нарушений как раз сам глутатион, помимо его защитной роли в отношении SH-групп белков, мог брать основной удар прооксидантных факторов на себя.

Определение концентрации глутатиона в эритроцитарной взвеси показало также снижение этого показателя на фоне ишемии-реперфузии примерно в той же степени, что и изменение уровня тиоловых групп в плазме крови. Это интересное замечание, так как в ряде случаев регистрируется некоторое отставание изменений клеточного / внеклеточного компонентов антиоксидантной системы крови друг от друга. В нашем случае распространение патологического процесса на системном уровне в течение 3-х часов реперфузии позволило в равной степени затронуть оба «компартамента» системы антиоксидантной защиты, что может свидетельствовать также о риске развития более тяжелых полиорганных осложнений. Проведение коррекционных мероприятий только в случае введения экзогенного восстановленного глутатиона способствовало поддержанию концентрации анализируемого метаболита на более высоком уровне, тем не менее не достигающем контрольного. В остальных случаях содержание глутатиона эритроцитарной взвеси оставалось на уровне параметра 2-й группы сравнения. Полученные данные с одной стороны указывают на то, что глутатион мог оказывать эффект усиления гепатопротекторного действия ремаксола за счет поддержки тиолового звена системы антиоксидантной защиты как в плазме крови, так и в эритроцитарной взвеси. С другой стороны, такой же эффект на показатели цитолиза и прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса оказывало введение убихинона совместно с ремаксолом, однако показатели системы глутатиона существенно не изменялись. Возможно, что эти два соединения по-разному реализуют свои цитопротективные эффекты.

Состояние ферментативного звена системы антиоксидантной защиты находилось в большей зависимости от введения средств энерготропной направленности действия. Так активность каталазы, значительно сниженная на 57 % на фоне ИРП в условиях введения ремаксолола и других изученных средств существенно увеличивалась. Причем в данном случае более высокие значения ферментативной активности были характерны не только для введения глутатиона или убихинона, но также дихлорацетата натрия и карнитина. При этом наиболее высокие значения активности каталазы, как глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, то есть всех 3-х изученных ферментов, были характерны для группы крыс, которым вводили убихинон совместно с ремаксололом. Таким образом, основным приложением действия коэнзима Q было ферментативное звено системы антиоксидантной защиты, что также оказывало существенное протективное действие, выражающееся в снижении выраженности цитолиза гепатоцитов, что было уже обозначено выше. Введение ремаксолола, а также его совместное введение с дихлорацетатом натрия или карнитином сопровождалось более высокими значениями каталазной активности в сравнении с параметром 2-й группы. Тем не менее статистически значимых отличий между показателями 3-й, 4-й и 7-й группами выявлено не было. Точно такие же тенденции были выявлены в ходе анализа изменений активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы на фоне ИРП и метаболической коррекции. Единственное, что в последнем случае необычным было то, что активность глутатионредуктазы эритроцитарной взвеси на фоне превентивного введения глутатиона была на том же уровне, что был характерен для групп крыс, получавших ремаксолол совместно с дихлорацетатом натрия, карнитином или самостоятельно. Возможно, что это было результатом субстратного ингибирования на фоне высокой концентрации глутатиона или ингибирования по какому-то другому механизму на фоне отсутствия необходимости адаптивного роста анализируемого фермента в условиях доставки в клетку экзогенного метаболита.

Для более детальной оценки влияния средств энерготропной направленности действия помимо маркеров окислительного метаболизма крови была проведена оценка изменений аналогичных показателей гомогената печеночной ткани в несколько расширенном виде. Характеристика состояния энергетического обмена, а именно соотношения аэробных и анаэробных процессов, была проведена с учетом изменений концентрации молочной кислоты (лактата) и пировиноградной кислоты (пирувата). В результате проведенных исследований было установлено увеличение концентрации лактата и пирувата в ткани печени на фоне ИРП. В большей степени была увеличена концентрация молочной кислоты – в 2,3 раза, против увеличения уровня пирувата в 1,6 раза. Соотношение же лактат / пируват, составлявшее в норме у контрольных крыс 9,8 единиц достигало 14,2 единиц спустя 3 часа после 40-ка минутной частичной ишемии печени. Такие слабовыраженные изменения соотношения лактат / пируват, как и увеличение содержания самой молочной кислоты могут быть объяснены оценкой данных параметров спустя 180 минут после снятия зажимов с печеночной паренхимы. Концентрация лактата – достаточно лабильный маркер, быстро изменяющийся в условиях восстановления аэробного метаболизма, за счет особенно активного потребления печеночной тканью и миокардом. Тем не менее выявленные в исследовании изменения показателей позволили не только охарактеризовать ишемически-реперфузионные нарушения, но и оценить эффективность метаболической коррекции. Концентрация пирувата на фоне введения ремаксола и других энерготропных средств оставалась на том же уровне, что и в группе сравнения без коррекции, кроме 4-й группы. Животные 4-й группы получали дихлорацетат натрия, который как уже было указано является активатором пируватдегидрогеназного комплекса за счет чего интенсифицируется использование в ходе энергетического обмена глюкозы, молочной и пировиноградной кислоты, концентрация которых наиболее выражено

снижается. Это и было показано в настоящем исследовании. Концентрация лактата кроме того была снижена и в других опытных группах крыс относительно показателя 2-й группы, но в меньшей степени, чем при введении ремаксола и дихлорацетата натрия. Интересно, что такое выраженное влияние дихлорацетата на энергетический обмен не способствовало усилению цитопротективного эффекта ремаксола, при то что самостоятельное введение дихлорацетата натрия также способно реализовать защитный эффект при ишемии-реперфузии. Тем не менее более быстрое снижение уровня молочной кислоты на фоне метаболической коррекции вероятно было обязательным условием реализации гепатопротективных эффектов всех групп изученных средств, поскольку это один из немногих изученных маркеров, изменяющихся параллельно активности аминотрансфераз в плазме крови.

Работа с гомогенатом ткани печени позволила оценить интенсивность генерации АФК, которая закономерно возрастала после моделирования ИРП и была сравнительно ниже в условии проведения корректирующих мероприятий, кроме 4-й группы. Наиболее низкий уровень генерации АФК, но все же увеличенный относительно контроля в 2,2–2,3 раза, был определен у животных, получавших ремаксол совместно с убихиноном или глутатионом. Это можно объяснить непосредственно высокой антиоксидантной активностью этих двух веществ, что уже было обсуждено неоднократно выше. Интересным замечанием является также то, что сравнительно высокий уровень продукции АФК на фоне введения ремаксола и дихлорацетата натрия, не был существенной помехой в реализации протективных эффектов по данным изменения маркеров цитолиза гепатоцитов в плазме крови. Мы предполагаем, что в условии активации пируватдегидрогеназного комплекса на фоне ишемии печени может происходить перегрузка дыхательной цепи электронов и преимущественное образование радикальных форм кислорода. Однако, как обсуждалось выше

АФК могут выступать в качестве сигнальных частиц, опосредующих эффекты прекондиционирования.

Изменения способности печеночного гомогената радикальной сорбции не соответствовало изменениям интенсивности генерации АФК. Во всех опытных группах, в том числе 4-й группе крыс, получавших дихлорацетат натрия, и 3-й группе сравнения уровень данного показателя превышал значение аналогичного параметра 2-й группы сравнения. Наиболее высокие значения ожидаемо были получены при введении антиоксидантов – убихинона и глутатиона.

В гомогенате печени отмечалось значительное снижение концентрации восстановленного глутатиона – в 2 раза относительно контроля на фоне ИРП. Конечно локальные изменения в пораженном органе были выражены сильнее, чем выявленные на системном уровне в крови. Но также проведение метаболической коррекции отражалось и на состоянии этого звена системы поддержания внутриклеточного редокс гомеостаза. Причем наиболее выраженное увеличение уровня рассматриваемого метаболита было определено в ткани печени на фоне введения экзогенного глутатиона. Промежуточное положение занимала группа лабораторных животных, которым вводили на фоне ИРП ремаксол с коэнзимом Q. Таким образом, косвенным путем, введение убихинона также обеспечивало поддержание более адекватного функционального состояния системы глутатиона в клетках печени.

Каталазная активность в гомогенате печени имела тенденцию к увеличению после моделирования ишемически-реперфузионного повреждения. Это может быть связано с особой функцией данного фермента при гипоксических состояниях – функцией возвращения кислорода в дыхательную цепь, после утечки его в форме активных форм, таких как супероксидный анион-радикал и пероксид водорода. В эритроцитарной взвеси наблюдались изменения в обратную сторону – тенденция в сторону

снижения активности данного фермента. Поэтому лабораторные исследования крови не всегда адекватно отражают изменения, происходящие на местном уровне – в очаге развития патологического процесса. На фоне проведения метаболической коррекции изменения каталазной активности вероятно неплохо соответствовали тяжести ишемических нарушений, поскольку имели тенденцию к менее выраженному росту на фоне предварительного введения ремаксолола вместе с убихиноном или глутатионом, что также сопровождалось статистически значимо более низким уровнем активности маркеров цитолиза гепатоцитов.

