

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Попов Константин Андреевич

**ПАТОБИОХИМИЯ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫХ
ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ И СПОСОБЫ ИХ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ
КОРРЕКЦИИ (КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Быков Илья Михайлович

Краснодар – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	19
1.1 Молекулярные механизмы развития ишемически-реперфузионного синдрома	20
1.2 Функциональная роль митохондрий в регуляции окислительного гомеостаза	22
1.3 Особенности ишемически-реперфузионного повреждения печени	38
1.4 Стратегия защиты от ишемически-реперфузионных нарушений	59
1.4.1 Ишемическое кондиционирование	60
1.4.2 Фармакологическое кондиционирование	66
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	72
2.1 Дизайн экспериментальной части исследования	73
2.1.1 Характеристика и условия содержания лабораторных животных	73
2.1.2 Описание хирургических моделей сосудистой изоляции печени	75
2.1.3 Пробоподготовка биологического материала	78
2.1.4 Формирование экспериментальных групп лабораторных животных для анализа фундаментальных особенностей развития ишемически-реперфузионных повреждений печени	81
2.1.5 Формирование экспериментальных групп лабораторных животных для анализа фундаментальных особенностей развития ишемически-реперфузионных повреждений печени	85
2.2 Дизайн клинической части исследования	90
2.3 Лабораторные исследования	94
2.3.1 Определение маркеров цитолиза гепатоцитов и биохимических показателей крови	95

2.3.2	Определение показателей энергетического обмена	95
2.3.3	Определение показателей прооксидантно-антиоксидантной системы	98
2.3.4	Определение показателей микроэлементного обмена	101
2.4	Статистический анализ данных	102

ГЛАВА 3. ПАТОБИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ		
ОКСИДАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-		
РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ КРЫС 104		
3.1	Оценка динамики маркеров острого повреждения печени в эксперименте	104
3.2	Оценка динамики развития нарушений окислительного гомеостаза при ишемически-реперфузионном повреждении печени	115
3.3	Сравнение экспериментальных моделей частичной и полной сосудистой изоляции печени и почек	125
3.4	Особенности изменений окислительного гомеостаза в суспензии митохондрий и цитозольной фракции при ишемии-реперфузии печени ...	131
3.5	Исследование изменений микроэлементного гомеостаза после ишемии-реперфузии печени в эксперименте	137
3.6	Обсуждение	144
3.6.1	Анализ динамики маркеров острого повреждения печени в реперфузионном периоде	144
3.6.2	Анализ динамики развития нарушений окислительного гомеостаза	149
3.6.3	Сравнение экспериментальных моделей частичной и полной сосудистой изоляции печени и почек	153
3.6.4	Анализ изменений окислительного гомеостаза в суспензии митохондрий и цитозольной фракции	157
3.6.5	Анализ изменений микроэлементного гомеостаза в условии моделирования ишемии-реперфузии печени	161

ГЛАВА 4. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ИШЕМИЧЕСКИ- РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС	165
4.1 Оценка эффективности фармакологического preconditionирования ишемии-реперфузии печени с использованием антиоксидантов	165
4.2 Влияние модификации активности пируватдегидрогеназы на развитие ишемически-реперфузионного повреждения печени	173
4.3 Исследование возможности прооксидантного кондиционирования	176
4.4 Исследование возможности хелатотерапии ишемически- реперфузионного повреждения печени	181
4.5 Обсуждение	183
 ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	 195
5.1 Особенности патобиохимических нарушений и эффективность метаболической гепатопротекции у больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ	195
5.2 Эффективность комбинированной метаболической коррекции повреждений печени при алкогольном гепатите с использованием серосодержащих гепатопротекторов	210
5.3 Обсуждение	215
 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	 227
Выводы	235
Практические рекомендации	238
Перспективы дальнейшей разработки темы	240
 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	 242

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	246
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	273
ПРИЛОЖЕНИЯ	280
Приложение А. Акты внедрения	280
Приложение Б. Патенты на изобретение	287
Приложение В. Базы данных	289

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Ишемически-реперфузионный синдром широко встречается в хирургической практике. Так одним из распространенных приемов является временное выключение органа, на котором выполняется оперативное вмешательство, из системного кровотока для снижения объема возможных кровопотерь. Особенно это актуально для такого крупного паренхиматозного органа как печень. Другой распространенной причиной ишемически-реперфузионных повреждений (ИРП) является трансплантация, также сопровождающаяся кратковременным выключением органа из системного кровотока с помещением в консервирующую среду и последующей реваскуляризацией в организме реципиента [122]. Также ишемия и реперфузия являются одними из ключевых проблем критических состояний в реаниматологии [126]. На этапе клинической смерти происходит прекращение сердечной и дыхательной деятельности, которые восстанавливаются при успешном проведении реанимационных мероприятий. Синдром ишемии-реперфузии сопровождает нарушения кровообращения при сердечно-сосудистых заболеваниях, синдроме длительного сдавления и других многочисленных клинических ситуациях. Таким образом, ИРП печени является фактором риска неблагоприятных послеоперационных результатов, заболеваемости и смертности при хирургических заболеваниях печени и ее трансплантации [190]. Поэтому рассматриваемая проблема носит фундаментальный характер и представляет интерес для клинической медицины, а понимание сложных механизмов, лежащих в основе ИРП печени, имеет решающее значение для разработки высокоэффективных терапевтических стратегий.

Степень разработанности темы

Общепатологическими молекулярными механизмами ишемически-реперфузионного синдрома являются окислительный стресс и

цитокин/эндотоксин опосредованное повреждение [194]. Ключевое значение в патогенезе принадлежит интенсификации свободнорадикальных процессов. Многообразие источников активных форм кислорода (АФК) при ИРП печени является ее важной особенностью. Основными источниками считаются активированные клетки Купфера, нейтрофилы (НАДФН-оксидаза), цитохром P₄₅₀, ксантиноксидаза и электрон-транспортная цепь митохондрий [198, 201]. Тем не менее патобиохимические изменения при ИРП печени настолько сложны, что целостная картина и роль отдельных звеньев патогенеза не до конца понятны.

Для защиты от ИРП печени существует несколько стратегий, включая различные модификации метода ишемического кондиционирования, применение гипотермии до 10–15 °С и гипербарическую оксигенацию [73, 191]. Эффективность и целесообразность ишемического кондиционирования остается предметом дискуссий, так как существует риск дополнительного повреждения, поэтому в настоящее время более перспективным считается разработка методов медикаментозной коррекции [173]. В качестве примеров фармакологических агентов, имитирующих эффекты ишемического preconditionирования можно перечислить: аденозин, агонисты рецепторов аденозина, агонисты протеинкиназы C, препараты, открывающие АТФ-зависимые K⁺ каналы, доноры оксида азота. Многие из них имеют ограниченные перспективы внедрения в клиническую практику, есть примеры и относительно успешного использования никорандила (открывает K_{АТФ}-каналы) и аденозина, ингаляционных анестетиков, в том числе севофлурана [80, 168]. Показана возможность использования инертных газов для защиты донорской печени от ИРП при трансплантации [186]. Основным недостатком фармакологического preconditionирования является селективность действия препаратов на отдельные механизмы или сигнальные пути, а не на комплекс факторов, вызывающих синдром ишемии-реперфузии и характерных для ишемического preconditionирования [184]. С учетом ключевой роли интенсификации свободнорадикальных процессов и эндотоксикоза значительный интерес представляет разработка и апробация эффективности инфузионных препаратов с комплексным составом на основе энерготропных и антиоксидантных средств.

Цель исследования – определить ключевые патобиохимические звенья развития ишемически-реперфузионного повреждения печени и разработать способы метаболической коррекции с использованием энерготропных средств различной направленности действия.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное исследование различных экспериментальных моделей ишемии-реперфузии печени для обоснования использования конкретной модели в зависимости от цели.

2. Определить особенности развития биохимических нарушений, характеризующих цитолитический синдром и митохондриальную дисфункцию, на фоне моделирования различной по длительности ишемии и в разные сроки реперфузии при васкулярной эксклюзии печени в эксперименте.

3. Определить ключевые патобиохимические изменения, характеризующие состояние окислительного гомеостаза, в суспензии митохондрий и цитозольной фракции при ишемии-реперфузии печени.

4. Охарактеризовать особенности динамики нарушений микроэлементного гомеостаза в условии экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени.

5. Оптимизировать схему коррекции ишемически-реперфузионных повреждений печени с помощью комбинированного использования разных метаболических средств энерготропной направленности действия, оценить эффективность предложенных схем в условиях моделирования васкулярной эксклюзии у лабораторных животных *in vivo*.

6. Проанализировать потенциальную возможность использования модификаторов активности пируватдегидрогеназного комплекса (дихлорацетат натрия, липоевая кислота, пируват, кокарбоксилаза) в качестве гепатопротекторных средств в условии ишемически-реперфузионного повреждения печени.

7. Оценить принципиальную возможность и перспективу использования прооксидантов (гидропероксид трет-бутила, пероксид водорода), как имитаторов

сигнальных путей ишемического прекондиционирования, для профилактики последствий ишемически-реперфузионного синдрома.

8. Проанализировать особенности нарушений окислительного гомеостаза и повреждений печени у больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ.

9. Апробировать в клинических условиях эффективность использования комплексного инфузионного препарата, содержащего метионин и кофакторы энергообмена (ЛП-№ (002562)-(РГ-RU) от 19.06.2023), совместно с антиоксидантами прямого механизма действия (аскорбиновая и липоевая кислоты), в качестве гепатопротекторного средства в условии токсического повреждения печеночной паренхимы.

Научная новизна

В исследовании впервые:

1) проведено комплексное детальное исследование динамики патобиохимических процессов, характеризующих цитолитический синдром и митохондриальную дисфункцию, развивающихся на фоне экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени различного по длительности и объема поврежденной паренхимы (база данных RU 2025620526, от 29.01.2025, приложение Б);

2) предложены лабораторные маркеры, которые позволяют дифференцировано судить о вкладе повреждающих факторов ишемического и реперфузионного периодов в повреждение печени;

3) установлено снижение активности пируватдегидрогеназы в ткани печени при восстановлении кровотока в условии моделирования сосудистой изоляции органа. Разработан способ прекондиционирования ишемически-реперфузионного повреждения печени за счет использования активатора пируватдегидрогеназы – дихлорацетата натрия (патент № 2644305 от 08.02.2018, приложение А);

4) подтвержден выброс микроэлементов (магний, цинк, железо, кремний) в кровь из поврежденной паренхимы печени после экспериментального моделирования ее васкулярной эксклюзии;

5) проанализированы механизмы цитопротективного действия дихлорацетата натрия в условии моделирования сосудистой изоляции печени и доказана возможность введения экзогенных прооксидантных факторов для прекондиционирования ишемически-реперфузионного синдрома;

6) в экспериментальных и клинических условиях показана возможность усиления гепатопротекторного действия инфузионного препарата на основе янтарной кислоты и метионина за счет дополнительного введения антиоксидантов прямого механизма действия.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Теоретическая значимость работы заключается в выполнении комплексной характеристики патобиохимических изменений, развивающихся в условиях моделирования ишемически-реперфузионного поражения печени. Впервые представлена динамика изменений цитолитического синдрома и нарушений окислительного гомеостаза с интервалом 5 минут в течение сосудистой изоляции печени и в ранние сроки реперфузионного периода (база данных RU 2025620526, от 29.01.2025, база данных RU 2025620441, от 24.01.2025, приложение Б). Представлены и обсуждены метаболические изменения в крови, гомогенате печени, митохондриальной и цитозольной фракциях гомогената, желчи (патент № 2593340, от 10.08.2016, приложение А). Полученные данные позволили уточнить границы компенсаторных возможностей системы антиоксидантной защиты на системном и местном уровнях при сосудистой изоляции печени, оценить обратимость повреждения паренхимы, определить ряд временных интервалов и патогенетических звеньев, которые могут быть использованы для разработки диагностических технологий и терапевтических стратегий. Дисбаланс прооксидантно-антиоксидантной системы, выраженный в цитозольной фракции в условии напряжения функционального состояния ферментного звена антиоксидантной системы митохондрий, позволил обосновать перспективу совершенствования и использование комбинированных инфузионных лекарственных препаратов на основе энерготропных средств, способных не только обеспечить нормализацию энергетического обмена, снижение уровня

генерации активных форм кислорода, но и удаление избыточно накапливающихся субстратов эндогенной интоксикации, в том числе продуктов оксидативных повреждений биомолекул в цитозоле клеток. Впервые при ишемии-реперфузии печени показано снижение активности пируватдегидрогеназы в ткани органа, что служит обоснование разработки способов метаболической коррекции, нацеленной на регуляцию активности пируватдегидрогеназного комплекса (патент № 2644305 от 08.02.2018, приложение А). Анализ механизмов цитопротективного действия дихлорацетата натрия позволил предположить возможность эффекта прооксидантного preconditionирования, который был доказан введением экзогенных окислителей перед моделированием ИРП печени. Использование такого эффекта на практике затруднено потенциальной токсичностью препаратов, но открывает возможность поиска новых более безопасных и высокоэффективных стратегий использования прооксидантов как терапевтических агентов для кондиционирования ишемически-реперфузионного повреждения печени.

Практические результаты работы выражены в системе рекомендаций по экспериментальному моделированию васкулярной эксклюзии печени, оценке выраженности повреждений паренхимы органа и нарушений окислительного гомеостаза, проведению фармакологического preconditionирования и оценке его эффективности. Предложены лабораторные маркеры для оценки вклада повреждения ткани в ишемической и реперфузионной фазах патологического процесса. Сформулированы рекомендации для дальнейшей разработки и модификации инфузионных препаратов на основе средств энерготропной направленности действия. Клиническая апробация совместного использования ремаксола с аскорбиновой и липоевой кислотами у больных токсическими формами повреждения печени в практических условиях подтвердила возможность совершенствования энерготропной гепатопротекторной терапии.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена в 3 этапа: 1) экспериментальные исследования на лабораторных животных, в ходе которых были определены ключевые патофизиохимические изменения на фоне различных моделей ишемии-

реперфузии печени; 2) исследования влияния энерготропных средств и перспективных способов применения гепатопротекторов в условиях развития ишемически-реперфузионного повреждения печени в эксперименте; 3) клиническая часть исследования, основной задачей которой была апробация метаболической коррекции повреждений печени и способов лабораторной диагностики нарушений окислительного метаболизма. Экспериментальная часть исследования выполнена на лабораторных животных, которые были представлены самцами белых нелинейных крыс. Были сформированы группы животных: ложнооперированные животные, которые составили контрольную группу; животные, которым моделировали полную или частичную сосудистую изоляцию печени с различной по длительности ишемией и реперфузией без коррекции и в условиях прекондиционирования различными фармакологическими средствами. Клиническая часть исследования в соответствии с дизайном рандомизированного неконтролируемого проспективного исследования эффективности комбинированной гепатопротекторной терапии токсических повреждений печени. Лабораторный этап диссертационной работы включал анализ широкого спектра маркеров крови, гомогената печени, митохондриальной суспензии и изолированных гепатоцитов. Спектр лабораторных исследований включал определение маркеров цитолиза гепатоцитов и биохимических показателей крови, показателей энергетического обмена, состояния прооксидантно-антиоксидантной системы и микроэлементного гомеостаза.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментальное моделирование частичной сосудистой изоляции печени позволяет объективизировать анализ патобиохимических процессов и сравнение экспериментальных терапевтических подходов за счет выполнения разных по объему поражений органа и отдельного забора постишемических и интактных долей органа.