Изменения активности ферментов системы глутатиона имело тенденцию к снижению в гомогенате печени, как и в эритроцитарной взвеси. При этом на фоне проведения метаболической коррекции наблюдались более высокие значения активности глутатионпероксидазы по сравнению со значением аналогичного параметра 2-й группы сравнения. Из особенностей можно выделить максимальные значения данного маркера на фоне введения ремаксолола совместно с убихиноном и глутатионом. Влияние убихинона на ферментные системы эритроцитов и ткани печени уже обсуждалось. Высокая активность глутатионпероксидазы после введения глутатиона может быть обусловлена адекватной подпиткой фермента субстратом, что не просто позволяет поддерживать нормальное функциональное состояние системы глутатиона, но и обезвреживать АФК, органические гидропероксиды – продукты окислительных повреждений липидов и др. Это в конечном итоге обеспечивает снижение проявлений окислительного стресса и цитопротективный эффект на модели ишемии-реперфузии. Особенностью изменений активности глутатионредуктазы является ее низкое значение в гомогенате печени крыс 6-й группы, которым превентивно вводили ремаксолол и глутатион. Такие же изменения были характерны и для эритроцитарной взвеси и как ранее уже указывали это может быть связано с эффектом ингибирования на фоне высокой концентрации восстановленной формы глутатиона, в результате его экзогенного введения.

Проведение анализа изменений биохимических показателей гомогената печени на фоне ишемически-реперфузионного синдрома и метаболической коррекции подтвердило некоторые промежуточные выводы, сформулированные по результатам исследования маркеров цитолиза гепатоцитов и окислительного стресса в крови. Показано, что основной эффект усиления действия ремаксола путем дополнительного введения коэнзима Q или восстановленного глутатиона, связан с их непосредственным антиоксидантным действием. Введение самого глутатиона обеспечивало поддержку системы гомеостаза этого трипептида в клетках печени и снижением продукции АФК. Введение убихинона косвенным путем реализовывало поддержку ферментных систем антиоксидантной системы, что также проявлялось в поддержке системы глутатиона, снижении генерации АФК и повышении общей антиоксидантной активности гомогената печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемические и реперфузионные поражения печени наблюдаются при ее трансплантации и частичной резекции, при пережатии кровеносных сосудов гепатодуоденальной связки во время хирургических операций, при шоке различной этиологии [Любимов А.В., Шабанов П.Д., 2016; A. Grek, L. Arasi, 2016]. Поэтому существенный интерес вызывают фундаментальные аспекты развития и течения метаболических изменений при реперфузии органа, а также способы профилактики развивающихся нарушений. Реперфузионный синдром печени сопровождается дисфункцией микроциркуляторного русла и оксидативным стрессом, приводящим к некрозу и апоптозу гепатоцитов. Важную роль в его патогенезе играют токсические вещества, поступающие в системный кровоток, что обуславливающие общую интоксикацию. Восстановление кровотока не способствует устранению этих изменений, наоборот, ситуация усугубляется повреждающим действием свободных радикалов и цитокинов, поступающих в печень по мере реперфузии [Т. Konishi, A.V. Lentsch, 2017; Гараев Г.Ш., Гафарова Ж.Р., 2018]. Одним из направлений в исследованиях по профилактике поражения гепатоцитов при ишемии-реперфузии печени была попытка использования химических соединений, влияющих на различные стороны патогенеза, лежащих в основе патологического процесса [Н.В. Андрианова и соавт., 2020]. Поиск фармакологических средств для preconditionирования может сводиться к поиску средств, имитирующих ишемическое preconditionирование [М.Н. Ходосовский, 2017; S.A. Marda et al., 2017; S. Wang et al., 2021]. Перспективные способы профилактики ишемически-реперфузионных нарушений связаны с воздействием на энергетический метаболизм с целью увеличения устойчивости клетки к гипоксии и повышению функциональных возможностей антиоксидантной системы [Ю.П. Орлов, В.В. Афанасьев, 2016; R. Ferriero et al., 2018;

Ming-xiang Chenga et al., 2019]. Между тем вопрос эффективной коррекции повреждения печени после ее частичной сосудистой изоляции остается нерешенным, тем более не многие из предлагаемых способов внедрены в клиническую практику. Наиболее эффективным способом профилактики повреждения органа при гипоксии и реоксигенации считается ишемическое прекондиционирование, реализация которого в реальной клинической ситуации связана с высокими рисками дополнительного повреждения патологически измененного органа. Поэтому мы считаем, что разработка оптимальной комбинированной схемы коррекции с использованием эндогенных субстратов, коферментов и антиоксидантов имеет большие перспективы использования в хирургической гепатологии.

С учетом вышеизложенного целью исследования был поиск путей повышения эффективности фармакологической коррекции патобиохимических нарушений при ишемически-реперфузионном поражении печени с использованием энерготропных средств.

Исследование проведено с использованием самцов белых беспородных крыс ($n = 90$). Были использованы половозрелые особи массой 200–250 грамм, прошедшие карантин на базе учебно-производственного отдела (вивария) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Животные были разделены на девять групп: контрольная группа животных (1-я группа), 2-я группа сравнения (ИРП без коррекции), 3-я группа – животные с ИРП и введение ремаксолола, 4-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и дихлорацетата натрия, 5-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и убихинона, 6-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и глутатиона, 7-я группа – животные с ИРП с предварительным введением ремаксолола и L-карнитина, 8-я группа – животные с ИРП с предварительным введением убихинона, 9-я группа – животные с ИРП с предварительным введением глутатиона.

Ишемически реперфузионное повреждение печени моделировали путем пережатия сосудистых ножек, питающих левую боковую и левую центральную доли зажимом типа Бульдог на 40 минут. Эксперимент выполняли на фоне общего обезболивания Золетилом 100. После снятия зажима и восстановления кровотока выжидали реперфузионный период длительностью 3 часа с последующим забором крови и ткани печени для выполнения лабораторных исследований. Введение средств для метаболической профилактики осуществляли внутривентриально предварительно за сутки до эксперимента и непосредственно после выполнения срединной лапаротомии.

Ожидаемо на фоне моделирования экспериментального ишемически-реперфузионного поражения печени наблюдалось резкое увеличение значений активности АЛТ, АСТ и ЛДГ. Активность АЛТ на фоне ИРП в результате частичной васкулярной эксклюзии в течение 40-ка минут и 3-х часового реперфузионного периода была увеличена в плазме крови в 17 раз, АСТ – в 19 раз, ЛДГ – в 8,3 раза. В результате проведенных исследований было показано, что ремаксол действительно способен оказывать гепатопротекторное действие на модели ишемии-реперфузии печеночной паренхимы, что выражалось в статистически значимо более низких значениях активности АЛТ и АСТ, на 18–21 % ниже в сравнении с показателями 2-й группы. Полученные данные также являются свидетельством возможности и целесообразности модификации состава ремаксолола с целью повышения его эффективности при острых повреждениях печени. По данным анализа изменений активности аминотрансфераз в плазме крови, а также ЛДГ, дополнительное снижение активности цитолитического синдрома наблюдалось при дополнении ремаксолола убихиноном или восстановленным глутатионом. Снижение активности АЛТ и АСТ в плазме крови животных 5-й и 6-й групп достигало 27–32 % при сравнении со значением параметра 2-й группы лабораторных животных. Также только в

этих экспериментальных группах (5-й и 6-й) было определено статистически значимое снижение уровня ЛДГ – на 22–29 % относительно значения показателя 2-й группы. В остальных случаях результат был аналогичен использованию только ремаксола у животных 3-й группы сравнения.

Определение активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в плазме крови животных 8–9-й групп показало наличие цитопротективного действия убихинона и глутатиона при их изолированном введении аналогичного действию ремаксола, что позволило сделать вывод о синергетическом действии 3-х изученных метаболических средств энерготропной направленности действия.

Таким образом, собственно основную задачу усиления эффективности ремаксола удалось решить за счет дополнительного использования убихинона или восстановленного глутатиона. Более детальный анализ патобиохимических изменений в крови и ткани печени животных после ишемически-реперфузионного повреждения позволил раскрыть еще ряд особенностей влияния средств энерготропной направленности действия.

Для оценки состояния окислительного гомеостаза на системном уровне проводили определение общей антиоксидантной активности железо-восстанавливающим методом и способом оценки радикальной сорбции. Оценка данных интегральных показателей состояния системы антиоксидантной защиты показала сниженные их значения на 20–22 % после моделирования ИРП у крыс 2-й группы. На фоне проведения метаболической коррекции было определено статистически значимое увеличение железо-восстанавливающей способности плазмы крови животных только 6-й группы, но до уровня контрольных значений. Более высокие цифры способности радикальной сорбции АВТС, на 10–16 % выше чем во 2-й группе сравнения, были получены только при превентивном введении крысам 5-й группы ремаксола и убихинона, а также крысам 6-й группы ремаксола и глутатиона. Увеличение рассматриваемых показателей за счет введения восстановленного глутатиона было ожидаемо, учитывая его

прямую антиоксидантную активность, то есть способность непосредственно выступать в роли восстановителя. Тем не менее отсутствие изменений в других группах, относительно 2-й группы сравнения, свидетельствует о том, что этот маркер вряд ли является основным. Оценка способности радикальной сорбции показала более перспективные результаты. В данном случае была отмечена тенденция к росту данного показателя на фоне введения не только глутатиона, но и убихинона.

Определение уровня тиоловых групп белков плазмы крови показало схожие результаты с оценкой общей антиоксидантной активности. Данный показатель после ИРП был также ниже контроля на 19 %. При этом только дополнительное введение глутатиона было способно поддержать данное звено антиоксидантной системы, повышая уровень данного маркера до контрольного значения соответствующего параметра. В этом случае защита белковых сульфгидрильных групп низкомолекулярными тиолами может заключаться во временном образовании между ними дисульфидных связей. Этот процесс в условиях *in vivo* является обратимым, поэтому по мере снижения концентрации глутатиона в плазме крови, тиоловые группы белков могли высвобождаться уже по мере стихания патологического процесса. При этом в самую активную фазу развития патобиохимических нарушений как раз сам глутатион, помимо его защитной роли в отношении SH-групп белков, мог брать основной удар прооксидантных факторов на себя.

Определение концентрации восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси практически продублировало результаты, полученные в ходе исследования других звеньев системы антиоксидантной защиты, а также маркеров цитолиза гепатоцитов. Ожидаемо на фоне ИРП концентрация глутатиона снижалась в эритроцитах на 17 %, относительно контроля. Проведение метаболической коррекции ни одним из способов, кроме сочетанного введения ремаксола и глутатиона, не способствовало статистически значимо более высоким значениям анализируемого параметра.

В данном случае распространение патологического процесса на системном уровне в течение 3-х часов реперфузии позволило в равной степени затронуть компоненты антиоксидантной защиты плазмы крови и эритроцитарной взвеси, что может свидетельствовать также о риске развития более тяжелых полиорганных осложнений. Полученные данные с одной стороны указывают на то, что глутатион мог оказывать эффект усиления гепатопротекторного действия ремаксолола за счет поддержки тиолового звена системы антиоксидантной защиты как в плазме крови, так и в эритроцитарной взвеси. С другой стороны, такой же эффект на показатели цитолиза и прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса оказывало введение убихинона совместно с ремаксололом, однако показатели системы глутатиона существенно не изменялись. Возможно, что эти два соединения по-разному реализуют свои цитопротективные эффекты.

Более детальный анализ состояния системы антиоксидантной защиты включал определение активности компонентов ее ферментативного звена: каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Состояние ферментативного звена системы антиоксидантной защиты находилось в большей зависимости от введения средств энерготропной направленности действия. Каталазная активность на фоне ИРП была существенно снижена и составляла только 57 % от контрольного уровня. На фоне введения ремаксолола или ремаксолола вместе с карнитином каталазная активность была выше, чем во 2-й группе сравнения, на 21–25 %. Совместное введение ремаксолола с дихлорацетатом натрия или восстановленным глутатионом характеризовалось значением активности анализируемого фермента антиоксидантной защиты на 38–43 % выше уровня показателя 2-й группы сравнения. Наиболее высокие значения каталазной активности были определены в эритроцитарной взвеси крыс 5-й группы на фоне совместного введения ремаксолола и убихинона. В этой группе лабораторных животных рассматриваемый показатель на 55 % превышал значение соответствующего параметра группы животных, которым не проводилась коррекция.

Активность глутатионпероксидазы изменялась аналогично каталазной активности. На фоне ИРП активность данного фермента в эритроцитарной взвеси была ниже уровня контрольного показателя на 38 %. На фоне проведения корректирующих мероприятий глутатионпероксидазная активность имела тенденцию к более высоким значениям, чем у крыс 2-й группы сравнения. Наиболее высокие значения активности фермента были также характерны для группы животных, которым вводили ремаксол сочетано с коэнзимом Q. Активность глутатионредуктазы в меньшей степени зависела от проведения метаболической профилактики ишемически-реперфузионного повреждения печени. При этом на фоне экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени активность этого фермента была также ниже контрольного уровня на 30 %. Необычным было то, что активность глутатионредуктазы эритроцитарной взвеси на фоне превентивного введения глутатиона была на том же уровне, что и в крови животных 2-й группы. Возможно, что это было результатом субстратного ингибирования на фоне высокой концентрации глутатиона или ингибирования по какому-то другому механизму на фоне отсутствия необходимости адаптивного роста анализируемого фермента в условии доставки в клетку экзогенного метаболита.

Таким образом, наиболее высокие значения активности каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, то есть всех 3-х изученных ферментов, были характерны для группы крыс, которым вводили убихинон совместно с ремаксолом. Можно предположить, что основным приложением действия коэнзима Q было ферментативное звено системы антиоксидантной защиты, что также оказывало существенное протективное действие, выражающееся в снижении выраженности цитолиза гепатоцитов.

В качестве традиционных маркеров окислительного стресса использовали показатели, характеризующие накопление продуктов

окислительных модификаций биомолекул. В результате оценки содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси животных после моделирования ИРП было установлено увеличение данного параметра в 4,6 раза относительно контроля. В результате проведения метаболической коррекции по любой из предложенных схем наблюдался более низкий уровень тиобарбитурового числа. Наиболее заметное снижение относительно группы сравнения было зафиксировано при определении содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитах животных 5-й и 6-й групп, составившее 30–35 %. Определение содержания остатков битирозина – продукта окисления белковых молекул было менее информативным, в сравнении с ТБК-реактивными продуктами. Это было связано, с тем что данный параметр увеличивался на фоне ИРП не в разы, а только на 36 %.

Представленные данные показали возможность коррекции ишемически-реперфузионных повреждений печени с использованием энерготропного средства – ремаксолола, а также возможность усиления эффекта последнего за счет комбинации его с убихиноном или глутатионом. Такие промежуточные выводы подтверждены оценкой маркеров цитолиза гепатоцитов, маркеров окислительного стресса и состояния системы антиоксидантной защиты на системном уровне – в крови. Для более подробного описания эффективности использования метаболической коррекции необходима оценка локальных изменений маркеров окислительного стресса в гомогенате печени.

Характеристика состояния энергетического обмена, а именно соотношения аэробных и анаэробных процессов, была проведена с учетом изменений концентрации молочной кислоты и пировиноградной кислоты. В результате проведенных исследований было установлено увеличение концентрации лактата и пирувата в ткани печени на фоне ИРП. В большей степени была увеличена концентрация молочной кислоты – в 2,3 раза, против увеличения уровня пирувата в 1,6 раза. На фоне проведения энерготропной

коррекции лактат в ткани печени накапливался в меньшем количестве. Животные 4-й группы получали дихлорацетат натрия, который как уже было указано является активатором пируватдегидрогеназного комплекса за счет чего интенсифицируется использование в ходе энергетического обмена глюкозы, молочной и пировиноградной кислоты, концентрация которых наиболее выражено снижается. Концентрация лактата кроме того была снижена и в других опытных группах крыс относительно показателя 2-й группы, но в меньшей степени, чем при введении ремаксолола и дихлорацетата натрия. Тем не менее более быстрое снижение уровня молочной кислоты на фоне метаболической коррекции вероятно было обязательным условием реализации гепатопротективных эффектов всех групп изученных средств, поскольку это один из немногих изученных маркеров, изменяющихся параллельно активности аминотрансфераз в плазме крови.

Работа с гомогенатом ткани печени позволила оценить интенсивность генерации АФК, которая закономерно возрастала после моделирования ИРП в 3,15 раза и была сравнительно ниже в условии проведения корректирующих мероприятий, кроме 4-й группы. На фоне самостоятельного введения ремаксолола или введения его совместно с карнитином уровень продукции АФК превышал контрольные цифры в 2,6–2,7 раза. Более низкий уровень генерации свободных радикалов наблюдался после введения ремаксолола вместе с убихиноном или восстановленным глутатионом. В этом случае анализируемый параметр превышал контрольные цифры в 2,2–2,3 раза или был ниже параметра группы сравнения на 28–32 %. Это можно объяснить непосредственно высокой антиоксидантной активностью этих двух веществ.

Показатель способности сорбции катионного радикала АВТS достоверно снижался после моделирования ИРП в ткани печени животных всех групп сравнения и опытных групп. В гомогенате печени крыс 2-й группы данный показатель был снижен на 56 % относительно контроля. Выраженный рост относительно группы крыс, не получавшей

метаболической коррекции, был зафиксирован при использовании ремаксола с глутатионом или убихиноном. В этом случае показатель сорбции радикала ABTS в гомогенате печени был на 49–60 % выше, но оставался статистически значимо ниже контрольного уровня.

В результате проведенных исследований содержания ТБК-реактивных продуктов было установлено увеличение данного параметра в 8 раз в гомогенате печени крыс после ИРП. На фоне введения ремаксола уровень содержания ТБК-реактивных продуктов был ниже значения соответствующего показателя 2-й группы на 28 %. Дополнительное введение убихинона или глутатиона сопровождалось сниженным относительно 2-й группы сравнения содержанием продуктов перекисного окисления липидов в гомогенате печени на 46–47 %.

Концентрация глутатиона в гомогенате печени изменялась после ИРП и проведения метаболической коррекции аналогично способности радикальной сорбции. Так после ИРП наблюдалось снижение концентрации восстановленной формы глутатиона в 2 раза. Локальные изменения в пораженном органе были выражены сильнее, чем выявленные на системном уровне в крови. Введение ремаксола совместно с дихлорацетатом натрия или карнитином, а также самостоятельное введение ремаксола характеризовалось увеличенными на 13–22 % значениями концентрации глутатиона относительно 2-й группы сравнения. Для лабораторных животных 5–6-й экспериментальных групп были характерны увеличенные на 33–50 % значения аналогичного показателя относительно 2-й группы. Таким образом, косвенным путем, введение убихинона также обеспечивало поддержание более адекватного функционального состояния системы глутатиона в клетках печени.

Каталазная активность гомогената печени после ИРП была увеличена, что отличалось этот показатель от изменений в крови. Это может быть связано с особой функцией данного фермента при гипоксических состояниях –

функцией возвращения кислорода в дыхательную цепь, после утечки его в форме активных форм, таких как супероксидный анион-радикал и пероксид водорода. Так у крыс 2-й группы в гомогенате печени уровень каталазной активности был увеличен на 52 % относительно контрольных цифр. При этом проведение экспериментальной терапии оказывало не такое значительное влияние на этот маркер, как на рассмотренные выше. Только на фоне введения ремаксолола с коэнзимом Q или восстановленным глутатионом активность рассматриваемого фермента снижалась на 26–28 % относительно параметра 2-й группы. На фоне проведения метаболической коррекции изменения каталазной активности вероятно неплохо соответствовали тяжести ишемических нарушений.