2. Дисбаланс окислительного гомеостаза в условиях моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени носит более выраженный характер в цитозольной фракции в сравнении с изменениями аналогичных характеристик митохондриальной суспензии.

3. Ишемически-реперфузионное повреждение печени после восстановления кровотока характеризуется выбросом из поврежденной паренхимы микроэлементов, в том числе железа, способного инициировать свободнорадикальные процессы и системный окислительный стресс. В этих условиях использование хелатотерапии, особенно основанной на использовании относительно селективного хелатора ионов железа, способно оказывать протективное действие и снижать выраженность повреждения печени.

4. Эффективность комбинированной энерготропной терапии ишемически-реперфузионных и токсических повреждений печени на основе использования препаратов янтарной кислоты и коферментов энергетического обмена можно повысить дополнительным введением антиоксидантов прямого механизма действия, таких как аскорбиновая и липоевая кислоты.

5. Митохондриальная дисфункция при восстановлении кровотока после сосудистой изоляции печени характеризуется сниженной активностью пируватдегидрогеназы, что в этот период затрудняет переход к наиболее выгодному аэробному окислению глюкозы. Использование регуляторов активности и коферментов пируватдегидрогеназного комплекса является перспективным направлением защиты органов от ишемически-реперфузионных повреждений.

6. Индукция низкоинтенсивного окислительного стресса введением экзогенных прооксидантов способна обеспечить эффект кондиционирования ишемически-реперфузионного повреждения печени за счет адаптивной реакции системы антиоксидантной защиты.

Степень достоверности и апробации работы

Экспериментальные работы проведены на лабораторных животных по 7–10 особей в группах. Всего было использовано 535 белых нелинейных самцов крыс. В клинической части исследования проанализированы данные 155 пациентов (по 15–30 человек в группах). Проведение исследования было одобрено независимым этическим комитетом при ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России на заседании 29 января 2021 г., протокол № 96. Лабораторный этап выполнен с использованием

современных методик и оборудования, по большей части с использованием автоматических анализаторов и коммерческих наборов реагентов, что обеспечило контроль качества и минимизацию вероятности ошибок, связанных с человеческим фактором. Дизайн исследований был построен на анализе лабораторных профилей, комплексно характеризующих состояние цитолитического синдрома и окислительного метаболизма, что позволило минимизировать ошибки, связанные с особенностями отклонений некоторых отдельных лабораторных маркеров. Обработку данных проводили с использованием программы статистического анализа AnalystSoft Inc., StatPlus.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России в рамках:

1) проекта, поддержанного грантом Кубанского научного фонда № Н-21.1/31/21 (2021–2022 гг.) «Исследование роли пируватдегидрогеназного комплекса в функционировании клетки в условиях развития ишемически-реперфузионного синдрома»;

2) проекта, поддержанного Советом по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации, конкурс СП-2545.2022.4 (2022–2024 гг.) «Разработка оптимальных схем энерготропной коррекции ишемически-реперфузионных нарушений в эксперименте»;

3) проекта, поддержанного Советом по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации, конкурс СП-525.2018.4 (2018–2020 гг.) «Особенности окислительного метаболизма в условиях развития реперфузионного синдрома и способы его коррекции»;

4) государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (от 28.01.2015 г. ч. 1, раздел 1) «Осуществление прикладных научных исследований, в том числе проведение доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов»;

5) государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121022600268-0 «Исследование молекулярных механизмов регуляции активности пируватдегидрогеназного комплекса митохондрий при развитии дисбаланса в работе ферментного звена антиокислительной защиты»;

6) комплексной темы НИР кафедры фундаментальной и клинической биохимии № 01201263445 (2011–2016 гг.) «Изучение молекулярных аспектов нарушений регуляторных механизмов пищеварительных и окислительных процессов в организме, поиск способов их метаболической коррекции»;

7) комплексной темы НИР кафедры фундаментальной и клинической биохимии № АААА-А17-117060610055-4 (2016–2021 гг.) «Изучение молекулярных механизмов и разработка инновационных биохимических подходов диагностики, мониторинга и коррекции адаптационного потенциала у лиц, работающих в экстремальных условиях, при высоких физических нагрузках и различных патологических состояниях»;

8) комплексной темы НИР кафедры фундаментальной и клинической биохимии № 121110900082-3 (2021–2026 гг.) «Исследование молекулярных механизмов патологических процессов в условиях коморбидных форм социально значимых заболеваний».

Результаты исследования были представлены и обсуждены на XIII научно-практической конференции и конкурсе научных работ молодых ученых и студентов юга России «Медицинская наука и здравоохранение» (доклад «Перспективы изучения конформационных изменений белков в качестве диагностического критерия», Краснодар, 2015 г.), XIV научно-практической конференции и конкурсе научных работ молодых ученых и студентов юга России «Медицинская наука и здравоохранение» (доклад «Изменение тиолового метаболизма при сосудистой изоляции печени у крыс», Краснодар, 2016 г.), 11-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук – основа формирования современной медицины» (доклад «Особенности нарушений антиоксидантно-прооксидантной системы и возможности их метаболической коррекции при ишемии-реперфузии печени крыс», Астрахань, 2018),

I Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы естественных наук в современном научном знании» (доклад «Особенности определения общей антиоксидантной активности биожидкостей и интерпретации результатов», Элиста, 2021), 2-й международной научно-практической конференции междисциплинарного формата «Актуальные вопросы пародонтологии и реконструктивной хирургии тканей: проблемы, достижения, инновации» (доклад «Современные возможности саливадиагностики соматических и стоматологических заболеваний», Краснодар, 2021), научно-практической конференции с международным участием «Биохимия XXI века» (доклад «Патобиохимические изменения при ишемически-реперфузионном повреждении печени», Краснодар, 2021), отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (доклад «Биохимическое обоснование перспективных направлений профилактики наркозависимости», Эсто-Садок, Сочи, 2021), VI Съезде биохимиков России (доклад «Роль функционального состояния митохондрий в ишемически-реперфузионном повреждении печени», Дагомыс, Сочи, 2019), VII Съезд биохимиков России (доклад «Механизмы протективного действия дихлорацетата натрия при ишемически-реперфузионном синдроме», Сочи, 2022), отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (доклад «Исследование роли пируватдегидрогеназного комплекса в функционировании клетки в условиях развития ишемически-реперфузионного синдрома», Эсто-Садок, Сочи, 2022), краевой конференции «Роль науки в наставничестве и педагогике» (доклад «Исследование роли пируватдегидрогеназного комплекса в функционировании клетки в условиях развития ишемически-реперфузионного синдрома», Краснодар, 2023), международном молодёжном форуме «Неделя науки – 2023» (доклад «Коррекция ишемически-реперфузионного повреждения печени с использованием хелатора ионов металлов в эксперименте», Ставрополь, 2023), V Научно-практической конференции «Экспериментальная хирургия, анестезиология и реаниматология лабораторных животных» (доклад «Сравнительный анализ экспериментальных моделей ишемически-реперфузионного повреждения печени», Москва, 2023), конференции «Биохимия человека 2024» (доклад «Связь между уровнем

употребления алкоголя и концентрацией некоторых нейропептидов и белков в сыворотке крови», Москва, 2024).

Внедрение результатов исследования

Основные фундаментальные положения, сформулированные в диссертационном исследовании, внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и кафедры химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО КалмГУ им. Б.Б. Городовикова (Элиста, Россия). Основные практические результаты диссертации внедрены в лабораторную практику Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и в лабораторную практику регионального научно-производственного центра по воспроизводству сельскохозяйственных животных ФГБОУ ВО КалмГУ им. Б.Б. Городовикова. Практические рекомендации внедрены в лечебно-диагностический процесс клинко-диагностической лаборатории Клиники ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и наркологического отделения ГБУЗ «Наркологический диспансер» министерства здравоохранения Краснодарского края, что подтверждено актами внедрения (приложение А).

Публикации по теме диссертации

Всего по материалам диссертационной работы опубликована 61 научная работа, из них 39 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, или индексируемых базой данных RSCI, 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, в том числе 22 статьи в журналах, входящих в базы цитирования Scopus и Web of Science, получено 2 патента на изобретение (приложение Б), зарегистрированы 2 базы данных (приложение В).

Личный вклад автора

Автором диссертационной работы самостоятельно проведен анализ современной отечественной и зарубежной литературы, сформулирован ряд

гипотез, в соответствии с которыми были обозначены цель и задачи исследования. Для решения обозначенных проблем в области патобиохимии ишемически-реперфузионного повреждения печени автором был разработан дизайн экспериментальной и клинической части диссертации. Автором лично было выполнено большинство экспериментальных манипуляций с лабораторными животными (70 %), большинство лабораторных исследований биохимических и биофизических параметров биологических жидкостей и тканей животных (90 %), крови испытуемых лиц клинической части работы (70 %). Диссертантом полностью самостоятельно выполнена статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала и текста работы. Выполненные исследования позволили автору получить объективные, научно обоснованные и достоверные выводы, которые были логично трансформированы в выводы и практические рекомендации. Авторский вклад в написании научных работ по теме диссертации – 80 %.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 290 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 32 таблицами и 51 рисунком. Указатель литературы содержит 261 источников, из которых 21 отечественных и 240 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Ишемически-реперфузионный синдром развивается в условиях временного полного или частичного ограничения кровоснабжения органа. Это влечет за собой изменения, связанные с ограничением снабжения ткани кислородом, энергетическими субстратами, а также с удалением конечных продуктов метаболизма из поврежденного органа в ишемическую фазу. Восстановление кровотока критически необходимо для выживания ишемизированной ткани, однако сопровождается действием новых повреждающих факторов, связанных с резким притоком кислорода и интенсификацией свободнорадикальных процессов, активацией провоспалительных факторов и других патофизиохимических звеньев, направленных на прогрессирование патологического процесса, ведущего к гибели реоксигенированных клеток и функциональной несостоятельности органов [177; 253].

В клинической практике ишемически-реперфузионный синдром широко встречается в хирургии. Так одним из распространенных приемов является временное выключение органа, на котором выполняется оперативное вмешательство, из системного кровотока для снижения объема возможных кровопотерь. Особенно это актуально для такого крупного паренхиматозного органа как печень. Другой распространенной причиной ишемически-реперфузионных повреждений является трансплантация, также сопровождающаяся максимально возможным кратковременным выключением органа с помещением в консервирующую среду и последующей реваскуляризацией в новом месте или в организме реципиента [122]. Также ишемия и реперфузия являются одними из ключевых проблем критических состояний в реаниматологии. На этапе клинической смерти происходит прекращение сердечной и дыхательной деятельности, которые восстанавливаются при успешном проведении реанимационных мероприятий.

Синдром ишемии-реперфузии сопровождается нарушениями кровообращения при сердечно-сосудистых заболеваниях, синдроме длительного сдавления и других многочисленных клинических ситуациях. Таким образом, ИРП печени является фактором риска неблагоприятных послеоперационных результатов, заболеваемости и смертности при хирургических заболеваниях печени и ее трансплантации [190]. Поэтому, рассматриваемая проблема носит фундаментальный характер и представляет интерес для клинической медицины, а понимание сложных механизмов, лежащих в основе ИРП печени, имеет решающее значение для клинического успеха трансплантаций и резекций печени.

1.1 Молекулярные механизмы развития ишемически-реперфузионного синдрома

Считается, что основное повреждающее действие при остром нарушении кровоснабжения ткани или органа оказывает не столько ишемия, как последующее восстановление кровотока или реперфузия. При этом основное повреждающее действие реперфузии связывают с явлением реоксигенации, что приводит к окислительному стрессу, клеточной гибели и функциональной несостоятельности органов [125]. Как правило запасы кислорода в тканях минимальны и расходуются в течение первой минуты васкулярной эксклюзии, тогда как запас энергетических субстратов мог бы обеспечить изолированное существование органов в течение нескольких часов. Действительно основным регулятором скорости образования активных форм кислорода (АФК) является напряжение кислорода в тканях. В норме около 95 % всего поступающего кислорода в организм восстанавливается в дыхательной цепи до воды, однако 2–5 % идет на образование АФК, которые, если не будут вовремя нейтрализованы системой антиоксидантной защиты, могут оказывать повреждающее действие или

выполнять ряд физиологических функций. Снижение или увеличение оксигенации тканей закономерно ведет к соответственно снижению или увеличению продукции свободных радикалов. Такая прямо пропорциональная зависимость наблюдается в достаточно широком интервале содержания кислорода, однако в условии достижения некоторого гипоксического минимума, индивидуального для каждой ткани, наблюдается парадоксальное увеличение генерации АФК. Следовательно, развитие окислительного стресса происходит уже в ишемическом периоде, что можно экспериментально подтвердить определением маркеров окислительных повреждений биомолекул в ткани, изъятых до восстановления кровотока [244].

В условии ишемии и гипоксии напряжение кислорода в ткани падает ниже уровня аффинности митохондриальной цитохромоксидазы и наблюдается перевосстановленность комплексов дыхательной цепи. При этом практически весь оставшийся кислород идет на образование АФК. Другим механизмом индукции окислительного стресса в ишемизированной ткани может быть активация процесса генерации АФК, индуцированного АФК (ROS-induced ROS release). Еще более значительная интенсификация окислительного стресса происходит уже в реперфузионную фазу, сопровождающуюся резким притоком крови и кислорода, характеризующуюся явлением относительной гипероксии. Таким образом, желание любыми путями восстановить полноценный кровоток может оказаться губительным. Кроме того, восстановление кровотока сопровождается вымыванием эндотоксинов и других продуктов патологического метаболизма, образовавшихся в условии гипоксии, в системный кровоток и может быть причиной полиорганных нарушений [125].

Изменения содержания кислорода в ткани, утилизация его в дыхательной цепи с образованием воды или АФК, позволяет обозначить ключевую роль митохондрий в развитии клеточных повреждений при ишемически-реперфузионном синдроме. При этом митохондрии играют ключевую роль не только в энергопродукции, но и в других взаимосвязанных сигнальных путях, обеспечивающих жизнеспособность клетки в целом [253].

1.2 Функциональная роль митохондрий в регуляции окислительного гомеостаза

Митохондрии – двумембранные органеллы с небольшим собственным геномом, основная функция которых в клетке заключается в генерации энергии в виде тепла и АТФ. Тем не менее этим функционал митохондрий не ограничивается, рассматриваемые органеллы находятся в самом центре внутриклеточных сигнальных путей, а их симбиотические взаимодействия с эукариотической клеткой обнаруживают некоторые эгоистические черты [12, 152, 182].

Одной из особенностей митохондрий является наличие собственного небольшого генома, кодирующего более 50 белков и представленного кольцевой молекулой ДНК (15–20 т.п.н.) в составе нуклеоида. В составе одной клетки организма человека может обнаруживаться от 500 до 12 900 нуклеоидов. В митохондриальном нуклеоиде идентифицированы следующие группы белков: конденсирующие белки (TRAM), ремоделирующие белки (PGC-1 α и деацетилаза SIRT1), функциональные белки (РНК полимераза фагового типа (POLRMT), мтДНК полимераза γ A и γ B (POLG и POLG2), транскрипционный фактор mtTFB2, ДНК хеликаза Twinkle, протеаза LONP1, TEFM, семейство белков MTERF и вспомогательные белки (шапероны, протеазы и др.) [99, 227].

Реализация основных функций митохондриями связана со способностью генерации мембранного потенциала за счет работы дыхательной цепи (цепь переноса электронов, электрон-транспортная цепь), локализованный на внутренней мембране. Мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$, примерно 180 мВ) является составной частью трансмембранной разности потенциалов (разность потенциалов между немитохондриальным пространством и матриксом) ионов водорода ($\Delta\mu H^+$, в норме 150–200 мВ) и в совокупности с другой составляющей (ΔpH) обеспечивает работу автономно-функционирующей АТФ-синтетазной системы и соответственно синтез АТФ. При этом в митохондриях основной вклад в $\Delta\mu H^+$ вносит $\Delta\Psi_m$, так как разница pH по обе стороны внутренней мембраны

составляет около 1 [170, 209]. Интересно, что АТФ-синтетаза способна работать как в прямом, так и в обратном направлении, что обеспечивает в условиях ингибирования дыхательной цепи генерацию мембранного потенциала за счет расходования АТФ. Это может являться косвенным доказательством необходимости поддержания определенного уровня мембранного потенциала митохондриями для выполнения некоторых других функций. Такой эффект наблюдается при гипоксии и ишемии ткани, когда на фоне даже критического дефицита АТФ в клетке митохондрии работают на поддержание уровня трансмембранного потенциала. Для ограничения такого эффекта клетка научилась продуцировать белок IF1, который препятствует обращению АТР-синтазной реакции в митохондриях в условиях закисления среды, которое наблюдается при ишемическом повреждении ткани [239].

Среди возможных функций мембранного потенциала выделяется направление транспорта веществ через внутреннюю митохондриальную мембрану. Внутренняя сторона внутренней мембраны заряжена относительно наружной всегда отрицательно, что облегчает транспорт катионов (H^+ , Me^{n+} и некоторых пептидов) внутрь органелл и удаление из них анионов (хлориды, фосфаты, карбонаты, субстраты энергообмена, нуклеотиды и др.). Так существуют белки, кодируемые ядерной ДНК, которые для направленного транспорта в митохондрии синтезируются с положительно заряженными митохондриально-направленными остатками (которые впоследствии отрезаются от зрелого белка) [232].

Митохондриальный метаболизм АФК. Ключевое участие митохондрий в энергетическом обмене связано с более широким понятием окислительного метаболизма, чем продукция АТФ в дыхательной цепи. Метаболические системы митохондрий обеспечивают поддержание редокс гомеостаза, определяемого соотношением окисленных и восстановленных метаболитов. Утилизация кислорода в дыхательной цепи сопряжена также с генерацией АФК и других свободных радикалов, которые помимо повреждающего действия, выполняют ряд физиологических функций, участвуя в регуляции внутриклеточного протеолиза,

активации некоторых транскрипционных факторов, изменения митохондриальной ДНК и клеточной дифференцировки [253]. Гиперпродукция АФК и активных форм азота (АФА) особенно на фоне сниженного защитного потенциала антиоксидантной системы приводит к окислительному и нитрозильному стрессу соответственно. В разных структурах митохондрий описано около десятка потенциальных источников генерации АФК (таблица 1.1) [170].

Таблица 1.1 – Митохондриальные источники генерации активных форм кислорода

Локализация в митохондриях	Фермент
Внешняя мембрана	моноаминоксидаза
	цитохром b5-редуктаза
Наружная сторона внутренней мембраны	дигидрооротат дегидрогеназа
	α -глицерофосфат дегидрогеназа
Внутренняя сторона внутренней мембраны	α -кетоглутарат дегидрогеназа
	сукцинатдегидрогеназа
Внутренняя мембрана	I комплекс ЦПЭ
	III комплекс ЦПЭ
Матрикс митохондрий	аконитаза

Сам принцип работы цепи переноса электронов, предполагающий перенос по одному электрону от окисляемого субстрата на конечный акцептор – кислород, предполагает возможность побочного образования АФК вследствие утечки электронов от различных редокс-переносчиков. Тем не менее митохондрии оснащены мощной системой антиоксидантной защиты, способной нейтрализовать как АФК собственной генерации, так и другие свободные радикалы из внешних источников [144, 170].

Восстановление кислорода в окислительном метаболизме происходит ступенчато с помощью одноэлектронных доноров-кофакторов. Такими кофакторами могут быть ФАД и ФМН, которые могут подвергаться одноэлектронному восстановлению и окислению с образованием радикальных форм. Это происходит, например, при переносе 2 электронов от субстратов-доноров на редокс-компоненты, способные принимать только по 1 электрону (железосерные кластеры, гемовое железо цитохромов). Другой возможностью

генерации АФК является взаимодействие одноэлектронных редокс-компонентов непосредственно с молекулярным кислородом с образованием супероксидного анион-радикала [151].

Одноэлектронное восстановление кислорода с образованием супероксидного анион-радикала ($\bullet\text{O}_2^-$) можно рассматривать в качестве ключевого инициирующего процесса генерации АФК, так как скорость данной реакции минимальна. Скорость этой реакции определяется концентрациями реагирующих веществ – кислорода и восстановленной формой одного из АФК-генерирующих центров [249]. Причины и механизмы изменения концентрации или напряжения кислорода в ткани достаточно ясны, хотя как указывалось выше снижение уровня кислорода ниже некоторого критического уровня при гипоксии или ишемии может сопровождаться лавинообразным усилением генерации АФК. Увеличение степени восстановленности редокс-компонентов может наблюдаться на фоне усиления клеточного дыхания или ингибирования цепи переноса электронов с формированием блока потока электронов и протонов. Последнее событие характерно для гипоксии или ишемии ткани, что и может быть основной причиной интенсификации свободнорадикальных процессов уже в ишемический период. Снижение уровня восстановленности редокс-компонентов наблюдается при действии разобщителей тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования и ограничении поступления энергосубстратов. Таким образом, уровень генерации АФК не обязательно прямо коррелирует с активностью клеточного дыхания, как уже было замечено обратный процесс наблюдается в первой фазе ишемически-реперфузионного синдрома. Однако восстановление кровотока и резкий приток кислорода в реперфузионном периоде сопровождаются ростом как интенсивности тканевого дыхания, так и продукции АФК [46].

В качестве ключевых источников АФК в митохондриях рассматривают комплексы I (митохондриальная протон-транслоцирующая НАДН: убихинон-оксидоредуктаза) и III (митохондриальная убихинол: цитохром c-оксидоредуктаза), а также целый ряд оксидоредуктаз. Продукция АФК комплексом I подтверждена как при прямом, так и при обратном переносе

электронов. Основными источниками в комплексах I и III ЦПЭ являются железосерные кластеры N-1 и семихинонная форма коэнзима Q [149, 203].

Потенциал-зависимый обратный перенос электронов в комплексе I в отсутствии НАД⁺ ведет к восстановлению кофакторов фермента и в аэробных условиях сопровождается генерацией АФК. Кофакторами фермента являются ФМН, 8-9 железосерных кластеров и связанный убихинон. Считается, что резкое усиление генерации АФК при реперфузии может быть связана с особенностями работы комплекса I. При ишемии и отсутствии субстрата (НАДН) и кислорода комплекс I переходит в деактивированное состояние, а обратный процесс активации – достаточно медленный процесс, также ингибируемый свободными жирными кислотами и ионами Me^{2+} . Таким образом при реперфузии и восстановлении обычной концентрации кислорода в ткани наблюдается задержка активации комплекса I и резкое усиление генерации АФК, так как деактивированный I комплекс не окисляется другими редокс компонентами ЦПЭ, но окисляется молекулярным кислородом. Ключевым генератором АФК в митохондриях наряду с комплексом I является дигидролипоамиддегидрогеназа (ДЛДГ), ФАД-содержащий фермент [147, 195].

Комплекс II или сукцинатдегидрогеназа, которая включает в качестве редокс-кофакторов ФАД, 3 железосерных комплекса, центр связывания гема b и убихинона, также может выступать в роли мощного источника АФК, тем не менее реальный вклад в условия *in vivo* в генерацию АФК этого фермента остается предметом дискуссий [114].

К потенциальным источникам АФК относят также такие митохондриальные ферменты, как дигидрооротатдегидрогеназа, активный центр которой содержит ФМН, митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа (ФАД-содержащий фермент). Существуют ферменты, генерация АФК для которых является основной функцией. Это прежде всего НАД(Ф)Н-оксидазы, представляющие собой мембраносвязанные ферментные комплексы, которые непосредственно переносят электроны от НАД(Ф)Н на кислород с образованием частицы супероксидного анион-радикала. Митохондриальная изоформа NOX4 в отличие от других изоферментов образует пероксид водорода, однако ее функции не до конца ясны [164].

Во внешней мембране митохондрий локализован ФАД-содержащий димерный фермент – моноаминоксидаза (МАО), представленный двумя изоформами МАО-А и МАО-В, отличающихся сродством к различным субстратам. Естественными метаболитами МАО являются такие токсичные вещества как пероксид водорода, альдегиды и катионы аммония. Считается, что МАО-А играет значительную роль в реперфузионном повреждении миокарда [158]. Еще одним потенциальным источником АФК в митохондриях является белок ускоритель старения $p66^{shc}$, который транслоцируется в матрикс митохондрий из цитозоля на фоне развития окислительного стресса. На модельных системах показано, что активность этого белка сравнима с наиболее мощными источниками АФК и реализуется за счет способности принимать электроны от цитохрома с последующей их передачей на молекулярный кислород [228].

Генерация АФА в митохондриях возможна за счет работы митохондриальной изоформы NO-синтазы (mtNOS), локализованной преимущественно во внутренней мембране. Интересно, что другой важной функцией митохондрий является регуляция кальциевой сигнализации, а активность mtNOS зависит от концентрации ионов Ca^{2+} , что может быть одним из механизмов регуляции митохондриальных функций, опосредованным продукцией NO. Образование оксида азота в непосредственной близости от компонентов электрон-транспортной цепи может обеспечивать регуляцию их активности. Основным эффектом митохондриального NO считается ингибирование клеточного дыхания в результате нитрозилирования и выключения цитохромоксидазы и некоторых других компонентов дыхательной цепи (в меньшей степени NO способен ингибировать I, II комплексы ЦПЭ и аконитазу). Таким образом, оксид азота может оказывать влияние на уровень потребления кислорода клеткой, образования АФК и регуляцию окислительного стресса. Например, клетки, максимально приближенные к кровеносным капиллярам, имеют более высокую активность mtNOS и низкую активность цитохромоксидазы, в тоже время по мере удаления вглубь ткани скорость синтеза NO становится более низкой. Это позволяет обеспечить более равноценное распределение кислорода в ткани независимо от локализации конкретных клеток [70, 226].

Интересно, что интенсивность генерации АФК находится также под управлением мембранного потенциала. Зависимость между уровнем $\Delta\Psi_m$ и скоростью продукции АФК описывается экспоненциальной кривой, так что небольшое увеличение мембранного потенциала сопровождается интенсивным ростом генерации АФК. Существование такого эффекта объясняет протективное влияние мягких разобщителей при ишемически-реперфузионном синдроме и окислительном стрессе [47].

Система антиоксидантной защиты митохондрий. Ключевая роль митохондрий в генерации АФК определяет существование механизмов удаления свободных радикалов и других реактивных молекул. Митохондриальная система антиоксидантной защиты имеет все основные черты данной подсистемы системы неспецифической резистентности организма, такие как многоуровневость и комплексность (рисунок 1.1). Ферментное звено включает несколько групп энзимов:

1) ферменты, не требующие для своего функционирования восстановительных эквивалентов, такие как супероксиддисмутаза-2 (Mn-SOD) и каталаза. MnСОД наиболее активна в митохондриях и модулируется сиртуином SIRT3, тогда как каталаза в значительных количествах обнаружена только в митохондриях гепатоцитов [93, 161];

2) ферменты, требующие для своей регенерации после нейтрализации АФК тиоредоксина (Trx) и тиоредоксинредуктазы (TRx2), такие как пероксиредоксины 3 и 5 (Prx3 и Prx5). Пероксиредоксины – одни из ключевых ферментов, обеспечивающих нейтрализацию более 90 % пероксида водорода, содержащегося в митохондриальном матриксе в концентрации около 60 мкМ [156, 241];

3) ферменты, зависящие от глутатиона и глутатионредуктазы (GR), такие как глутатионпероксидазы 1 и 4 (GPx1 и GPx4) и глутаредоксины [49]. Последние два также зависят от уровня НАДФН, поэтому ферменты, обеспечивающие регенерацию этого восстановительного эквивалента, также косвенно относят к группе антиоксидантных факторов. В матриксе митохондрий этот процесс реализуется за счет функционирования НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, НАДФ-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы («malic enzyme») и

трансгидрогеназы [257]. Предполагают, что пероксиредоксины, а также глутатион-зависимые ферменты, такие как тиоредоксин и тиоредоксинредуктаза, выполняют основную роль по нейтрализации АФК в митохондриях.