Изменения активности ферментов системы глутатиона имели тенденцию к снижению в гомогенате печени, как и в эритроцитарной взвеси. У крыс 2-й группы снижение активности глутатионпероксидазы относительно контроля составляло 41 %, а глутатионредуктазы – 24 %. При этом на фоне проведения метаболической коррекции наблюдались более высокие значения активности ферментов системы глутатиона по сравнению со значением аналогичных параметров 2-й группы. Введение антиоксидантов убихинона или глутатиона вместе с ремаксололом сопровождалось максимальным значениям глутатионпероксидазной активности – на 49–58 % относительно крыс 2-й группы. Высокая активность глутатионпероксидазы после введения глутатиона может быть обусловлена адекватной подпиткой фермента субстратом, что не просто позволяет поддерживать нормальное функциональное состояние системы глутатиона, но и обезвреживать АФК, органические гидропероксиды – продукты окислительных повреждений липидов. Это в конечном итоге обеспечивает снижение проявлений окислительного стресса и цитопротективный эффект на модели ишемии-реперфузии.

Наиболее высокие значения активности глутатионредуктазы, соответствующие контрольному уровню, были обнаружены в гомогенате

печени крыс 4-й и 5-й групп. Для животных 6-й группы было характерно сниженное значение активности глутатионредуктазы до уровня значения аналогичного параметра крыс 2-й группы сравнения. Такие же изменения были характерны и для эритроцитарной взвеси и как ранее уже указывали это может быть связано с эффектом ингибирования на фоне высокой концентрации восстановленной формы глутатиона, в результате его экзогенного введения.

Анализ данных, полученных при исследовании лабораторных маркеров в гомогенате печени после моделирования ИРП и проведения метаболической коррекции позволил выявить некоторые характерные особенности, отличные от изменений показателей крови. Было установлено значительное влияние дихлорацетата натрия на показатели энергообмена – уровень лактата и пирувата в ткани печени. Ключевое влияние на показатели состояния баланса прооксидантно-антиоксидантной системы оказывало дополнительное введение убихинона или восстановленного глутатиона, с непосредственным антиоксидантным действием которых связан основной эффект усиления действия ремаксолола. Введение самого глутатиона обеспечивало поддержку системы гомеостаза этого трипептида в клетках печени и снижением продукции АФК. Введение убихинона косвенным путем реализовывало поддержку ферментных систем антиоксидантной системы, что также проявлялось в поддержке системы глутатиона, снижении генерации АФК и повышении общей антиоксидантной активности гомогената печени.

ВЫВОДЫ

1. Оценка патобиохимических изменений в крови и печени крыс после моделирования 40-минутной частичной ишемии печени и 3-х часового реперфузионного периода показала развитие цитолитического синдрома, характеризующегося увеличением активности аминотрансфераз в плазме крови в 17–19 раз. Развивающийся в этих условиях окислительный стресс характеризовался снижением антиоксидантной активности на 20–22 % и накоплением продуктов окислительных модификаций в 4,6 раз в крови. В гомогенате печени те же показатели изменялись на 56 % и в 8 раз соответственно, в 3,15 раза увеличивалась интенсивность генерации активных форм кислорода.

2. В результате проведенных исследований было показано, что ремаксол способен оказывать гепатопротекторное действие на модели ишемии-реперфузии печеночной паренхимы, что выражалось в статистически значимом уменьшении активности АЛТ и АСТ – на 18–21 % в сравнении с показателями группы животных, которым метаболическая коррекция не проводилась. Полученные данные свидетельствуют о невысокой активности препарата и указывают на целесообразность модификации состава ремаксолола с целью повышения его эффективности при острых повреждениях печени.

3. Введение животным с ишемически-реперфузионным повреждением печени, ремаксолола совместно с убихиноном или глутатионом позволило достичь снижения активности аминотрансфераз и ЛДГ в плазме крови на 27–32 % в сравнении с показателями животных, которым метаболическая коррекция не проводилась.

4. Введение глутатиона совместно с ремаксололом крысам с ишемически-реперфузионным повреждением печени обеспечивало поддержание состояния неферментного звена антиоксидантной системы, что

выражалось в увеличенном значении антиоксидантной активности, содержании тиоловых групп плазмы крови и глутатиона в эритроцитах, а также статистически значимом более низком уровне ТБК-реактивных продуктов в сравнении с показателями группы животных, которым метаболическая коррекция не проводилась. Введение животным в аналогичных условиях убихинона совместно с ремаксолом обеспечивало дополнительную поддержку ферментативного звена антиоксидантной системы, что также выражалось в снижении накопления продуктов окислительных модификаций биомолекул.

5. Основные проявления нарушений окислительного гомеостаза в ткани печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения заключались в большей выраженности дисбаланса системы про / антиоксиданты. В этих условиях введение глутатиона или убихинона совместно с ремаксолом обеспечивало на 28–32 % более низкий уровень генерации активных форм кислорода, на 49–60 % увеличенную способность нейтрализации радикалов, на 46–47 % более низкое содержание ТБК-реактивных продуктов и нормализацию показателей активности ферментов системы антиоксидантной защиты в сравнении с показателями группы животных, которым метаболическая коррекция не проводилась или вводили только ремаксол. Введение дихлорацетата натрия или карнитина не обеспечивало дополнительного усиления энерготропного действия ремаксола.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности гепатопротекторного действия ремакса в условиях развития ишемически-реперфузионного повреждения печени целесообразно вводить его совместно с убихиноном 100 мг/кг или восстановленным глутатионом 50 мг/кг внутривенно.

2. Для оценки эффективности энерготропной коррекции на фоне экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени наиболее информативно определение интегральных показателей состояния баланса прооксидантно-антиоксидантной системы, таких как общая антиоксидантная активность, способность нейтрализации радикалов, активность генерации активных форм кислорода, накопление продуктов окислительных модификаций биомолекул – ТБК-реактивных продуктов. Изменения отдельных звеньев системы антиоксидантной защиты отличаются в зависимости от используемого средства (глутатион, убихинон), что может характеризовать разный механизм достижения близкого эффекта снижения интенсивности окислительного стресса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АОА	– антиоксидантная активность
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
АОС	– антиоксидантная система
АФК	– активные формы кислорода
ГПО	– глутатионпероксидаза
ГР	– глутатионредуктаза
ДТНБ	– 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)
ДХА	– дихлорацетат натрия
ИРП	– ишемически-реперфузионное повреждение
КАТ	– каталаза
КоQ	– убихинон (коэнзим Q ₁₀)
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
ТБК	– тиобарбитуровая кислота
АВTS	– 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо кислота)
GSH	– восстановленный глутатион

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонь, Е.И. Роль митохондрий в энергетике клетки и характеризующие ее молекулярные маркеры / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович // Оренбургский медицинский вестник. – 2019. – Т. VII. – № 1 (25). – С. 47–52.

2. Быков, И.М. Метаболическая коррекция экспериментального аллоксанового диабета средствами антиоксидантной направленности / И.М. Быков, К.А. Попов, И.Ю. Цымбалюк, С.С. Джимаков, Д.И. Шашков, В.В. Малышко, М.Г. Барышев // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86. – № 3. – С. 68–76.

3. Быков, И.М. Оценка показателей тиолового метаболизма плазмы крови больных воспалительными заболеваниями органов малого таза при проведении антиоксидантной коррекции / И.М. Быков, К.А. Попов, И.А. Егорова, А.П. Сторожук // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. – Т. 13. – № 2. – С. 402–406.

4. Васильев, П.В. Способ сосудистой изоляции печени при резекциях, с использованием временной эндоваскулярной окклюзии / П.В. Васильев, Н.В. Рагулина, В.П. Ионин // Патент на изобретение RU 2733503C2. МПК А61В17/00(2006-01-01), А61М25/10(2013-01-01). – Заявл. 17.01.2019; опублик. 10.02.2020.

5. Вережкина, И.В. Колориметрический метод определения SH-групп и SS-связей в белках при помощи 5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / И.В. Вережкина, А.И. Точилкин, Н.А. Попова // В сб.: Современные методы в биохимии, под ред. В.Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 223–231.

6. Гараев, Г.Ш. Изменения состава белков в крови в период синдрома ишемии-реперфузии, моделированного нарушением кровотока в печени / Г.Ш. Гараев, Ж.Р. Гафарова, Р.Э. Джафарова // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2018. – № 2. – С. 110–114.

7. Гараев, Г.Ш. Особенности цитохимического статуса лимфоцитов крови при ишемически-реперфузионном поражении печени / Г.Ш. Гараев, С.О. Шахмамедова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. – 2018. – Т. 18. – № 3 (63). – С. 169–172.

8. Гордеева, А.Е. Курганова Э. А., Новоселов В. И. Гепатопротекторное действие пероксиредоксина 6 при ишемически-реперфузионном поражении почки / А.Е. Гордеева, Э.А. Курганова, В.И. Новоселов // Биофизика. – 2021. – Т. 66. – № . 5. – С. 985–993.

9. Довгань, А.П. Возможные пути фармакологической коррекции ишемических повреждений печени с помощью агониста периферических имидазолиновых рецепторов C7070 / А.П. Довгань, С.Н. Поветкин, Г.А. Богатищева, А.А. Должиков, М.В. Покровский, Ж.С. Урожевская // Российский медико-биологический вестник имени академика ИП Павлова. – 2018. – Т. 26. – № . 1. – С. 21–35.

10. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Справочник / В.С. Камышников. – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.

11. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 2002. – 600 с.

12. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.И. Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.

13. Попов, К.А. Выбор оптимального маркера острого повреждения печени крыс в эксперименте / К.А. Попов, И.Ю. Цымбалюк, Р.И. Сепиашвили, И.М. Быков, Е.С. Устинова, М.И. Быков // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2020. – Т. 24. – № . 4. – С. 293–303.

14. Попов, К.А. Динамика активности ферментов антирадикальной защиты и общей антиоксидантной активности при развитии экспериментального ишемически-реперфузионного поражения печени / К.А. Попов, И.М. Быков, Г.А. Ермакова, И.Ю. Цымбалюк // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2018. – Т. 22. – № 2. – С. 171–182.

15. Попов, К.А. Динамика изменений показателей окислительного гомеостаза в процессе реперфузии печени крыс после васкулярной эксклюзии / К.А. Попов, Я.Е. Денисова, А.Н. Столярова, Э.А. Азимов, Е.Е. Есауленко, М.И. Быков, О.В. Балачевская, А.А. Басов // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2021. – Т. 11. – № 2. – С. 40–46.

16. Попов, К.А. Изменения мембранного потенциала митохондрий в зависимости от длительности ишемии и реперфузии печени у крыс / К.А. Попов, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк, А.Н. Курзанов, А.П. Сторожук, Е.Е. Есауленко // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14. – № 1–2. – С. 231–235.

17. Попов, К.А. Прооксидантное прекондиционирование ишемически-реперфузионного поражения печени в эксперименте / К.А. Попов, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк, Э.А. Азимов, М.И. Быков, Я.Е. Денисова, А.Н. Столярова, Е.Е. Есауленко // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2022. – Т. 17. – № 1. – С. 56–59.

18. Попов, К.А. Состояние системы антиоксидантной защиты печени крыс при ишемии и реперфузии / К.А. Попов, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк, Я.Е. Денисова, А.Н. Столярова, Э.А. Азимов, Л.А. Шурыгина // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2020. – Т. 24. – № 1. – С. 93–104.

19. Попов, К.А. Способ оценки резистентности организма к воздействию прооксидантных факторов / К.А. Попов, М.И. Быков,

А.А. Басов, И.А. Егорова, Е.Е. Есауленко, Е.А. Алескеенко, С.Р. Федосов, И.А. Севостьянов // Патент на изобретение RU 2629391. МПК G01N 33/49. – Заявл. 10.03.2017; опубл. 29.08.2017. – Бюл. № 25. – 16 с.

20. Ремизова, М.И. Реперфузионный синдром: патогенез и способы лечения при инфузионной терапии шока / М.И. Ремизова // Трансфузиология. – 2020. – Т. 21. – № 3. – С. 277–289.

21. Солянская Е.Н. Влияние гидросульфида натрия на развитие постишемических нарушений при ишемии-реперфузии печени // Сборник материалов конференции студентов и молодых ученых, посвященный 80-летию со дня рождения профессора Болтрукевича Станислава Ивановича. – 2020. – С. 490–491.

22. Солянская, Е.Н.. Влияние ингибирования клеток купфера на активность процессов перекисного окисления липидов в печени при ее ишемии-реперфузии / Е.Н. Солянская, М.А. Покатило // Фундаментальная наука и клиническая медицина. – 2021. – С. 604–605.

23. Тарасова, А.П. Противоишемическое действие вилдаглиптина и эксенатида при ишемии/реперфузии печени // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармакология живых систем: 6 лет пассионарного развития», Белгород. – 2018. – С. 165–168.

24. Халилов Р.А. Интенсивность свободно-радикальных процессов в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности / Р.А. Халилов, А.М. Джафарова, С.И. Хизриева, В.Р. Абдулаев // Цитология. – 2019. – Т. 61. – № 7. – С. 536–547.

25. Халилов Р. А. и др. Флуоресцентные исследования структурно-динамических параметров мембран митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности / Р.А. Халилов, С.И. Хизриева, А.М. Джафарова, В.Р. Абдулаев // Биологические мембраны. – 2021. – Т. 38. – № 5. – С. 351–362.

26. Харченко, В.З. Протеолиз и свободнорадикальное окисление в патогенезе реперфузионного синдрома на фоне ионизирующего излучения и кровопотери / В.З. Харченко, А.В. Кубышкин, Л.В. Анисимова, А.А. Жукова, А.А. Бекетов, А.А. Писарев, А.И. Боровская, О.А. Рогозенко // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6. – № 4. – С. 53–56.

27. Ходосовский М.Н. Влияние монооксида углерода на метаболизм гепатоцитов при синдроме ишемии-реперфузии печени / М.Н. Ходосовский // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. – 2018. – С. 73–75.

28. Ходосовский МН. Коррекция окислительных повреждений при синдроме ишемии-реперфузии печени // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 4 (56). – С. 20–25.

29. Ходосовский, М.Н. Роль газотрансмиттеров (no и hs) в механизмах защиты от постишемических нарушений печени / М.Н. Ходосовский // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – Т. 3. – № 1. – С. 14–21.

30. Ходосовский, М.Н. Участие монооксид углерода в коррекции реперфузионных повреждений печени / М.Н. Ходосовский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 127–132.

31. Цымбалюк И.Ю. Динамика метаболических показателей при частичной сосудистой изоляции печени у крыс / И.Ю. Цымбалюк, К.А. Попов, Е.Е. Есауленко, К.И. Мелконян, В.В. Малышко, Л.В. Цыпленков // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 3. – С. 137–144.

32. Шабунин, А.В. Профилактика и лечение послеоперационной печеночной недостаточности после обширных резекций печени / А.В. Шабунин, А.В. Каралкин, А.П. Белоусова, Е.В. Кижаяев, Д.Н. Греков // Анналы хирургии. – 2018. – Т. 23. – № 4. – С. 211–218.

33. Шахмамедова, С.О. Функциональная активность нейтрофилов крови при ишемически-реперфузионном поражении печени / С.О. Шахмамедова // Медицинские новости. – 2020. – № 2 (305). – С. 80–82.

34. Abudhaise, H. Mitochondrial respiratory chain and Krebs cycle enzyme function in human donor livers subjected to end-ischaemic hypothermic machine perfusion / H. Abudhaise, J.W. Taanman, P. DeMuylder, B. Fuller, B.R. Davidson // PLoS One. – 2021. – Vol. 16 (10). – P. 257783.

35. Ali, E.S. TRPM2 Non-Selective Cation Channels in Liver Injury Mediated by Reactive Oxygen Species / E.S. Ali, G.Y. Rychkov, G.J. Barritt // Antioxidants (Basel). – 2021. – Vol. 10 (8). – P. 1243.

36. Alvarez, M.L. Role of eicosanoids in liver repair, regeneration and cancer / M.L. Alvarez, F. Lorenzetti // Biochem Pharmacol. – 2021. – Vol. 192. – P. 114732.

37. Anttila, V. Review of remote ischemic preconditioning: from laboratory studies to clinical trials / V. Anttila, H. Haapanen, F. Yannopoulos, J. Herajärvi, T. Anttila, T. Juvonen // Scand Cardiovasc J. – 2016. – Vol. 50. – P. 355–361.

38. Anzell, A.R. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury / A.R. Anzell, R. Maizy, K. Przyklenk, T.H. Sanderson // Molecular Neurobiology. – 2018. – Vol. 55 (3). – P. 2547–2564.

39. Ashraf, A. High level of lactate dehydrogenase and ischaemia-reperfusion injury regulate the multiple organ dysfunction in patients with COVID-19 / A. Ashraf, A. Liaquat, S. Shabbir, S.A. Bokhari, Z. Tariq, Z. Furrakh, A.A. Raja, M.J. Khan // Postgrad Med J. – 2022. – Vol. 23. – P. 141573.

40. Bardallo, G.R. Nrf2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury / G.R. Bardallo, A. Panisello-Roselló, S. Sanchez-Nuno, N. Alva, J. Roselló-Catafau, T. Carbonell // FEBS J. – 2021. – doi: 10.1111/febs.16336.

41. Bavarsad, K. Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the liver / K. Bavarsad, M.M. Riahi, S. Saadat, G. Barreto, S.L. Atkin, A. Sahebkar // Pharmacological Research. – 2019. – Vol. 141. – P. 53–62.

42. Cavalcante, S.J. Ischemia-reperfusion damage is attenuated by GQ-11, a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α/γ agonist, after aorta clamping in rats / S.J. Cavalcante, M. Bavestrello, V. Gazzola, G. Spinella, B. Pane, E. Grasselli, I. Demori, L. Canesi, L. Emionite, M. Cilli, A. Buschiazzo, G. Sambuceti, I.R. Pitta, M.G. Pitta, P. Perego, D. Palombo, D. Abdalla // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 297. – P. 120468.

43. Celepli, S. Effects of artichoke leaf extract on hepatic ischemia-reperfusion injury / S. Celepli, B. Çolak, P. Celepli, İ. Bigat, H.G. Batur, F. Soysal, S. Karakurt, S. Hücümenoğlu, K. Kısmet, M. Şahin // *Rev Assoc Med Bras (1992)*. – 2022. – Vol. 68 (1). – P. 87–93.

44. Choi, E.K. Hepatic ischemia-reperfusion injury with respect to oxidative stress and inflammatory response: a narrative review / E.K. Choi, D.G. Lim // *J Yeungnam Med Sci.* – 2022. – Vol. 21. – P. 17.

45. Cienfuegos-Pecina, E. Treatment with sodium (S)-2-hydroxyglutarate prevents liver injury in an ischemia-reperfusion model in female Wistar rats / E. Cienfuegos-Pecina, D.P. Moreno-Peña, L. Torres-González, D.R. Rodríguez-Rodríguez, D. Garza-Villarreal, O.H. Mendoza-Hernández, R.A. Flores-Cantú, B.A. Samaniego Sáenz, G. Alarcon-Galvan, L.E. Muñoz-Espinosa, T.R. Ibarra-Rivera, A.L. Saucedo, P. Cordero-Pérez // *PeerJ.* – 2021. – Vol. 9. – P. 12426.