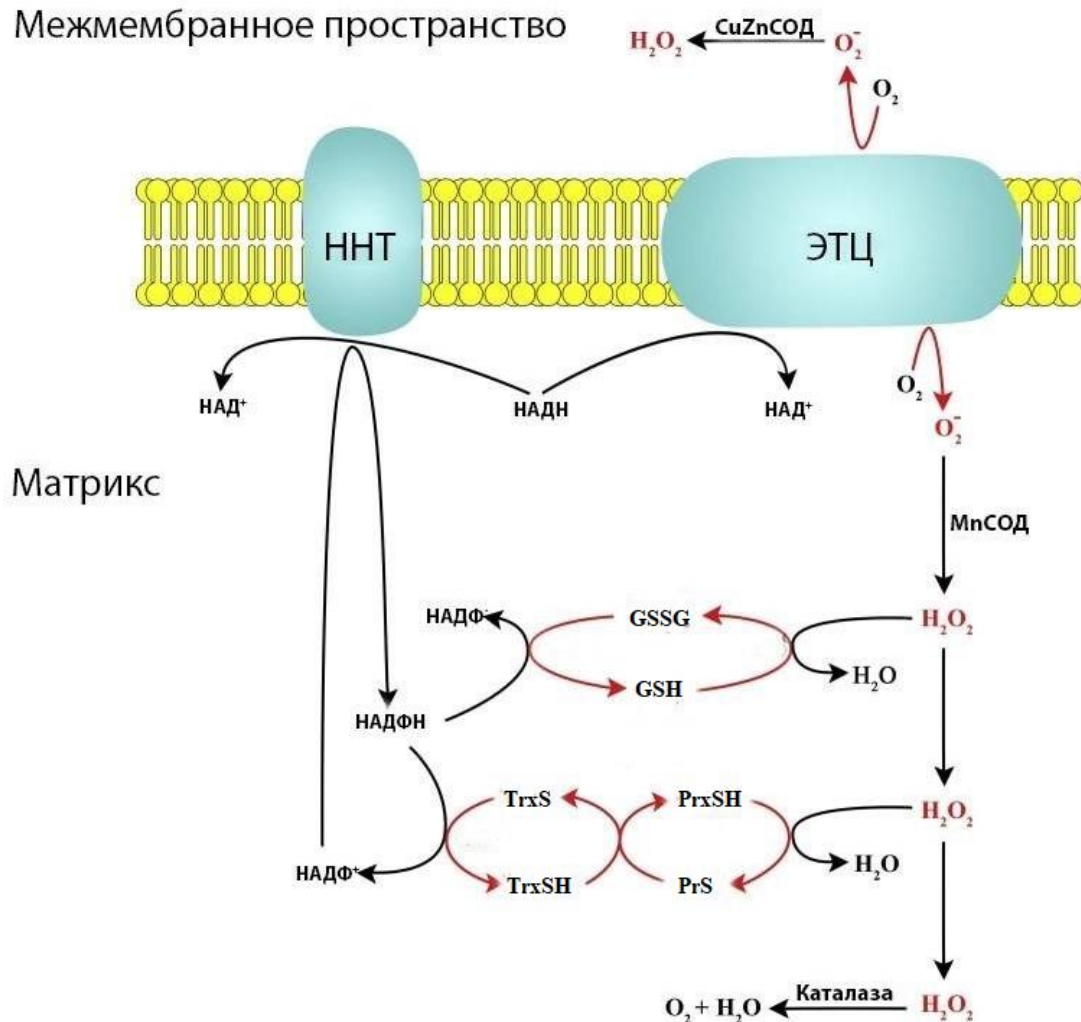


Рисунок 1.1 – Митохондриальная антиоксидантная система [87]:

ННТ – никотинамид нуклеотид трансгидрогеназа; ЭТЦ – электронтранспортная цепь; СОД – супероксиддисмутаза; G – глутатион; Тгх – тиоредоксин; Prx – пероксиредоксин

Основным регулятором редокс гомеостаза в клетке является транскрипционный фактор Nrf2, в физиологических условиях ингибированный в цитозоле клетки путем связывания и убиквитирования белком Keap1. Таким образом обеспечивается постоянная деградация Nrf2. Однако при окислительном стрессе в результате модификаций Keap1 происходит активация Nrf2 с последующим перемещением его в ядро и активацией ряда генов, обеспечивающих антиоксидантный ответ. Экспрессия таких генов обеспечивает синтез ферментов

антирадикальной защиты (СОД, GST, ГПО, КАТ), белки теплового шока, противовоспалительные факторы – гемоксигеназа-1 и циклооксигеназа-2 [175, 243].

Помимо энергопродукции митохондрии принимают участие в некоторых анаболических процессах, обеспечивающих синтез большого количества молекул, в том числе регуляторных или сигнальных молекул [182]. Начальные этапы синтеза стероидов, гема, железосерных кластеров и мочевины происходят в матриксе митохондрий. В синтезе гема некоторые конечные реакции также происходят в митохондриях, в частности феррохелатазная реакция. Компарментализация синтеза данных метаболитов обеспечивает более тонкий контроль со стороны двух его клеточных отделов.

Участие митохондрий в кальциевой сигнализации обусловлено существованием нескольких систем транспорта ионов Ca^{2+} , обеспечивающими как вход, так и выход ионов из органеллы. Это электроногенная система, переносящая рутенийчувствительным способом катион по градиенту его концентрации; система, осуществляющая обмен Ca^{2+} натрий-зависимым и натрий-независимым способом; система, обеспечивающая выход накопленного в митохондриях кальция через индукцию мегаканала [254].

Другой важной функцией митохондрий является способность обеспечивать перенос энергии и транспорт химических веществ за счет формирования сети протяженных митохондриальных структур в клетках и даже между клетками за счет надклеточных структур – нексусов. Имеются данные, свидетельствующие о возможности передачи мембранного потенциала по подобным структурам, что способно снизить зависимость тканей от диффузии кислорода к отдаленным от капилляров клеткам. Считается, что подобные структуры могут быть также способны транспортировать сигнальные молекулы и липофильные вещества по градиенту их концентрации в клетке [148]. Наконец сами митохондрии способны активно и целенаправленно транспортироваться в разные отделы клетки. Так известно, что митохондрии движутся по нейронным отросткам в направлении синапсов, в которых наблюдается высокая скорость метаболизма и концентрация ионов кальция. Поврежденные митохондрии доставляются к аутофагосомам где

происходит их утилизация. В эукариотических клетках транспорт митохондрий обеспечивается по микротрубочкам, а от структурной целостности тубулинового скелета зависят основные параметры биоэнергетики клетки [166].

Другим важным свойством митохондрий, относящимся к динамике органелл, является способность их слияния и фрагментации (деления) [211, 218]. От соотношения скорости или активности этих противоположных процессов зависит состояние структуры митохондриального ретикулума (сеть митохондрий в клетке). Процессы слияния или деления митохондрий обеспечивают распределение органелл между дочерними клетками в процессе клеточного деления, фрагментация митохондрий наблюдается также в процессе активации программы апоптоза. Клетки в физиологических условиях обычно имеют хорошо разветвленную сеть митохондриального ретикулума, что ассоциировано с более стабильным внутриклеточным синтезом АТФ. Перестройка митохондриального ретикулума происходит при изменениях клеточного метаболизма. Так метаболические стрессы сопровождаются фрагментацией митохондрий, что призвано локализовать повреждения и препятствовать их распространению на соседние органеллы [252]. Основная задача, которая решается при слиянии митохондрий – обмен содержимым матрикса, особенно генетическим материалом). Также отмечается, что процессы слияния и деления митохондрий принимают участие в осуществлении «контроля качества» органелл [34]. Перераспределение мтДНК внутри сети органелл позволяет удалить нефункциональные и поврежденные фрагменты. Описаны некоторые интересные особенности реакции митохондриального энергообмена, которые могут быть связаны с формированием сложных сетей органелл, на резкое значительное увеличение нагрузки. С одной стороны, при гипоксических или ишемических состояниях наблюдается асинхронный ответ митохондриального метаболизма и некоторая иррадиация возбуждения в системе генерации энергии. С другой стороны, в ответ на действие практически любого повреждающего или стрессорного фактора наблюдается генерализованная реакция всех митохондрий организма. Особенно остро проявляется такое взаимодействие разных

митохондрий у больных с тяжелыми формами хронических заболеваний, энергетические ресурсы которых существенно ограничены [40].

Процесс слияния митохондрий сопряжен с необходимостью попарного слияния четырех мембран и реализуется у млекопитающих с помощью белков OPA1 (восемь изоформ, обладающих ГТФазной активностью) и митофузинов (2 изоформы – Mfn1 и Mfn2). Считается, что роль митофузинов сводится к притягиванию мембран и формированию стыковочного контакта, а за слияние внутренних мембран отвечает ГТФаза OPA1 [150, 235].

В делении митохондрий у млекопитающих участвуют динаминоподобные ГТФазы (DRP1), которые способны к олигомеризации и формированию спиралевидных структур, опоясывающих митохондрии. Последующий гидролиз ГТФ способствует сокращению образованного белкового комплекса и разделению мембран органелл. В клетках млекопитающих для запуска фрагментации органеллы DRP1 связывается со специализированными рецепторами на наружной мембране митохондрии: Mid49, Mid51 или Mff, но также может связываться с Fislp [115].

Регуляция процессов митохондриального слияния и деления предположительно осуществляется на уровне изменения мембранного потенциала и соотношения НТФ/НДФ в межмембранном пространстве. Так известно, что внесение в среду разобщителей тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования вызывает фрагментацию митохондриального ретикулума. Считается, что деполяризованные митохондрии, для которых характерно сниженное значение $\Delta\Psi_m$ и что может служить признаком наличия повреждений, подвергаются убиквитинированию и последующей деградации. Ключевую роль в этом процессе играет E3 убиквитинлигаза Паркин и киназа PINK1 [157].

Участие митохондрий в апоптозе. Как уже было указано, митохондрии занимают одно из центральных положений в клеточной сигнализации, в том числе регулирующей запрограммированную клеточную гибель. Ключевым процессом для терминальных стадий запуска апоптоза является высвобождение апоптозиндуцирующего фактора и цитохрома c из митохондрий вследствие

нарушения проницаемости мембран [154]. Существует несколько теорий, описывающих механизмы повреждения внешней митохондриальной мембраны. Согласно одной из них нарушение ионных градиентов с разных сторон мембран при сохранении высокого содержания белка в матриксе митохондрий ведет к набуханию последних, расправлению внутренней мембраны и разрыву внешней с высвобождением проапоптотических факторов. Согласно другой теории выход проапоптотических факторов может быть не связан с нарушением целостности внешней мембраны. Даже в интактном состоянии внешняя мембрана митохондрий характеризуется относительно высокой проницаемостью за счет пориновых ионных каналов VDAC, способных пропускать молекулы с молекулярной массой до 1,5 кДа. Инициация апоптоза может сопровождаться олигомеризацией белка BAX и формированием гигантских пор, способных пропускать цитохром с. В процессе пермеабилзации наружной мембраны также принимают участие белки семейства bcl-2, имеющих до 4-х доменов, обозначаемых BH1-4 [88, 89, 210].

Повреждение внешней мембраны ведет к высвобождению цитохрома с из межмембранного пространства в цитозоль, где он взаимодействует с фактором активации апоптотической протеазы (ARAF-1) и индуцирует образование апоптосомы, которая далее участвует в запуске каспаз 3 и 9. Параллельно цитохрому с дополнительно высвобождаются белки Smac/DIABLO и сериновая протеаза OMI/HtrA2, обеспечивающие запуск фрагментации ДНК независимо от действия каспаз [258].

Особенности биоэнергетики митохондрии в условиях нормоксии и гипоксии. В отношении вариантов переноса протонов и электронов по дыхательной цепи на конечный акцептор выделяют 2 группы субстратов: НАД-зависимые субстраты (пируват, α -кетоглутарат, малат, изоцитрат) и ФАД-зависимые субстраты (сукцинат). При нормальном обеспечении клетки кислородом вклад окисления НАД-зависимых субстратов составляет около 55–65 %, а на долю окисления сукцината II комплексом (сукцинатдегидрогеназа) приходится 25–30 %. Концентрация сукцината в матриксе митохондрии в условиях

нормоксии составляет всего 0,2–0,4 ммоль/л. В условии развития гипоксии снижается напряжение кислорода в тканях, что ведет к преобладанию менее эффективных анаэробных энергетических процессов и выключению ряда энергозависимых процессов и реакций. Ответ физиологических и метаболических систем на гипоксию включает срочные механизмы компенсаторного характера и долгосрочные механизмы адаптации. Для ишемии, в патогенезе которой гипоксия является одной из составляющих, большее значение имеют краткосрочные механизмы, поскольку часто ишемия связана с вопросом выживания клеток и ткани в целом. Так в гипоксических условиях происходит переход от окисления НАД-зависимых субстратов к преимущественному окислению сукцината. Это основной и самый быстрый механизм адаптации к гипоксии, который включается сразу на фоне обратимого ингибирования I комплекса дыхательной цепи и компенсаторной активации II комплекса [132]. Реализация этого механизма связана с обеспечением нескольких других регуляторных функций, включая активацию экспрессии HIF-1 и других генов, обеспечивающих долгосрочную адаптацию к гипоксическому состоянию, а также запуск сигнальных путей, связанных с сукцинат-зависимыми рецепторами GPR91 [53, 100]. В этих условиях вклад окисления сукцината в энергообеспечение клетки может достигать 70–80 %, а концентрация янтарной кислоты в тканях и крови возрастает в десятки раз, достигая уровня 4–7 ммоль/л в первые 30 минут после начала гипоксии и прогрессирует в ранние сроки реоксигенации. Эндогенными источниками сукцината выступают аспартат- и глутаматзависимые аминотрансферазные реакции. Также в этих условиях антигипоксическими свойствами обладают экзогенно введенные препараты янтарной кислоты, пополняющие пул сукцината для оптимальной компенсации энергодефицита при недостатке кислорода в гипоксических или ишемизированных тканях [52].

Можно также выделить ряд патофизиологических фаз или стадий развития синдрома адаптации к гипоксии: тревоги, резистентности и истощения. В начальной стадии тревоги усиливается окисление различных субстратов митохондриями для максимального возможного в данных условиях

энергообеспечения клетки. Более продолжительное воздействие гипоксии на метаболические системы характеризуется развитием следующей стадии – резистентности. На этой стадии необходимо решить вопрос бесперебойного обеспечения клетки кислородом и субстратами для окисления, а также организовать удаление токсичных побочных и конечных продуктов метаболизма. Кроме того, следует ограничить активность цепи переноса электронов для снижения генерации АФК и ее повреждения. На этой стадии в основном реализуется работа цикла Кребса и ЦПЭ по короткой и кинетически более выгодной схеме с преимущественным окислением сукцината. Долговременная адаптация на этом этапе может формироваться за счет синтеза новых ферментов энергетического обмена. В ситуации, когда компенсаторные механизмы не справляются с требованиями по энергообеспечению клетки или если не успевают удаляться продукты катаболизма, что особенно актуально для ишемии, развивается следующая стадия – истощение. На этом этапе снижается скорость окисления энергосубстратов, в том числе сукцината, снижается активность сукцинатдегидрогеназы, наблюдается разобщение окислительного фосфорилирования. В этих условиях развивается полноценное гипоэнергетическое состояние, орган переходит на режим максимальной экономии энергии, вследствие чего страдает его нормальный функционал, в отдельных клетках запускаются апоптотические сигнальные механизмы. Объем повреждения органа или ткани, а также преимущественная гибель клеток путем апоптоза или некроза будет зависеть от длительности гипоксии / ишемии и степени (например, частичная или тотальная ишемия).

Участие митохондрий в развитии ишемически-реперфузионного синдрома. Митохондриальная дисфункция – основной механизм повреждения клеток при развитии синдрома ишемии-реперфузии. При васкулярной эксклюзии ткани развиваются нарушения, охватывающие практически все системы этих органелл. Основные патогенетические звенья в этих условиях – гипоэнергетическое состояние, окислительный стресс и активация апоптоза. Снижение продукции АТФ митохондриями быстро ведет к развитию

гипоэнергетического состояния, так как уменьшение данной характеристики только на 10–20 % ведет к подавлению 70–80 % всех энергозатратных процессов. От уровня АТФ также зависит направление клеточной гибели, так как апоптоз требует некоторого количества энергии. Инициация апоптотического пути возможна при открытии большого количества митохондриальных пор, при этом минимальное количество таких пор практически не влияет на состояние клетки, а генерализованное открытие пор ведет к некрозу. Еще одним фактором, зависящем от состояния митохондрий и обуславливающим выбор пути клеточной гибели, является уровень кальция в цитозоле. Перемещение избыточного количества ионов кальция из цитозоля в матрикс митохондрий может привести к открытию пор и индукции апоптоза [106].

При синдроме ишемии-реперфузии параллельно снижению продукции АТФ наблюдается усиление генерации АФК. Основными причинами интенсификации свободнорадикальных процессов является перегрузка дыхательной цепи электронами на фоне ингибирования цитохромоксидазы, а также снижение активности ферментов системы антиоксидантной защиты, в частности MnСОД. Снижение активности цитохромоксидазы еще значительно сказывается в реперфузионном периоде, когда нарушается передача электронов на кислород, снижается доля полного четырехэлектронного восстановления кислорода и увеличивается доля генерации АФК комплексами цепи переноса электронов.