46. Cornide-Petronio M.E. Current knowledge about the effect of nutritional status, supplemented nutrition diet, and gut microbiota on hepatic Ischemia-Reperfusion and regeneration in liver surgery / M.E. Cornide-Petronio, A.I Alvarez-Mercado, M.B. Jimenez-Castro, C. Peralta // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12 (2). – P. 284.

47. Du, P. Curculigoside mitigates hepatic ischemia/reperfusion-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis via activation of the Nrf-2/HO-1 pathway / P. Du, X. Zhang, K. Luo, Y. Li, C. Fu, J. Xiao, Q. Xiao // *Hum Exp Toxicol.* – 2022. – Vol. 41. – P. 9603271221087146.

48. Du, Y. Aloin preconditioning attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway in vivo and in vitro / Y. Du, B. Qian, L. Gao // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 14.

49. Dugbartey, G.J. H₂S donor molecules against cold ischemia-reperfusion injury in preclinical models of solid organ transplantation / G.J. Dugbartey, S. Juriasingani, M.Y. Zhang, A. Sener // *Pharmacol Res*. – 2021. – Vol. 172. – P. 105842.

50. Dusabimana, T. Nobiletin ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury through the activation of SIRT-1/FOXO3a-mediated autophagy and mitochondrial biogenesis / T. Dusabimana., S.R. Kim, H.J. Kim., S.W. Park, H. Kim // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2019. – Vol. 51 (4). – P. 1–16.

51. Fang, M.M. Vitamin D receptor alleviates hepatic ischemia and reperfusion injury by mediating endoplasmic reticulum stress through autophagy / M.M. Fang, J. Xu, D.M. Wu, C. Zhong // *J Physiol Pharmacol*. – 2021. – Vol. 72 (5). – doi: 10.26402/jpp.2021.5.12.

52. Ferreira-Silva, M. Quercetin Liposomal Nanoformulation for Ischemia and Reperfusion Injury Treatment. / M. Ferreira-Silva, C. Faria-Silva, M.C. Carvalheiro, S. Simões, H.S. Marinho, P. Marcelino, M.C. Campos, J.M. Metselaar, E. Fernandes, P.V. Baptista, A.R. Fernandes, M.L. Corvo // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14 (1). – P. 104.

53. Franko, J.J. Adenosine, lidocaine, and magnesium for attenuating ischemia reperfusion injury from resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta in a porcine model / J.J. Franko, M.M. Vu, M.E. Parsons, J.R. Conner, D.T. Lammers, N. Ieronimakis, G.D. Reynolds, M.J. Eckert, J.R. Bingham // *J Trauma Acute Care Surg*. – 2022. – Vol. 92 (4). – P. 631–639.

54. Golen, R.F. The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion / R.F. Golen, T.M. Gulik, M. Heger // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2012. – Vol. 23. – P. 69–84.

55. Gori, F. Ascorbic acid in solid organ transplantation: A literature review / F. Gori, J. Fumagalli, C. Lonati, R. Caccialanza, A. Zanella, G. Grasselli // *Clin Nutr.* – 2022. – Vol. 41 (6). – P. 1244–1255.

56. Guo, J. Oleic acid protects against hepatic ischemia and reperfusion injury in mice by inhibiting AKT/mTOR pathways. / J. Guo, T. Zhang, J. Gu // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–18.

57. Guo, Z. Abrogation of graft ischemia-reperfusion injury in ischemia-free liver transplantation / Z. Guo, J. Xu, S. Huang, M. Yin, Q. Zhao, W. Ju, D. Wang, N. Gao, C. Huang, L. Yang, M. Chen, Z. Zhang, Z. Zhu, L. Wang, C. Zhu, Y. Zhang, Y. Tang, H. Chen, K. Liu, Y. Lu, Y. Ma, A. Hu, Y. Chen, X. Zhu, X. He // *Clin Transl Med.* – 2022. – Vol. 12 (4). – P. 546.

58. Han, S.J. IDH2 deficiency increases the liver susceptibility to ischemia-reperfusion injury via increased mitochondrial oxidative injury / S.J. Han, H.S. Choi, J.I. Kim, J.W. Park, K.M. Park // *Redox Biology.* – 2018. – Vol. 14. – P. 142–153.

59. Han, X. A mitochondrial-targeting near-infrared fluorescent probe for bioimaging and evaluating endogenous superoxide anion changes during ischemia/reperfusion injury / X. Han, R. Wang, X. Song, F. Yu, C. Lv, L. Chen // *Biomaterials.* – 2018. – Vol. 156. – P. 134–146.

60. Hashemi, P. NETosis in ischemic/reperfusion injuries: An organ-based review / P. Hashemi, M. Nouri-Vaskeh, L. Alizadeh, A. Baghbanzadeh, R. Badalzadeh, E. Askari, B. Baradaran // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 290. – P. 120158.

61. Hirao, H. Liver ischaemia-reperfusion injury: a new understanding of the role of innate immunity / H. Hirao, K. Nakamura, J.W. Kupiec-Weglinski // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2022. – Vol. 19 (4). – P. 239–256.

62. Hofmann, J. Restoring mitochondrial function while avoiding redox stress: the key to preventing ischemia/reperfusion injury in machine perfused liver grafts / J. Hofmann, G. Otarashvili, A. Meszaros // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – Vol. 21. – P. 3132.

63. Hou, W. The Protective Effect of Panax notoginseng Mixture on Hepatic Ischemia / Reperfusion Injury in Mice via Regulating NR3C2, SRC, and GAPDH / W. Hou, B. Wei, H.S. Liu // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 756259.

64. Hu, C. Melatonin and its protective role in attenuating warm or cold hepatic ischaemia/reperfusion injury / C. Hu, L. Zhao, F. Zhang, L. Li // *Cell Proliferation.* – 2021. – Vol. 54. – P. 13021.

65. Huang, J. Inhibition of Drp1 SUMOylation by ALR protects the liver from ischemia-reperfusion injury / J. Huang, P. Xie, Y. Dong, W. An // *Cell Death and Differentiation.* – 2021. – Vol. 28 (4). – P. 1174–1192.

66. Huang, M. Natural Killer Cells in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury / M. Huang, H. Cai, B. Han, Y. Xia, X. Kong, J. Gu // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 870038.

67. Huang, M.J. Tissue kallikrein-related peptidase8 protects rat heart against acute ischemia reperfusion injury / M.J. Huang, Y. Wang // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2019. – Vol. 140. – P. 1126–1133.

68. Ibrahim, S.G. Dimethyl fumarate and curcumin attenuate hepatic ischemia/reperfusion injury via Nrf2/HO-1 activation and anti-inflammatory properties / S.G. Ibrahim, S.Z. El-Emam, E.A. Mohamed, M.F. Abd Ellah // *International Immunopharmacology.* – 2020. – Vol. 80. – P. 106131.

69. Ikeyama, Y. Hypoxia/reoxygenation exacerbates drug-induced cytotoxicity by opening mitochondrial permeability transition pore: possible application for toxicity screening / Y. Ikeyama, T. Sato, A. Takemura, S. Sekine, K. Ito // *Toxicology In Vitro.* – 2020. – Vol. 67. – P. 104889.

70. Ilyasov, I.R. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways / I.R. Ilyasov, V.L. Beloborodov, I.A. Selivanova, R.P. Terekhov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (3). – P. 1131.

71. Ingram, H. MicroRNAs: Novel Targets in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury / H. Ingram, M. Dogan, J.D. Eason, C. Kuscu // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10 (4). – P. 791.

72. Ito, T. Ischemia-reperfusion injury and its relationship with early allograft dysfunction in liver transplant patients / T. Ito, B.V. Naini, D. Markovic // *American Journal of Transplantation*. – 2021. – Vol. 21 (2). – P. 614–625.

73. Jung, E. H₂O₂-activatable hybrid prodrug nanoassemblies as a pure nanodrug for hepatic ischemia/reperfusion injury / E. Jung, N. Song, Y. Lee, G. Kwon, S. Kwon, D. Lee // *Biomaterials*. – 2022. – Vol. 284. – P. 121515.

74. Kang, J.W. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis / J.W. Kang, J.M. Hong, S.M. Lee // *Journal of Pineal Research*. – 2016. – Vol. 60 (4). – P. 383–393.

75. Klevstig, M. Cardiac expression of the microsomal triglyceride transport protein protects the heart function during ischemia / M. Klevstig, M. Arif., M. Mannila // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2019. – Vol. 137. – P. 1–8.

76. Küçükaslan, H. Effects of L-Theanine on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats / H. Küçükaslan, A. Usta, M. Uluşahin, M.E. Ercin, H. Patan, K.B Vanizor, E. Alhan // *Exp Clin Transplant*. – 2021. – doi: 10.6002/ect.2021.0290.

77. Li, J. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury / J. Li, R.J. Li, G.Y. Lv, H.Q. Liu // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. – 2015. – Vol. 19. – P. 2036–2047.

78. Li, J. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury / J. Li, R.J. Li, G.Y. Lv, H.Q. Liu // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2015. – Vol. 19 (11). – P. 2036–2047.

79. Li, S. Molecular hydrogen protects against ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model via regulating HO-1 and Sirt1 expression / S. Li, M. Fujino, N. Ichimaru [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 14019.

80. Lin, J. The effect of Ginsenoside Rg1 in hepatic ischemia reperfusion (I/R) injury ameliorates ischemia-reperfusion-induced liver injury by inhibiting

apoptosis / J. Lin, H.F. Huang, S.K. Yang // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 129. – P. 110398.

81. Liveira, T.H. Neutrophils: a cornerstone of liver ischemia and reperfusion injury / T.H. Liveira, P.E. Marques, P. Proost, M.M. Teixeira // *Lab Invest*. – 2018. – Vol. 98. – P. 51–62.

82. Lu, X. The Role of Hydrogen Sulfide Regulation of Autophagy in Liver Disorders / X. Lu., Y. Ding, H. Liu, M. Sun, C. Chen, Y. Yang, H. Wang // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23 (7). – P. 4035.

83. Mao, X.L. Targets and Therapeutic Strategies to Protect Against Hepatic Ischemia Reperfusion Injury / X.L. Mao, Y. Cai, Y.H. Chen, Y. Wang, X.X. Jiang, L.P. Ye, S.W. Li // *Front Med (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 8. – P. 75733.

84. Mard, S.A. Protective effects of crocin and zinc sulfate on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: a comparative experimental model study / S.A. Mard, G. Akbari, M. Dianat, E. Mansouri // *Biomed Pharmacother*. – 2017. – Vol. 96. – P. 48–55.

85. Mateus, I. Hydrogen sulphide in liver glucose/lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease / I. Mateus, C. Prip-Buus // *Eur J Clin Invest*. – 2022. – Vol. 52 (3). – P. 13680.

86. Matuz-Mares, D. Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease / D. Matuz-Mares, M. González-Andrade, M.G. Araiza-Villanueva, M.M. Vilchis-Landeros, H. Vázquez-Meza // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11 (5). – P. 801.

87. Merlen, G. Oxaloacetate protects rat liver from experimental warm ischemia/reperfusion injury by improving cellular energy metabolism / G. Merlen, V.A. Raymond, S. Cassim, P. Lapierre, M. Bilodeau // *Liver Transplantation*. – 2019. – Vol. 25 (4). – P. 627–639.

88. Miyauchi, T. Propionic Acid, Induced in Gut by an Inulin Diet, Suppresses Inflammation and Ameliorates Liver Ischemia and Reperfusion Injury in Mice / T. Miyauchi, T. Watanabe, K. Saga, K. Tanaka, S. Ueda, H. Terajima, K. Taura, E. Hatano // *Front Immunol*. – 2022. – Vol. 22 (13). – P. 862503.

89. Miyauchi, T. Up-regulation of FOXO1 and reduced inflammation by beta-hydroxybutyric acid are essential diet restriction benefits against liver injury / T. Miyauchi, Y. Uchida, K. Kadono // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2019. – Vol. 116 (27). – P. 13533–13542.

90. Mohamed, I.N. Thioredoxin interacting protein, a key molecular switch between oxidative stress and sterile inflammation in cellular response / I.N. Mohamed, L. Li, S. Ismael, T. Ishrat, A.B. El-Remessy // *World J Diabetes*. – 2021. – Vol. 12 (12). – P. 1979–1999.

91. Morsy, M.A. Protective mechanisms of telmisartan against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats may involve PPAR γ -induced TLR4/NF- κ B suppression / M.A. Morsy, S.A. Abdel-Gaber, R.A. Rifaai, M.M. Mohammed, A.B. Nair, W.Y. Abdelzاهر // *Biomed Pharmacother*. – 2022. – Vol. 145. – P. 112374.

92. Moulding, S. Receptor Activation in Liver Perfusion / S. Moulding, R. Figueiredo, A. Sewpaul, A. Leitch, L. Bates, M. Wright, C. Wilson. X. Pregnane // *Transplant Proc*. – 2022. – Vol. 1345 (22). – P. 94.

93. Mukhopadhyay, P. Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants / P. Mukhopadhyay, B. Horváth, Z. Zsengellér, S. Bátkai, Z. Cao, M. Kechrid // *Free Radic Biol Med*. – 2012. – Vol. 53. – P. 1123–1138.

94. Nakagawa, S. Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in impaired blood-brain barrier function in ischemia-reperfusion injury / S. Nakagawa, J. Aruga // *Molecular Neurobiology*. – 2020. – Vol. 57 (3). – P. 1594–1606.

95. Nakamura, K. Macrophage heme oxygenase-1-SIRT1-p53 axis regulates sterile inflammation in liver ischemia-reperfusion injury / K. Nakamura, M. Zhang, S. Kageyama // *Journal of Hepatology*. – 2017. – Vol. 67 (6). – P. 1232–1242.

96. Ntamo, Y. Clinical use of N-acetyl cysteine during liver transplantation: Implications of oxidative stress and inflammation as therapeutic targets / Y. Ntamo, K. Ziqubu, N. Chellan, B.B. Nkambule, T.M. Nyambuya, S.E. Mazibuko-Mbeje, K.B. Gabuza, P. Orlando, L. Tiano, P.V. Dlodla // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – Vol. 147. – P. 112638.

97. Ocuin, L.M. Nilotinib protects the murine liver from ischemia/reperfusion injury / L.M. Ocuin, S. Zeng, M.J. Cavnar, E.C. Sorenson, Z.M. Bamboat, J.B. Greer // *J Hepatol.* – 2012. – Vol. 57. – P. 766–773.

98. Pabla, N. Role of Mitochondrial Therapy for Ischemic-Reperfusion Injury and Acute Kidney Injury / N. Pabla, A. Bajwa. // *Nephron.* – 2022. – Vol. 146 (3). – P. 253–258.

99. Panel, M. Small-molecule inhibitors of cyclophilins block opening of the mitochondrial permeability transition pore and protect mice from hepatic ischemia/reperfusion injury / M. Panel, I. Ruiz, R. Brillet // *Gastroenterology.* – 2019. – Vol. 157 (5). – P. 1368–1382.

100. Parente, A. Organ restoration with normothermic machine perfusion and immune reaction / A. Parente, D.C. Osei-Bordom, V. Ronca, M. Perera, D. Mirza // *Frontiers in Immunology.* – 2020. – Vol. 11. – P. 565616.

101. Patel, N.M. Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor Activity Attenuates Haemorrhagic Shock-Induced Multiple Organ Dysfunction in Rats / N.M. Patel, N. Yamada, F. Oliveira, L. Stiehler, E. Zechendorf, D. Hinkelmann, S. Kraemer, C. Stoppe, M. Collino, D. Collotta, G.F. Alves, H.P. Ramos, R. Sordi, I. Marzi, B. Relja, G. Marx, L. Martin, C. Thiemermann // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 886421.

102. Platt, E. Literature review of the mechanisms of acute kidney injury secondary to acute liver injury / E. Platt, E. Klootwijk, A. Salama, B. Davidson, F. Robertson // *World J Nephrol.* – 2022. – Vol. 11 (1). – P. 13–29.

103. Prieto, I. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning / I. Prieto, M. Monsalve // *Redox Biology.* – 2017. – Vol. 12. – P. 1020–1025.

104. Prieto-Domínguez, N. Melatonin-induced increase in sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib is associated with reactive oxygen species production and mitophagy / N. Prieto-Domínguez, R. Ordóñez, A. Fernández // *Journal of Pineal Research*. – 2016. – Vol. 61(3). – P. 396–407.

105. Ramachandran, A. Oxidative stress and acute hepatic injury / A. Ramachandran, H. Jaeschke // *Current Opinion in Toxicology*. – 2018. – Vol. 7. – P. 17–21.

106. Rosello, A.P. Polyethylene glycol 35 as a perfusate additive for mitochondrial and glycocalyx protection in HOPE liver preservation / A.P. Rosello, R.T. da Silva, C. Castro // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21(16). – P. 5703.

107. Schlegel, A. Hypothermic oxygenated perfusion protects from mitochondrial injury before liver transplantation / A. Schlegel, X. Muller, M. Mueller // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 60. – P. 103014.

108. Shi, S. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in liver transplantation and underlying diseases: new insights and therapeutics / S. Shi, L. Wang, L.J.W. van der Laan, Q. Pan, M.M.A. Verstegen // *Transplantation*. – 2021. – Vol. 105 (11). – P. 2362–2373.

109. Shin, J.K. Genipin protects the liver from ischemia/reperfusion injury by modulating mitochondrial quality control / J.K. Shin, S.M. Lee // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2017. – Vol. 328. – P. 25–33.

110. Tajeddine, N. How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation / N. Tajeddine // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – Vol. 1860 (6). – P. 1079–1088.

111. Takanori, K. Hepatic ischemia/reperfusion: mechanisms of tissue injury, repair, and regeneration / K. Takanori, A.B. Lentsch // *Gene Expression*. – 2017. – Vol. 17 (4). – P. 277–287.

112. Tang, S.P. Reactive Oxygen Species Induce Fatty Liver and Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Inflammation and Cell Death / S.P. Tang,

X.L. Mao, Y.H. Chen, L.L. Yan, L.P. Ye, S.W. Li // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 29 (13). – P. 870239.

113. Tang, S.P. Reactive Oxygen Species Induce Fatty Liver and Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Inflammation and Cell Death / S.P. Tang, X.L. Mao, Y.H. Chen, L.L. Yan, L.P. Ye, S.W. Li // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 870239.

114. Tara, A. Mitochondrial Targeting Therapy Role in Liver Transplant Preservation Lines: Mechanism and Therapeutic Strategies / A. Tara, J.L. Dominic, J.N. Patel, I. Garg, J. Yeon, M.S. Memon, S.R. Gergal Gopalkrishna Rao, S. Bugazia, T.M. Dhandapani, A. Kannan, K. Kantamaneni, M. Win, T.R. Went, V.L. Yanamala, J.A. Mostafa // *Cureus.* – 2021. – Vol. 13 (7). – P. 16599.

115. Teodoro, J.S. Shaping of Hepatic Ischemia/Reperfusion Events: The Crucial Role of Mitochondria / J.S. Teodoro, R.T. Silva, I.F. Machado, A. Panisello-Roselló, J. Roselló-Catafau, A.P. Rolo, C.M. Palmeira // *Cells.* – 2022. – Vol. 11 (4). – P. 688.