Интенсификация свободнорадикальных процессов сопровождается повреждением митохондриальных структур. Повреждается мтДНК, накапливаются индуцированные АФК мутации в геноме, репарация которого сильно ограничена, особенно в сравнении с ядерным геномом. Другой чувствительной мишенью АФК являются липиды митохондриальных мембран. На этом фоне снижается уровень фосфолипидов, особенно кардиолипина, высвобождаются свободные жирные кислоты, лизофосфатиды. Жирные кислоты являются известными разобщителями тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, что усугубляет течение гипоэнергетического состояния, формируя один из порочных кругов митохондриальной дисфункции при ишемически-реперфузионном синдроме

[152]. Нарушение структуры мембран также способствует высвобождению цитохрома *c* через внешнюю мембрану, что является сигналом к апоптозу. Повреждение мембран может быть также опосредовано действием фосфолипазы A_2 , активируемой ионами кальция, активно поглощаемыми митохондриями при увеличении их концентрации в цитозоле [44].

Энерготропная фармакологическая коррекция. Нарушения энергетического обмена и митохондриальная дисфункция – универсальные патологические процессы, характерные для многих заболеваний. Тем не менее существуют различные фармакологические воздействия, направленные на нормализацию энергообмена, структуры и функции митохондрий. Некоторые авторы даже выделяют целое направление «биоэнергетическая фармакология», а иногда даже используется термин «митохондрий-ориентированная терапия». Наиболее актуальной является метаболическая поддержка энергообмена на патофизиологической стадии резистентности к гипоксии, которая может преследовать цель реактивации быстрых путей окисления субстратов, в особенности янтарной кислоты.

В качестве потенциальных фармакологических средств, которые могут использоваться для коррекции нарушений энергообмена, рассматриваются субстраты энергообмена (сукцинат, малат, глутаминовая кислота и др.), кофакторы или коферменты энергообмена (рибофлавин, никотинамид, убихинон, липоевая кислота, тиаминпирофосфат и др.), антиоксиданты (биофлавоноиды, глутатион, аскорбиновая кислота, токоферол и др.), эссенциальные фосфолипиды, антиацидемические препараты (дихлорацетат натрия, димефосфон) и др. [163]. При этом действие регуляторов энергообмена имеет чаще всего неспецифический полиорганный характер.

Существуют также подходы, позволяющие воздействовать на отдельные патофизиохимические звенья (молекулярные мишени), участвующие в реализации ишемически-реперфузионных повреждений. С учетом ключевой роли в реализации защитных эффектов ишемического preconditionирования особый интерес представляют активаторы митохондриальных АТФ-зависимых калиевых

каналов (K_{ATF} -каналы), имитирующие эффекты preconditionирования. К таким веществам относят дифосфонуклеотиды, диазоксид, никорандил, b-эстрадиол и тестостерон. Также интерес представляют вещества, способные препятствовать открытию митохондриальных мегапор (mPTP), такие как циклоспорин А и его аналоги, убихинон и др. В некоторых ситуациях протективным действием обладают эффекторы митохондриальной NOS.

1.3 Особенности ишемически-реперфузионного повреждения печени

Ишемически-реперфузионные повреждения печени наблюдаются не только при васкулярной эксклюзии в ходе хирургических вмешательств непосредственно на данном органе, но также при нарушениях центральной гемодинамики, при развитии шока разной этиологии [126]. Кровоснабжение печени обеспечивается двумя источниками – воротной веной и печеночной артерией. Оперативные вмешательства на паренхиме органа осложняются массивными кровотечениями, поэтому с целью минимизации кровопотерь было разработано и внедрено множество методов, основанных на временном пережатии питающих сосудов и выключении печени из системного кровотока. Наиболее опасное осложнение после оперативных вмешательств на печени – это ее послеоперационная дисфункция и печеночная недостаточность, которые являются следствием ишемии-реперфузии. Печень – крупный орган, выполняющий множество метаболических функций, с чем связана его высокая зависимость от кислорода и чувствительность к гипоксии. Центральная метаболическая роль этого органа обуславливает возможность формирования полиорганной недостаточности при обширных поражениях паренхимы.

Выделяют 2 типа ишемии печени – холодовая и тепловая. Тепловая ишемия ($\sim 37^\circ\text{C}$) наблюдается при широком спектре клинических ситуаций, таких как трансплантация, резекция или травма печени, эмболия воротной вены, цирроз,

шок различной этиологии, когда наблюдается снижение кровотока и первичное повреждение гепатоцита. В этом случае развивается классическая картина ИРС, характеризующаяся повреждением структуры и функций митохондрий, ингибированием окислительного фосфорилирования и снижением продукции АТФ, фрагментацией митохондрий, митохондриальной аутофагией и апоптозом [177]. Холодовая ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) ишемия наблюдается в условиях трансплантации печени, при хранении органа в консервационной среде до его имплантации реципиенту. Холодовая ишемия сочетается с тепловой, которая ей предшествует или развивается следом после трансплантации и восстановления кровотока. В этом случае первичным считается повреждение синусоидальных эндотелиальных клеток печени и нарушение микроциркуляции. Низкая температура замедляет метаболизм и потребление клетками O_2 , обеспечивая более длительное поддержание структуры и функции митохондрий [122, 136].

Степень ИРП зависит от длительности ишемии, методов сосудистой изоляции, исходного состояния паренхимы органа и использования гепатопротекторов или иных способов коррекции. Даже 5-ти минутная непрерывная ишемия печени крыс может привести к повреждению органа по данным гистологической картины и биохимических изменений. Серьезным испытанием при ИРП является исходно скомпрометированная паренхима органа вследствие стеатоза или возрастных изменений [104]. При этом следует понимать, что в реальной клинической практике ИРС развивается как раз в условии патологически-измененной паренхимы печени.

Динамика ишемически-реперфузионного повреждения печени

В ишемической фазе при прекращении кровотока в органе развивается кислородное голодание гепатоцитов, переход на анаэробный метаболизм с использованием запасов гликогена, снижение генерации АТФ. В условиях сокращения продукции АТФ и по мере расходования макроэргических соединений нарушается работа энергозависимых клеточных систем, том числе мембранной Na^+/K^+ АТФазы, обеспечивающей распределение ионов по обе стороны клеточной мембраны. Возрастает внутриклеточная концентрация ионы

натрия, повышается осмолярность клеточного содержимого, развивается отек клеток и нарушение структуры печеночных ацинусов. Нарушение целостности клеточных мембран также провоцирует увеличение концентрации ионов кальция в цитозоле, а позже и в матриксе митохондрий, который активно накапливает эти ионы. Тем не менее это приводит к снижению уровня трансмембранного митохондриального потенциала и дальнейшему прогрессированию гипохроэнергетического состояния. Повреждение митохондрий сопровождается высвобождением цитохрома *c* и инициированием запрограммированной клеточной гибели. Нарушения энергетического обмена помимо вышеперечисленного характеризуется переходом к анаэробным процессам и закислением среды. Для компенсации ацидоза активируются ионные каналы, обеспечивающие обмен Na^+ и H^+ , тем не менее это способствует нарастанию концентрации ионов натрия в цитозоле и усугублению клеточного отека. Уже на стадии ишемии наблюдается интенсификация продукции АФК и окислительный стресс. Закономерно при продолжении ишемии патологический процесс завершается клеточной гибелью, преобладающей формой которой является некроз [22, 102]. При этом ишемия печени в течение 20–40 минут сопровождается в целом обратимыми изменениями, что подтверждается морфологической оценкой, подтверждающей увеличение фенестрации синусоидальных эндотелиальных клеток, нормализующейся после 2–3-х часовой реперфузии. Однако дальнейшее увеличение длительности ишемического периода до 60–90 минут ведет уже к усилению повреждения клеток и необратимым изменениям.

Выделяют 2 основные фазы развития повреждения печени после начала реперфузионного периода. Иногда эти две фазы характеризуют как внутриклеточную и внеклеточную. Первая или начальная фаза, которая длится от начала реперфузии до 6 часов после восстановления кровотока в основном связана с изменениями окислительного метаболизма в паренхиме органа. Активация клеток Купфера происходит под действием эндогенных молекул DAMP, имеющих ядерное, цитозольное и митохондриальное происхождение, которые начинают образовываться и высвобождаться, как было указано ранее,

еще в ишемическом периоде из поврежденных гепатоцитов [95]. Считается что клетки Купфера играют критическую роль в регуляции развития и прогрессирования ИРП печени. Активированные клетки Купфера в свою очередь продуцируют провоспалительные факторы, такие как АФК, ИЛ-1 β , ФНО- α и др., способствующие миграции и активации CD4 $^{+}$ Т-лимфоцитов в печень и развитию воспалительной реакции [102, 216, 233]. Адгезия и активация макрофагов и рекрутированных нейтрофилов ведет к их избыточной активации и секреции большого количества провоспалительных медиаторов. Прогрессирование клеточного отека связано с переходом к реперфузионному периоду, интенсификации генерации АФК и перекисному окислению липидов мембран. Разрушение клеточных структур сопровождается началом воспалительной реакции, выбросом вазоконстрикторов, например, эндотелина и тромбоксана A $_2$, которые усиливают адгезию и агрегацию тромбоцитов. Отек эндотелиальных клеток, стаз микрососудистого русла и рекрутирование лейкоцитов приводят к микроциркуляторным нарушениям, в результате которых несмотря на восстановление кровотока большая часть паренхимы остается в ишемизированном состоянии [22, 102]. Обычно рассматривается роль клеток Купфера как источников провоспалительных факторов, усугубляющих повреждение печени. Однако, экспериментальные исследования показали, что на фоне предварительного истощения клеток Купфера ИРП печени только усиливается, а в ходе прогрессирования ИРС в печени снижается количество макрофагов вследствие их гибели [24, 78, 192]. В этих условиях для восполнения и замены макрофагов печени происходит привлечение в поврежденные участки моноцитов костномозгового происхождения, частично наблюдается пролиферация оставшихся резидентных печеночных макрофагов [90, 233].

Следующая фаза (поздняя) развивается спустя 6–48 часов после реперфузии и обусловлена преимущественно воспалительными изменениями. Эта фаза реперфузии опосредована рекрутированными нейтрофилами за счет действия цитокинов и компонентов системы комплемента. Через 6–24 часов после восстановления кровотока увеличивается продукция ИЛ-1 β , ИЛ-12, ФНО- α , ИЛ-6,

участвующих в поражении гепатоцитов. Считается, что избыточная активация воспаления является основным механизмом повреждения печени в реперфузионный период, а также обеспечивает распространение патологического процесса на системном уровне [255]. Так было показано развитие повреждения почек, кишечника, легких при ишемии-реперфузии печени. Первоначально активация клеток Купфера происходит в очаге патологического процесса – в ишемизированной ткани, но по мере перехода к этапу реперфузии активация клеток распространяется на интактные участки органа, что часто служит причиной развития печеночной недостаточности даже при относительно небольшом частичной васкулярной эксклюзии. Противовоспалительные факторы, такие как ИЛ-18, ИЛ-13, а также фактор роста гепатоцитов обладают цитопротективным эффектом при ишемически-реперфузионном синдроме. В развитии воспалительного процесса при ишемически-реперфузионного синдрома важную роль играет активация гена NF- κ B [29, 237]. В ранние сроки после ишемии происходит быстрая активация генов p38, p44/42, стресс-активирующей протеинкиназы и c-Jun N – терминальной киназы митогенактивирующей протеинкиназы и др. Считается, что критическую роль в регуляции ишемии-реперфузии печени играют клетки Купфера, однако нейтрофилам отводится ведущее значение после их рекрутирования, контролируемого все теми же клетками Купфера, в поврежденную печень в реперфузионную стадию. Повреждающее действие нейтрофильных гранулоцитов связано с генерацией АФК и высвобождением протеолитических ферментов [122]. В результате массивного некроза гепатоцитов наблюдается высвобождение аминотрансфераз в сыворотку крови. Преимущественной формой гибели клеток в этот период является некроз, но также реализуются такие формы запрограммированной клеточной гибели, как апоптоз, ферроптоз и пироптоз [199].

Роль макрофагов в ИРП печени связана с их фенотипом – повреждение паренхимы обеспечивается провоспалительными макрофагами, которые преобладают в ранние сроки реперфузии [24]. Задача этих клеток обеспечить удаление разрушенных клеток и дебриса и подготовить ткань к восстановлению.

Восстановление ткани связано с переключением фенотипа макрофагов на репаративный тип [141]. Репаративные макрофаги секретируют противовоспалительные цитокины (ИЛ-10) и факторы роста, обеспечивающие регенерацию печени. Нейтрофилы также оказывают повреждающее действие и стойкое воспаление при ИРП печени, действуя как фагоциты, однако также имеются данные об участии нейтрофилов в стимуляции репаративных процессов [165]. Важным элементом регенерации печени является восстановление микроциркуляторного русла за счет пролиферации сохранных синусоидальных эндотелиальных клеток печени и их предшественников [51]. Восстановлению печени способствуют также звездчатые клетки в основном путем образования внеклеточного матрикса [131]. Таким образом о восстановлении печени после ИРП известно немного, относительно механизмов повреждения ее паренхимы. Однако понятно, что в этом процессе играют существенную роль пролиферация гепатоцитов, регуляция воспаления и восстановление микрососудистого русла. Очищение некротизированной ткани печени связано с активностью разных типов фагоцитов, звездчатыми клетками и другими клетками с последующей пролиферацией гепатоцитов и восстановлением соединительнотканной архитектуры печени.

Патобиохимические механизмы развития ишемически-реперфузионного повреждения печени

К основным патогенетическим звеньям развития ишемически-реперфузионного повреждения печени относят: 1) гипознергетическое состояние, преобладание анаэробного гликолиза, лактатацидоз; 2) митохондриальная дисфункция; 3) нарушения редокс-состояния, усиление генерации АФК и АФА; 4) ионный дисбаланс, нарушение гомеостаза ионов кальция; 5) нарушение микроциркуляции; 6) высвобождение цитокинов и хемокинов, активация купферовских клеток и инициация воспалительного процесса; 7) индукция протеинкиназ; 8) дисфункция эндотелия. Эти процессы запускаются в ишемическую фазу и дополнительно усиливаются при реперфузии [194].

Ишемия ткани наблюдается при прекращении кровотока и включает 3 основных компонента: прекращение доставки кислорода (гипоксия), прекращение

доставки топливных молекул и других субстратов (однако, в печени имеется свой значительный запас) и прекращение выведение продуктов метаболизма – эндотоксинов. Гипоксия и истощение АТФ способствуют развитию гипоэнергетического состояния, накоплению лактата (молочной кислоты) и смещению кислотно-щелочного баланса в сторону метаболического ацидоза (лактатацидоз). Токсичность кислых метаболитов является одной из причин нарушений клеточной сигнализации, активности ферментов и механизмов поддержания гомеостаза.