116. Teoh, N.C. Hepatic ischemia reperfusion injury: contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly / N.C. Teoh // *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* – 2011. – Vol. 26. – P. 180–187.

117. van Golen, R.F. The damage-associated molecular pattern HMGB1 is released early after clinical hepatic ischemia/reperfusion / R.F. van Golen, M.J. Reiniers, G. Marsman // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease.* – 2019. – Vol. 1865 (6). – P. 1192–1200.

118. Wang, J. Fundc1-dependent mitophagy is obligatory to ischemic preconditioning-conferred renoprotection in ischemic AKI via suppression of Drp1-mediated mitochondrial fission / J. Wang, P. Zhu, R. Li, J. Ren, H. Zhou // *Redox Biology.* – 2020. – Vol. 30. – P. 101415.

119. Wang, J. The role and function of CD4⁺ T cells in hepatic ischemia-reperfusion injury / J. Wang, S. Xia, H. Ren, X. Shi // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2022. – Vol. 16 (1). – P. 5–11.

120. Wang, M. Role of the PI3K/Akt signaling pathway in liver ischemia reperfusion injury: a narrative review / M. Wang, J. Zhang, N. Gong // *Ann Palliat Med.* – 2022. – Vol. 11 (2). – P. 806–817.

121. Wang, P.P. Effects of non-drug treatment on liver cells apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury / P.P. Wang, X. Huang, M.W. Yang, S.Y. Fang, F.F. Hong, S.L. Yang // *Life Sciences.* – 2021. – Vol. 275. – P. 119321.

122. Wang, Y.L. Hepatoprotective effects of sevoflurane against hepatic ischemia-reperfusion injury by regulating microRNA-124-3p-mediated TRAF3/CREB axis / Y.L. Wang, Y. Zhang, D.S. Cai // *Cell Death Discov.* – 2022. – Vol. 8 (1). – P. 105.

123. Wen, S. HMGB1-associated necroptosis and Kupffer cells M1 polarization underlies remote liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats / S. Wen, X. Li, Y. Ling // *The FASEB Journal.* – 2020. – Vol. 34 (3). – P. 4384–4402.

124. Willems, P.H. Redox homeostasis and mitochondrial dynamics / P.H. Willems, R. Rossignol, C.E. Dieteren, M.P. Murphy, W.J. Koopman // *Cell Metabolism.* – 2015. – Vol. 22 (2). – P. 207–218.

125. Wu, J. The hepatoprotective effect from ischemia-reperfusion injury of remote ischemic preconditioning in the liver related surgery: a meta-analysis / J. Wu, C. Yu, X. Zeng, C. Sun // *ANZ J Surg.* – 2021. – doi: 10.1111/ans.17236.

126. Xing, Y. MiR-27a-5p regulates apoptosis of liver ischemia-reperfusion injury in mice by targeting Bach1 / Y. Xing, J. Li, S.P. Li // *Journal of Cellular Biochemistry.* – 2018. – Vol. 119 (12). – P. 10376–10383.

127. Xu, D. The triterpenoid CDDO-imidazolide ameliorates mouse liver ischemia-reperfusion injury through activating the Nrf2/HO-1 pathway enhanced autophagy / D. Xu, L. Chen, X. Chen // *Cell Death & Disease.* – 2017. – Vol. 8. – P. 2983.

128. Xue, Y. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1A aggravates fatty liver graft injury via promoting mitochondrial permeability transition / Y. Xue, H. Liu, X. Yang // *Transplantation.* – 2021. – Vol. 105 (3). – P. 550–560.

129. Yan, Z.Z. Integrated omics reveals Tollip as an regulator and therapeutic target for hepatic ischemia-reperfusion injury in mice / Z Z. Yan, Y.P. Huang, X. Wang // *Hepatology*. – 2019. – Vol. 70 (5). – P. 1750–1769.

130. Yang, X. IL-17a exacerbates hepatic ischemia-reperfusion injury in fatty liver by promoting neutrophil infiltration and mitochondria-driven apoptosis / X. Yang, C. Li, K.T.-P. Ng // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2020. – Vol. 108 (5). – P. 1603–1613.

131. Yang, Y. Ghrelin ameliorates transformation of hepatic ischemia-reperfusion injury to liver fibrosis by blocking Smad and ERK signalling pathways, and promoting anti-inflammation and anti-oxidation effects / Y. Yang, R. Liu, Y. Qu, J. Zhao, L. Tong, S. Ye, Y. Qin // *Transpl Immunol*. – 2022. – Vol. 73. – P. 101597.

132. Yin, Y. Protective effect of platinum nano-antioxidant and nitric oxide against hepatic ischemia-reperfusion injury / Y. Yin, X. Chen // *Nat Commun*. – 2022. – Vol. 13 (1). – P. 2513.

133. Yu, W. Cyclosporine a suppressed glucose oxidase induced P53 mitochondrial translocation and hepatic cell apoptosis through blocking mitochondrial permeability transition / W. Yu, X. Zhang, J. Liu // *International Journal of Biological Sciences*. – 2016. – Vol. 12 (2). – P. 198–209.

134. Zhang, H. The Role of Mitochondria in Liver Ischemia-Reperfusion Injury: From Aspects of Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial Fission, Mitochondrial Membrane Permeable Transport Pore Formation, Mitophagy, and Mitochondria-Related Protective Measures / H. Zhang, Q. Yan, X. Wang, X. Chen, Y. Chen, J. Du, L. Chen // *Oxid Med Cell Longev*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6670579.

135. Zhang, M. MicroRNA as a Potential Biomarker and Treatment Strategy for Ischemia-Reperfusion Injury / M. Zhang, J. Zhang, L. Zhu // *Int J Genomics*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 9098145.

136. Zhang, S. Role of Mitochondrial Pathways in Cell Apoptosis during He-Patic Ischemia/Reperfusion / S. Zhang, S. Rao, M. Yang, C. Ma, F. Hong, S. Yang // *Injury. Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23 (4). – P. 2357.

137. Zhang, T. Renalase attenuates mouse fatty liver ischemia/reperfusion injury through mitigating oxidative stress and mitochondrial damage via activating SIRT1 / T. Zhang, J. Gu, J. Guo, K. Chen, H. Li, J. Wang // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 21.

138. Zhang, X.J. An ALOX12-12-HETE-GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia-reperfusion injury / Z.Z. Yan, Y.P. Huang, X. Wang // *Nature Medicine.* – 2018. – Vol. 24 (1). – P. 73–83.

139. Zou, S.F. Octreotide ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury through SNHG12/TAF15-mediated Sirt1 stabilization and YAP1 transcription / S.F. Zou, Y.H. Peng, C.M. Zheng, Y.X. Fei, S.W. Zhao, H.P. Sun, J.F. Yang // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2022. – Vol. 442. – P. 115975.

ПРИЛОЖЕНИЯ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4 тел. (861) 268-36-84 факс (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК ТОФК 010349101

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России,
д.м.н., профессор

« 27 Октября 2022 г. » Т.В. Гайворонская

АКТ

об использовании предложения в учебном процессе

1. Наименование предложения: тема «Патобиохимия окислительного стресса» дисциплины «Клиническая биохимия»
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Коррекция патобиохимических нарушений при ишемически-реперфузионном поражении печени с использованием средств энерготропного действия».
3. Исполнитель: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Азимов Эрустам Адамович.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
5. Дата использования предложения: с сентября 2022 года.
6. Эффективность внедрения: материалы диссертационного исследования используются для чтения лекций и проведения семинарских занятий по теме «Патобиохимия окислительного стресса» со студентами 6-го курса лечебного и педиатрического факультетов по дисциплине «Клиническая биохимия».

Заведующий кафедрой
фундаментальной и клинической биохимии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

И.М. Быков

Автор предложения

Э.А. Азимов



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4 тел. (861)268-36-84 факс (861)268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК ТОФК 010349101

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
работе ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России
д.м.н., профессор И.В. Гайворонская
« 31 » октября 2022 г.



АКТ

об использовании предложения в учебном процессе

1. Наименование предложения: тема «Ишемически-реперфузионный синдром» дисциплины «Патологическая физиология»
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Коррекция патобиохимических нарушений при ишемически-реперфузионном поражении печени с использованием средств энерготропного действия».
3. Исполнитель: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Азимов Эрустам Адамович.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
5. Дата использования предложения: с сентября 2022 года.
6. Эффективность внедрения: материалы диссертационного исследования используются для чтения лекций и проведения семинарских занятий по темам раздела «Типовые расстройства периферического кровообращения» и «Гипоксия» со студентами 3-го курса лечебного и педиатрического факультетов по дисциплине «Патологическая физиология».

Заведующий кафедрой
общей и клинической патологической физиологии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

Автор предложения

А.Х. Каде

Э.А. Азимов



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4 тел. (861) 268-36-84 факс (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК ТОФК 010349101

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-исследовательской
работе ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России:

д.м.н., профессор

« 31 »  20 22 г.

А.Н. Редько

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: методические рекомендации по лабораторной оценке эффективности энерготропной коррекции экспериментальных патологических процессов.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Коррекция патобиохимических нарушений при ишемически-реперфузионном поражении печени с использованием средств энерготропного действия».
3. Исполнитель: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Азимов Эрустам Адамович.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
5. Место внедрения: отдел клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории.
6. Дата использования предложения: с сентября 2022 года.
7. Эффективность внедрения:
Предложенные практические рекомендации позволяют объективизировать процесс лабораторного мониторинга и оценки эффективности терапии с использованием различных энерготропных средств, таких как субстраты и кофакторы энергообмена, антиоксиданты и др.

Заведующая Центральной
научно-исследовательской лабораторией
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н.



К.И. Мелконян

Автор предложения

Э.А. Азимов