На фоне дефицита питательных веществ и энергосубстратов, нарушений энергетического обмена, которые наблюдаются при ишемии и гипоксии запускается процесс аутофагии, который считается защитным механизмом и представляет собой поглощение и утилизацию поврежденных внутриклеточных структур, включая белки и целые органеллы [221, 256]. Многочисленные исследования подтверждают наличие связи между ИРП печени, регуляцией энергообмена, окислительного стресса, воспалительной реакции и активностью аутофагии. Большинство исследований подтверждают гепатопротекторное действие аутофагии при ИРП печени [111]. Это также подтверждается фармакологическим управлением аутофагией – активатор спермидин снижает интенсивность воспаления и облегчает течение ИРП, ингибиторы АМРК подавляют аутофагию и нивелируют протективное действие спермидина [79].

В регуляции аутофагии при ИРП печени участвует целый ряд сигнальных факторов и путей: mTOR, АМРК, MAPKs, SIRT1/FoxO3 α , PI3K/АКТ, Keap1/Nrf2/HO-1 и др. [33, 60]. Одну из центральных ролей в инициации воспаления и окислительного стресса при ИРП печени играют каскады митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), представленных 3-мя уровнями серин/треониновых протеинкиназ (МАРККК, МАРКК, МАРК). При ИРП печени наиболее изучены функции киназ ERK 1/2, JNK и p38 [68, 142]. Эти киназы активируются при стрессе, воспалении и ИРП печени различными факторами: АФК, факторами клеточной пролиферации и дифференцировки, гормонами, компонентами внеклеточного матрикса. Ингибирование путей

вышеперечисленных MARKs как правило способствует гепатопротективному действию [42, 48, 250], который сопровождается снижением генерации АФК, повышением функционального состояния системы антиоксидантной защиты, уменьшением активности ММП и в целом противовоспалительным эффектом.

Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPAR) представлены 3-мя типами PPAR α , PPAR β/δ и PPAR γ . Последний из которых играет критическую роль в регуляции развития ИРП печени, на фоне которой возрастает его экспрессия и активность. При этом PPAR γ оказывает защитное действие, которое, как считается, опосредовано активацией пути FАM3A, пути АКТ, ингибированием активности транскрипционного фактора NF- κ B и снижением выраженности окислительного стресса [169].

Регуляторную роль при развитии ИРП печени играют также некодирующие РНК. МикроРНК, состоящие обычно из 18–25 нуклеотидов, представляются наиболее важными регуляторными факторами на посттранскрипционном уровне. Известно, что экспрессия некоторых микроРНК (микроРНК-1246, -148а, -1290, 450b-5p) увеличивается после трансплантации печени [71, 116]. Ишемические повреждения печени сопровождаются увеличением содержания микроРНК-122, -223 в сыворотке крови в десятки и сотни тысяч раз, что значительно превышает уровень традиционных маркеров повреждения паренхимы (аминотрансферазы – АСТ, АЛТ) и положительно коррелирует с ними [187]. Интересно, что ингибирование экспрессии микроРНК-122 ассоциировано с более легким течением ИРП печени, что делает эту молекулу потенциальной терапевтической мишенью [193]. Длинные некодирующие РНК (днкРНК), такие как TUG1, AK139328, HOTAIR и MALAT1 также участвуют в регуляции аутофагии, апоптоза и воспаления при ИРП печени [138, 139].

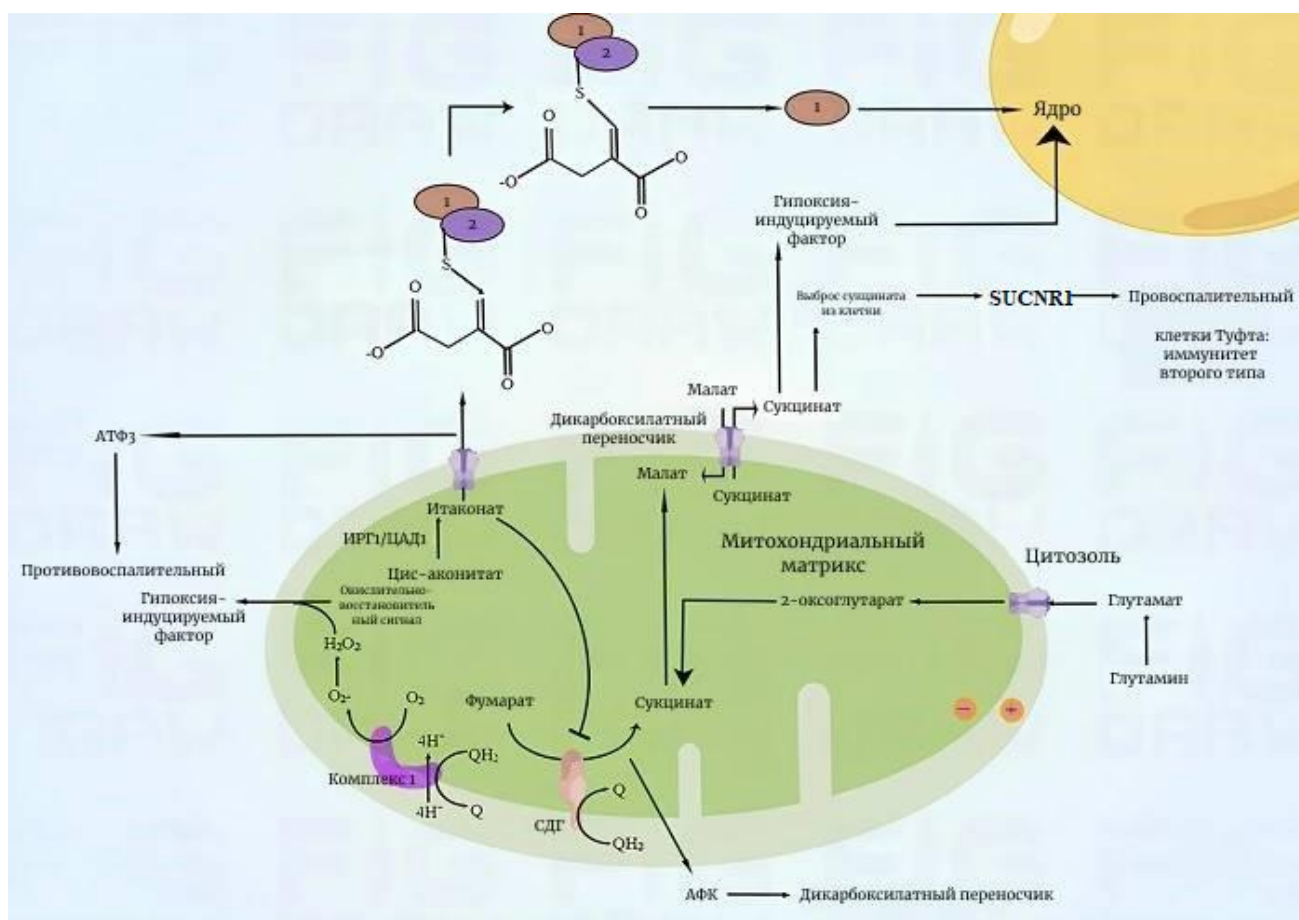
Молекулярные механизмы повреждения – окислительный стресс и цитокин/эндотоксин опосредованное повреждение, общие для ишемически-реперфузионного повреждения других органов и которые также участвуют в патогенезе других типов поражения паренхимы печени. Ключевая роль традиционно принадлежит интенсификации свободнорадикальных процессов, но

основными источниками считаются активированные клетки Купфера, нейтрофилы (НАДН оксидаза), цитохром P₄₅₀, ксантиноксидаза и электрон-транспортная цепь митохондрий. При этом активация купферовских клеток происходит практически сразу и начинается еще в ишемическом периоде, тогда как миграция нейтрофилов с последующей активацией механизмов «окислительного взрыва» требует нескольких часов после восстановления кровотока. В основном принято считать, что ключевую роль в генерации АФК играют митохондрии, в печени им отводится важная, но не основная роль. Тем не менее, генерация АФК митохондриями – практически постоянный процесс, в отличие от действия индуцируемых источников АФК, таких как НАДФН-оксидазы (рисунок 1.3).

Отдельного рассмотрения заслуживают особенности митохондриальной дисфункции при ИРП печени, что связано с центральной ролью митохондрий в энергообмене и многих сигнальных путях, а также тем, что около 28 % объема гепатоцита занимают эти органеллы [208]. Помимо энергетической функции митохондрии играют исключительную роль в регуляции гомеостаза ионов Ca²⁺. Нарушение клеточной энергетики приводит к нарушению регуляции баланса электролитов и высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль. Митохондрии способны накапливать большое количество этих ионов, однако чрезмерное поступление Ca²⁺ в митохондриальный матрикс приводит к падению мембранного потенциала и является одним из факторов открытия мегапоры mPTP и набухания органелл [246, 254]. Открытие пор mPTP приводит к свободному поступлению через внутреннюю митохондриальную мембрану веществ размером до 1,5 кДа, падению мембранного потенциала и уровня генерации АТФ. Набухание митохондрий в этих условиях ведет к разрыву мембран и высвобождению в цитозоль медиаторов апоптоза, что соответственно запускает процесс клеточной гибели [107]. Другим механизмом повышения проницаемости митохондрий является активация цитозольной фосфолипазы A2, гидролизующей фосфолипиды мембран [251]. Генерация АФК и нарушение проницаемости митохондриальных мембран при ИРП являются основными причинами гибели клеток паренхимы печени [163].

Развитие ИРП печени усугубляет нарушение митохондриального биогенеза и динамики, которые в широком диапазоне патологических стимулов позволяют адаптировать митохондриальные функции к стрессовым воздействиям. Наиболее очевидным проявлением является снижение количества митохондрий и митохондриальной ДНК в гепатоцитах на фоне ИРП [219]. Снижается экспрессия белков, ответственных за процессы биогенеза митохондрий, которая регулируется сигнальными путями AMPK-PGC-1 α , индукция которых оказывает протективное действие при ИРП печени [32].

Изменение митохондриальной динамики при ИРП печени характеризуется усилением процесса деления на фоне гипознергетического состояния за счет увеличения уровня экспрессии белков Drp1 и Fis1. При этом чрезмерное деление митохондрий имеет патологический характер, так как вызывает фрагментацию митохондриальной сети, открытие пор mPTP и усиление апоптоза клеток [103, 252]. Ингибирование процессов митохондриального деления оказывает протективное действие при ИРП печени. Для этого можно использовать гормон иризин, который подавляет экспрессию Drp1 и Fis1, активирует биогенез митохондрий и защищает клетки от апоптоза [115, 119]. Отдельного внимания заслуживает процесс митофагии – удаление поврежденных митохондрий посредством пути PINK1/Parkin [40, 157, 205]. При ИРП накопление поврежденных митохондрий, продуцирующих большое количество АФК является серьезной проблемой, требующей активации митофагии. Активация митофагии при гипоксии является компенсаторным механизмом, позволяющим удалять поврежденные структуры, а также снижать общее количество митохондрий, адаптируя метаболизм клеток к бескислородным условиям [189]. Поэтому активация митофагии, как и аутофагии, является защитным механизмом и позволяет снизить последствия ИРП печени. При этом индуцирующим фактором при ишемии является нехватка энергосубстратов и других питательных веществ, но ограничивает активацию митофагии нехватка энергии, требующейся для формирования аутофагосом [37, 38]. Это еще один порочный круг ИРС, при котором ишемия и повреждение митохондрий не позволяют реализоваться в полной мере адаптивным клеточным механизмам.



SUCNR1 – сукцинатный рецептор 1; СДГ – сукцинатдегидрогеназа

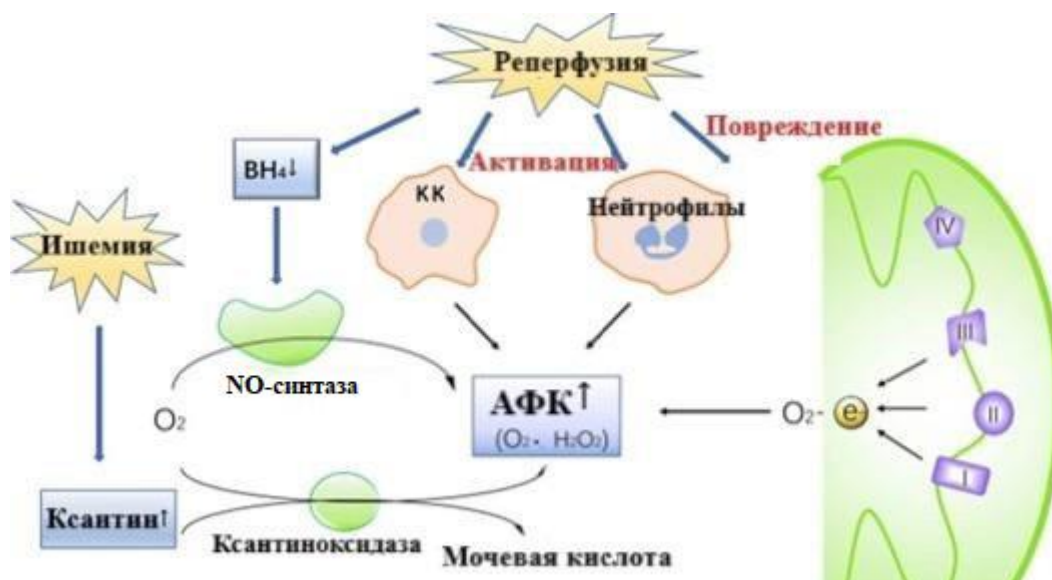


Рисунок 1.3 – Источники АФК при ишемии-реперфузии печени [198]:

КК – клетки Купфера; АФК – активные формы кислорода

Быстрое движение электронов по дыхательной цепи может закончиться утечкой с образованием продуктов 1, 2-х или 3-х электронного восстановления O_2 . Любой из компонентов цепи переноса электронов потенциально способен отдавать одиночные электроны на кислород с образованием $\bullet O_2^-$, при этом описано 11 различных компонентов митохондрий, способных генерировать АФК. Кроме митохондриальной дыхательной цепи АФК генерируются ксантиноксидазой (КО), моноаминоксидазой (МАО), митохондриальным белком $p66^{Shc}$, аконитазой, содержащей железосерный кластер, НАДФН-оксидазой, NOS и другими источниками. Многообразие источников АФК при ИРП печени является ее важной особенностью.

НАД-зависимые дегидрогеназы, такие как пируватдегидрогеназный и α -кетоглутаратдегидрогеназный комплексы способны образовывать АФК как побочные продукты в экстремальных условиях – высокое содержание субстрата и соотношение НАДН/НАД⁺, которое наблюдается в постишемической ткани [25].

Кроме митохондрий лизосомы способны активно участвовать в генерации АФК при патологических состояниях, таких как ИРС. За счет аутофагической деградации клеточных структур в лизосомах накапливаются редокс-активные железосодержащие компоненты, способные в реакции Фентона с перекисью

водорода образовывать наиболее реакционноспособные и опасные гидроксильные радикалы $\bullet\text{OH}$ [121]. Окислительный стресс в лизосомах особо опасен ввиду потенциальной возможности перекисного окисления мембран органеллы и повышению ее проницаемости с высвобождением в цитозоль агрессивного содержимого, в том числе катепсинов.

Окислительные процессы являются обязательным компонентом функциональной активности эндоплазматического ретикулума, который обеспечивает синтез и фолдинг белков. Одним из элементов фолдинга является образование дисульфидных мостиков между тиоловыми группами 2-х остатков цистеина, которое катализируется протеиндисульфидизомеразой, побочно образующей молекулу H_2O_2 на каждую $-\text{S}-\text{S}-$ связь [220]. Стресс эндоплазматического ретикулума – один из распространенных метаболических стрессов, характеризующийся нарушениями формирования нативных конформаций белков в клетке и накоплением неправильно свернутых протеинов. Данное патологическое состояние наблюдается при ИРП печени, а на фоне снижения защитного потенциала системы антиоксидантной защиты дополнительно в этих условиях не успевает утилизироваться перекись водорода [202].

Одним из мощнейших источников перекиси водорода и супероксидного анион-радикала при ИРП печени являются НАДФН-оксидазы (NOX) 7 типов: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 и DUOX2. После ишемии печени и других органов наблюдается высокая активность NOX, ингибирование которой обеспечивает защитный эффект. Описана некоторая специфическая локализация изоферментов NOX, хотя она достаточно условная, но считается, что NOX-2 отвечает за способность фагоцитов генерировать АФК, что проявляется при ИРП печени [164].

На фоне развития ИРС одной из первых активируется генерация АФК NOX, не считая митохондриальной дыхательной цепи, а потом уже подключаются другие источники. Различные формы синтаз оксида азота (NOS) образуют NO из аргинина. Выделяют три основные изоформы NOS: нейрональная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS). Последняя широко представлена в иммунных клетках, таких как макрофаги.

Одну из ключевых ролей в генерации АФК при ИРП печени играет ксантиноксидаза (КО), которая использует кислород в качестве акцептора электронов. При ишемии усиление катаболических процессов и распада АТФ характеризуется накоплением гипоксантина, окисляемого КО до ксантина и мочевой кислоты с образованием супероксида и перекиси водорода [101]. При ИРС наблюдается эффект разобщения КО и превращения их в супероксид-генерирующий фермент. Основной причиной эффекта разобщения КО считается снижение концентрации ее кофермента тетрагидробиоптерина (Н₄БП) и субстрата – аргинина вследствие активации аргиназы [181].

Мощная система антиоксидантной защиты в норме позволяет нейтрализовать практически все свободные радикалы и реактивные молекулы, образующиеся в дыхательной цепи митохондрий. Однако на фоне ИРП печени наблюдается снижение активности ферментов, таких как Мп-СОД и каталаза (КАТ), а также снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов [197]. Наблюдается снижение активности митохондриальной НАДФ⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы 2 ИДГ2, которая обеспечивает пополнение пула восстановленного НАДФН, необходимого в свою очередь для восстановления глутатиона – ключевого регулятора клеточного редокс-гомеостаза [109]. Защитные реакции при ИРП печени связаны с активацией ряда рецепторов, сигнальных путей и транскрипционных факторов. Так в эксперименте при ИРП печени у мышей показана высокая активность рецептора PPAR γ , что проявлялось повышением активности СОД и КАТ, снижением активности НАДФН-оксидазы [176]. Основным регулятором окислительного гомеостаза на уровне транскрипции является фактор Nrf2, который в неактивном состоянии ингибирован белком Keap1 в цитозоле. АФК и АФА вызывают конформационные модификации Keap1 в результате которых Nrf2 активируется и транслоцируется в ядро, где связывается с Antioxidant Response Elements (AREs) [62]. Гены ARE, запускаемые транскрипционным фактором Nrf2, кодируют ферменты антиоксидантной защиты (СОД, глутатион-S-трансфераза, ГПО, КАТ), белки теплового шока и противовоспалительные белки (гемоксигеназа-1 и циклооксигеназа-2) [84, 196].

Ведущее значение в генерации АФК и секреции цитокинов играет активация клеток Купфера. Так в течение первых 2-х часов клетки Купфера участвуют в продукции АФК, ФНО- α и ИЛ-1 β , которые активируют синусоидальные эндотелиальные клетки печени, экспрессирующие адгезивные молекулы ICAM-1 и VCAM-1 [206]. Активация звездчатых клеток печени также приводит к секреции провоспалительных факторов [122]. В результате наблюдается хемотаксис нейтрофилов в очаг ИРП печени, вызывающих дополнительные повреждения за счет дополнительной генерации АФК и хлора (НОС1), высвобождения протеолитических ферментов, таких как матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП участвуют в разрушении структур внеклеточного матрикса и других белковых структур, в том числе регуляторных пептидов. Длительная и высокая активация ММП (особенно ММП-2, -3, -8, -9, -10, -12 и -13) в печени ассоциирована с более тяжелыми последствиями ИРП [207]. Деградация внеклеточного матрикса затрудняет регенерацию паренхимы печени, способствует миграции лейкоцитов, а отделение клеток от соединительнотканной основы способствует их апоптозу или аноикису. ММП можно рассматривать как медиаторы рекрутирования нейтрофилов и молекулярную мишень для терапевтического воздействия при ИРП печени. ММП-9 обеспечивает разрушение фенестраций синусоидальных эндотелиальных клеток печени с образованием больших щелей. Ингибирование этого фермента оказывает протективное действие, связанное с восстановлением структуры поврежденных синусоидальных клеток [230]. Медиаторы ангиогенеза, такие как HGF, IGF-1 и VEGF, также индуцируют пролиферацию синусоидальных эндотелиальных клеток и регенерацию печени после ИРП [69, 159].

Другими важными медиаторами повреждения печени при ИРП являются противо- / провоспалительные цитокины, центральное место среди которых занимает ФНО- α . ФНО- α опосредует синтез и секрецию АФК, эпителиального нейтрофил-активирующего пептида ENA-78, хемокинов ICAM-1, VCAM-1, Р-селектина, транскрипционного фактора NF- κ B и митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs). Кроме ФНО- α в реализации эффектов ИРП печени и ее

регенерации принимают участие ИФН- γ , ИЛ-1 β , -6, -10, -12, -13, -23, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF). ИЛ-1 β путем активации транскрипционного фактора NF- κ B и воспалительного белка макрофагов MIP-2 способствует агрегации и адгезии лейкоцитов, а также усиливает синтез NO. ИЛ-12 и ИЛ-23 также стимулируют синтез ИЛ-17, что также способствует синтезу ФНО- α и рекрутированию нейтрофилов в поврежденную паренхиму печени. ИЛ-6 выполняет защитные функции, способствуя увеличению биосинтеза глутатиона и ингибированию окислительного стресса. ИЛ-10 и ИЛ-13, продуцируемые клетками Купфера и Т-клетками, также опосредуют защитные функции, стимулируя регенерацию печени. Функция VEGF, который продуцируется клетками Купфера, синусоидальными эндотелиальными клетками и гепатоцитами, неоднозначна, а HGF, который секретируется преимущественно клетками Купфера, оказывает защитное действие.

Острая воспалительная реакция и иммунный ответ являются обязательными компонентами ИРП печени, при котором наблюдается рекрутирование в очаг патологического процесса и активация клеток врожденной и адаптивной иммунной систем [63]. Иницирующим событием считается выброс DAMP (дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны), в том числе митохондриального происхождения, из поврежденных и разрушенных клеток печени. Среди рецепторов распознавания DAMP в ИРП печени участвуют Toll-подобные рецепторы (TLR) 4/7/9 и NOD2 [117, 180]. Участие CD4⁺ Т-клеток в воспалении при ИРП печени подтверждает важную роль адаптивного иммунного ответа. Взаимодействие врожденного и адаптивного иммунного ответа характеризуется участием целого ряда клеток: клетки Купфера, нейтрофилы, дендритные клетки, NK-клетки, клетки-супрессоры миелоидного происхождения, CD4⁺ Т-клетки и др. [64] Наблюдается поляризация макрофагов по M1 фенотипу. Такие макрофаги способны секретировать ИЛ-23, ИЛ-1 β , ФНО- α , CCL1 и некоторые другие цитокины, которые опосредуют рекрутирование и активацию нейтрофильных гранулоцитов, что приводит к

продукции протеаз и АФК, дополнительно повреждает печень и является одной из причин формирования порочного круга ИРП печени [63].

Дополнительным повреждающим фактором в реперфузионный период является снижение продукции NO эндотелиальной синтазой оксида азота, что сопровождается преобладанием вазоконстрикторных эффектов и усугублением ограничения кровотока в постишемической ткани печени. Нарушение микроциркуляции – ключевая мишень в поражении печени при синдроме ишемии-реперфузии. Нарушение микроциркуляции связано также со сдвигом в гемокоагуляции, в котором большую роль играют тромбоциты, аккумуляция которых в синусоидах наступает уже через 20 минут реперфузии и в дальнейшем прогрессирует. В терминальных артериолах и постсинусоидальных везикулах печени в этом периоде обнаруживается роллинг и адгезия тромбоцитов. При этом роль NO, особенно экзогенных форм (например, нитрит натрия), зависит от дозировки. Высокие дозы оксида азота за счет активного участия в образовании пероксинитрита при взаимодействии с супероксидным анион-радикалом, оказывают дополнительное повреждающее действие и усиливают окислительный стресс [128, 222].

В последнее время показана интересная роль газотрансмиттеров в реализации повреждения печени при ишемически-реперфузионном синдроме. Помимо оксида азота (NO) к данной группе малых молекул относят монооксид углерода (CO) и сероводород (H_2S), которые способны свободно проникать через мембраны клеток и действовать как высвобождаемые нейронами трансммиттеры, не взаимодействуя при этом со специфическими рецепторами. Разные газотрансмиттеры способны регулировать окислительный стресс путем изменения кислородтранспортной функции крови за счет модификации гемоглобина и его сродства к кислороду. Снижение сродства гемоглобина к кислороду способствует облегчению его высвобождения в ткани, росту напряжения кислорода и окислительному стрессу, тогда как увеличение сродства ведет к ослаблению проявлений оксидативного стресса [204].

Наиболее изучен NO и тем не менее его роль не до конца ясна. С одной стороны, монооксид азота выступает в роли мощного вазодилататора, способного

улучшать микроциркуляцию в очаге патологического процесса, с другой стороны данный оксид может участвовать в усилении окислительного стресса путем образования пероксинитрита и других АФА. Кроме того, присоединение NO к гемоглобину способствует уменьшению сродства гемоглобина к кислороду, что регулирует доставку O_2 к тканям. Тем не менее при ишемически-реперфузионном синдроме применение донаторов оксида азота способствуют активации защитных механизмов, связанных с системой транспорта кислорода и регуляцией редокс-потенциала постишемической ткани печени [167].

Эндогенный монооксид углерода способен оказывать нейротрансмиттерный и вазодилатирующий эффекты. Влияние его на микроциркуляцию заключается в снижении агрегации тромбоцитов, активации фибринолитической системы, ингибировании пролиферации гладкомышечных клеток, фибробластов и Т-лимфоцитов, снижении интенсивности провоспалительных реакций, подавлении апоптоза, что должно оказывать протективное действие при синдроме ишемии-реперфузии. Подтверждаются эти данные защитным эффектом, реализующимся при введении экзогенных донаторов CO [242].

Интересное действие оказывает сероводород, который может проявлять мощное антиоксидантное действие, родственное органическим низкомолекулярным тиолам. Сам сероводород способен активно нейтрализовать свободные радикалы, а также оказывать косвенное антиоксидантное действие за счет влияния на активность и экспрессию генов ферментов системы антиоксидантной защиты, модуляции активности митохондрий, восстановления дисульфидных связей в молекулах белков. В результате при ишемически-реперфузионном синдроме продукция H_2S сопровождается снижением уровня агрегации тромбоцитов, степени окислительного стресса, повреждения митохондрий, апоптоза и аутофагии. Кроме того, сероводород способен непосредственно взаимодействовать с K_{ATP} -каналами, которые считаются конечными эффекторными белками ишемического preconditionирования [105, 112].

Традиционно выделяют целый ряд форм клеточной гибели, среди которых после ИРП печени преобладающими являются некроз и апоптоз. Считается, что

апоптотическому пути гибели подвергаются около 50–70 % погибших синусоидальных эндотелиальных клеток и 40–60 % погибших гепатоцитов. Стеатозные или возрастные изменения печени могут изменить расклад, при котором преимущественным типом гибели будет некроз. Определенный вклад в гибель клеток при ИРП вносят ферроптоз и пироптоз [82]. Подтверждением роли ферроптоза является активация маркера Ptgs2 на фоне ИРП печени, аналогично увеличивается активность маркеров пироптоза – инфламماسома и каспаза 1 [123, 137]. Интересным наблюдением является высвобождением из ткани поврежденной печени экзосом, которые с током крови распространяются по организму и способны даже проникать через гематоэнцефалический барьер и вызывать гибель нейронов. Это может быть одним из механизмов распространения патологического процесса на системном уровне и причиной развития полиорганных нарушений после ИРП печени [79].

Еще одной особенностью печени, связанной с чувствительностью к ИРС, является дифференцировка или зонирование паренхиматозных и непаренхиматозных клеток в структуре печеночной дольки, разделенной на три отдельные concentрические зоны [41]. Выделяют перипортальную, перицентральною и промежуточную или среднюю зоны, что обусловлено особенностями структуры и кровоснабжения. Кровь поступает в печеночные дольки из портальных узлов и течет радиально в направлении дренирующей центральной вены через синусоидальные кровеносные сосуды (рисунок 1.4).

Таким образом, клетки расположенные по ходу тока крови отличаются по градиенту концентрации метаболитов и напряжения кислорода. Так одним из лимитирующих факторов для метаболизма является кислород, в том числе по причине того, что только $\frac{1}{4}$ перфузии приходится на артериальную кровь, а остальная часть – кровь из воротной вены, оттекающая из кишечника. По ходу кровотока к центральной вене концентрация кислорода постепенно снижается, поэтому наиболее энергозатратные метаболические процессы протекают преимущественно в перипортальной области, а перицентрально наиболее чувствительна к гипоксии и ишемии, так, как и в нормальных условиях здесь

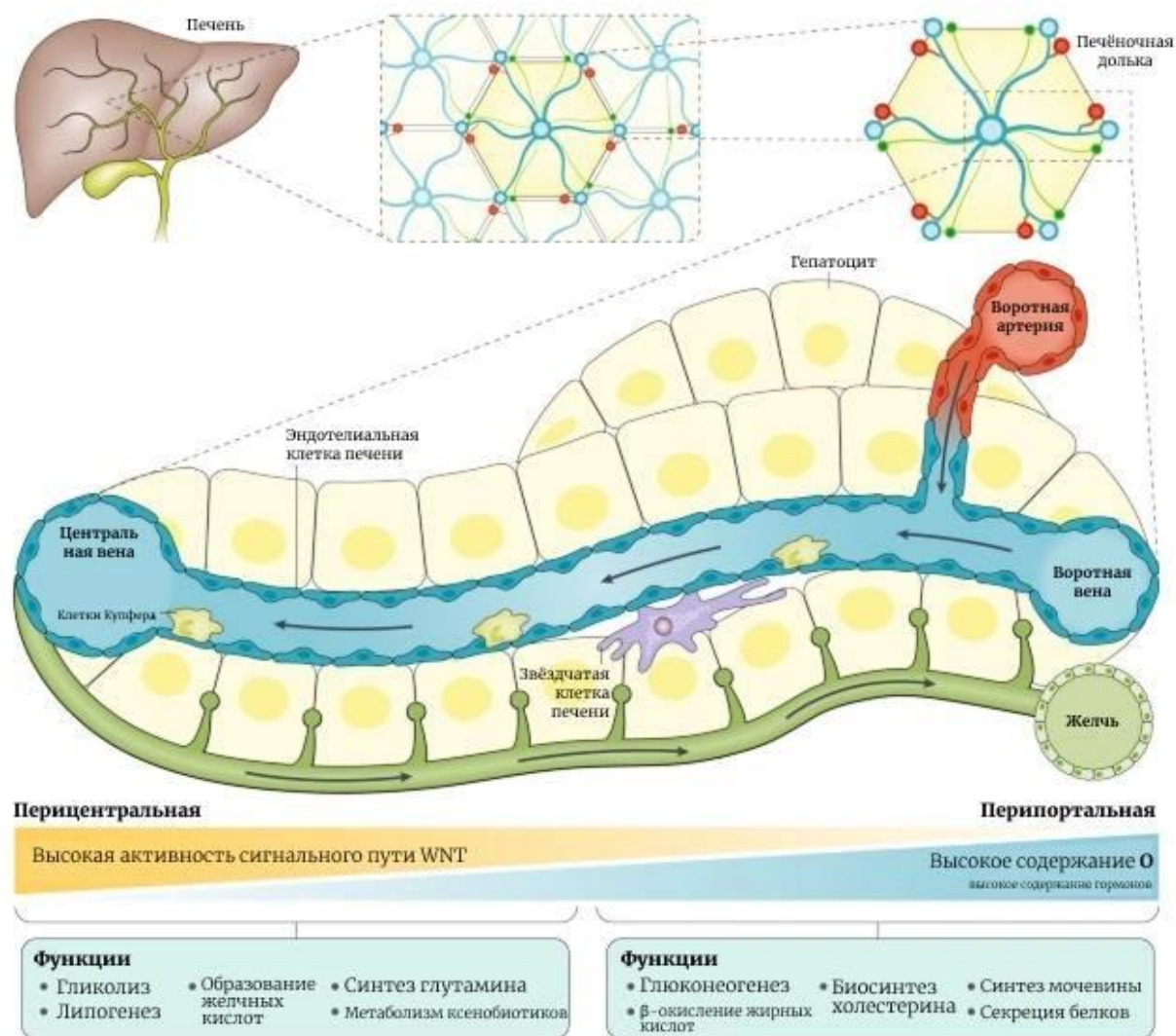


Рисунок 1.4 – Метаболическое зонирование в печеночной дольке [41]

наблюдаются условия близкие к гипоксическим. Синусоидальное напряжение кислорода снижается с 65 мм.рт.ст. в портальных слоях до 30 мм.рт.ст. в перицентральных слоях [41]. Различные патологические состояния, такие как алкогольная интоксикация, сопровождаются гипоксией в перицентральных областях печеночных долек. Зональность дольки подтверждается морфологическими данными, согласно которым в перипортальной области более крупные митохондрии, более высокое содержание комплекса Гольджи, гранул гликогена и меньше липидов. Однако, более интересные данные получены с использованием транскриптомных методов исследования [39], которые четко показали, что каждая функциональная зона имеет различные метаболические функции. Так наиболее энергозатратные процессы (глюконеогенез, β -окисление

жирных кислот, биосинтез холестерина, синтез мочевины, синтез и секреция белков для плазмы крови) преобладают в перипортальной зоне, в то время как в периферической области преобладает гликолиз, липогенез, синтез и секреция желчных кислот, синтез глутамина и процессы биотрансформации ксенобиотиков. Различные области печеночных долек вносят разный вклад в поддержание гомеостаза, развитие патологических процессов и регенерации органа. Как уже указывалось, периферические гепатоциты более чувствительны к аноксии и гипоксии и соответственно к ИРП. В этой же области преобладание экспрессии цитохрома P₄₅₀ приводит к увеличению воздействия на гепатоциты токсичных ксенобиотиков (CCl₄, этанола), повышенная экспрессия генов липогенеза и сниженный уровень β -окисления являются факторами отложения жира при стеатозе. При ИРП печени в периферической зоне наблюдается экспрессия генов, связанных с воспалением, стрессом эндоплазматического ретикулума, аутофагией и метаболическими путями. В эту же зону преимущественно рекрутируются макрофаги. В перипортальной зоне экспрессируются гены метаболических путей, а также локализовано большее количество клеток Купфера и звездчатых клеток, что ассоциировано с более высоким уровнем защиты от ИРП [224].

Отличительной чертой клинической хирургической гепатологии от экспериментальной хирургии является выполнение оперативных вмешательств не на интактной паренхиме, как на животных моделях, а на патологически измененной, которая имеет более высокую чувствительность к ИРП. Это имеет место быть в трансплантологии, когда для поиска донорских органов расширяют показания для возможности забора их у пожилых доноров или доноров с легким или даже умеренным стеатозом печени [247]. При стеатозе печени наблюдается накопление жиров, в том числе жирных кислот в гепатоцитах, которые способны действовать как разобщители тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования и увеличивать генерацию АФК [212]. Поврежденные митохондрии высвобождают DAMP, стимулирующие процессы фиброза и стеатоза, что формирует порочный круг патологического процесса. С учетом

ключевой роли АФК в прогрессировании стеатоза, гепатоциты больных неалкогольной жировой болезнью печени имеет более высокую чувствительность к ИРП, что подтверждается низким уровнем АТФ, полностью не восстанавливаемым после реперфузии [96, 172]. Другим важным фактором является возраст, так как возрастные изменения печени, несмотря на высокую резистентность печени к старению, характеризуются нарушениями окислительного метаболизма и снижением эффективности энергопродукции митохондриями, нарушениями процесса аутофагии и дисрегуляцией иммунной системы с повышенной склонностью к воспалению, которые также играют ведущую роль в развитии ИРС [92, 129, 188]. Это в частности проявляется более высокой смертностью после трансплантации печени пожилых доноров [65]. В эксперименте показано, что для старых животных характерен более низкий уровень АТФ после ишемии, уровень экспрессии митохондриальных белков SIRT1 и Mfn2, факторов аутофагии и митофагии Parkin и ATG5, но более высокий по сравнению с молодыми особями уровень цитоплазматических протеаз – кальпаинов [27, 140]. Модуляция аутофагии рапамицином или переливание плазмы крови от молодых крыс старым перед экспериментальным моделированием сосудистой изоляции печени способно защитить орган от ишемии-реперфузии [260].

1.4 Стратегия защиты от ишемически-реперфузионных нарушений

Стратегия защиты от ишемически-реперфузионных нарушений построена на основе ряда хирургических и медикаментозных манипуляций. К основным направлениям разработки стратегий профилактики и терапии ИРП печени можно отнести: 1) предотвращение окклюзии притока крови или его минимизация; 2) ишемическое кондиционирование и 3) фармакологическое кондиционирование. Разработан и обоснован целый ряд подходов к «кондиционированию» ИРП, которые

классифицируются в зависимости от времени воздействия. Так выделяют «прекондиционирование», которое применяют до ишемии, «кондиционирование» – во время ишемии и «посткондиционирование» – после выхода из ишемической фазы в реперфузионном периоде. Под ишемическим кондиционированием традиционно понимают выполнение нескольких кратковременных эпизодов ишемии (3–5 минут), прерываемых кратковременными эпизодами реперфузии (5–10 минут). Фармакологическое кондиционирование – введение фармакологических агентов с целью повышения резистентности ткани или органа к ИРП и снижения последствий сосудистой изоляции. Эффективность и целесообразность ишемического кондиционирования остается предметом дискуссий, так как существует риск дополнительного повреждения, поэтому в настоящее время более перспективным считается разработка методов медикаментозной коррекции [57, 173].

1.4.1 Ишемическое кондиционирование

Ишемическое preconditioning считается наиболее эффективным способом профилактики ишемически-реперфузионных повреждений органов и тканей. Оптимальным протоколом ишемического preconditioning является выполнение нескольких серий (обычно 2–4) кратковременных (не более 5 минут) эпизодов васкулярной эксклюзии и реперфузии. Защитный эффект представляет собой активацию адаптивных механизмов, которые повышают толерантность к более длительному ишемически-реперфузионному повреждению ткани. Для описания такого эффекта можно использовать термин «гомерзис» – низкоинтенсивное действие повреждающего фактора, которое не успевает реализовать патологические эффекты, но способствует активации защитных механизмов. В частности, кратковременное действие гипоксии обладает широким спектром протективных эффектов, но не только повышает устойчивость к низким концентрациям кислорода. В этих условиях отмечается повышение общей

неспецифической резистентности организма человека, что обеспечивает приспособление к действию разных стрессорных факторов [73, 75, 94].

Механизмы формирования протективного эффекта ишемического прекондиционирования. В развитии адаптации в ходе реализации ишемического прекондиционирования выделяют 2 этапа: 1) начальный этап, характеризующийся формированием несовершенной адаптации и 2) долговременная или устойчивая адаптация. В ходе первого этапа обеспечивается мобилизация и перераспределение энергетических ресурсов за счет активации неспецифической стандартной стресс-реализующей системы. В этот период ключевое значение имеет работа катехоламинов и глюкокортикоидов. При этом начальная фаза несовершенна, неэкономна, как правило достаточно быстро утрачивается функциональный резерв систем, обеспечивающих адаптацию. В ходе формирования долговременной адаптации наблюдается увеличение скорости транскрипции в ядрах клеток систем, обеспечивающих приспособление. Усиливается экспрессия генов и синтез белков, ответственных за реализацию защитных механизмов. Параллельно реализуются механизмы, ограничивающие стресс-реализующие механизмы, такие как синтез и секреция тормозных нейромедиаторов, белков теплового шока, повышение активности антиоксидантной системы и др. Итоговый результат развития адаптационного потенциала зависит от взаимодействия и соотношения стресс-реализующих и ограничивающих систем.

Выделяют также 2 периода или «окна защиты» в формировании протективного эффекта прекондиционирования: ранний (классическое прекондиционирование) и поздний («второе окно защиты») период. Развитие долгосрочного позднего защитного периода связано с механизмами, характерными для долговременной адаптации. Это механизмы, связанные с изменением характера экспрессии генов, увеличением синтеза белков теплового шока, индуцибельной NO-синтазы, ферментов антиоксидантной защиты и др. Таким образом, протективное действие в ранний период сохраняется до 3-х часов и связано с изменениями метаболических систем клетки без синтеза новых

белков, тогда как феномен «второго окна» сохраняется в течение 1–3-х суток после ишемического preconditionирования и связан с синтезом новых белков в клетке.

Метаболическая концепция ишемического preconditionирования заключается в объяснении адаптации органов и тканей к ишемически-реперфузионным повреждениям за счет патобиохимических изменений, включающих изменения количества или активности белков теплового шока, ферментов системы антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа), креатинфосфокиназа, индуцибельная синтаза оксида азота и др. Многие из этих веществ являются компонентами системы неспецифической резистентности организма, посредниками preconditionирования, а также могут использоваться как маркеры ишемического повреждения. Основной причиной снижения гибели preconditionированных клеток считают снижение энергетического запроса, а энергосберегающие эффекты ишемического preconditionирования связывают с уменьшением активности АТФазы на внутренней мембране митохондрий. Это фермент может работать в обе стороны и при ишемии обеспечивает дефосфорилирование основного количества АТФ для генерации электрического потенциала ($\Delta\Psi_m$), выполняющего ряд альтернативных функций, вероятно необходимых для жизнеобеспечения самих митохондрий. Также на фоне ишемического preconditionирования снижается активность основных потребителей энергии: Na,K-АТФазы, Са-АТФазы и скорость анаболических АТФ-зависимых реакций. Сохранение АТФ, синтез креатинфосфата, снижение скорости метаболизма, в частности гликолиза и соответственно снижение накопления токсичных недоокисленных продуктов – основные метаболические эффекты ишемического preconditionирования [94, 133].

В качестве триггеров, запускающих эффекты ишемического preconditionирования рассматривают аденозин, брадикинин, эндогенные опиоиды, норадреналин, простаноиды, ацетилхолин, оксид азота и АФК. Вероятна параллельная инициация защитных путей разными триггерами,

реализующими разные сигнальные пути, эффект которых может быть синергичным. Среди медиаторов, опосредующих метаболические изменения наиболее хорошо изучены АТФ-зависимые калиевые каналы, специфические изоформы протеинкиназы С, митогенактивируемые протеинкиназы (МАРК) и тирозиновые киназы. Конечными эффекторными белками считаются АТФ-зависимые калиевые каналы ($K_{\text{АТФ}}$ -каналы), локализованные в митохондриальных мембранах. Открытие $K_{\text{АТФ}}$ -каналов сопровождается снижением уровня генерации АФК, блокирует открытие специфических ионных каналов внутренней мембраны митохондрий и оптимизирует метаболизм жирных кислот [54].

Таким образом, можно весь процесс разделить на три этапа: 1) активация рецепторов аденозина, опиоидов и некоторых других на поверхности клеток; 2) передача сигнала от рецептора внутрь клеток через некоторые сигнальные молекулы и ферменты; 3) изменение внутриклеточного гомеостаза.

АФК – триггеры ишемического preconditionирования. Как уже было указано, АФК выступают в качестве одних из триггерных частиц, запускающих реализацию защитных эффектов ишемического preconditionирования. В качестве таких внутриклеточных сигнальных частиц могут выступать супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и гидроксидный радикал. Известно, что их продукция увеличивается на фоне ишемического preconditionирования, тогда как предварительное введение антиоксидантов нивелирует развитие протективного эффекта. Источниками АФК при синдроме ишемии-реперфузии может быть дыхательная цепь митохондрий, НАДФН-оксидаза, а в случае с васкулярной эксклюзией печени также система цитохрома P_{450} и ксантиноксидаза. В эксперименте было показано, что экзогенная стимуляция генерации АФК (супероксидного анион-радикала и пероксида водорода) способна имитировать кардиопротекторный эффект preconditionирования. Также было показано, что протективное действие целого ряда соединений (брадикинин, опиоиды, ацетилхолин, метазон, ФНО- α , ингаляционные анестетики, протонофоры, диазоксид, ангиотензин II) непосредственно зависит от интенсификации продукции свободных радикалов и реактивных молекул. Защитное действие АФК при ишемическом

прекондиционировании можно сравнить с эффектом гомерзиса, так как результатом является адаптация к более мощной продукции свободных радикалов при основном повреждающем действии ишемически-реперфузионного синдрома, сопровождающаяся снижением генерации прооксидантных факторов и усилением синтеза эндогенных антиоксидантов. Таким образом, в условиях низкоинтенсивного стресса АФК и АФА, продуцируемые митохондриями, дают клетке возможность избежать более сильного повреждения или даже гибели, однако в ситуации сбоя защитных механизмов эти же сигнальные факторы обеспечивают усиление деструктивного сигнала и скорейшее уничтожение клетки путем апоптоза [215].

Дистантное ишемическое preconditioning. Универсальные механизмы развития защитного эффекта ишемического preconditioning, заключающиеся в действии однотипных триггеров и сигнальных путей при васкулярной эксклюзии разной локализации, создает основу для формирования дистантного ишемического preconditioning. При этом запуск молекулярных механизмов адаптации в одном органе может распространяться на другие. Так часто моделируют несколько кратковременных эпизодов ишемии и реперфузии путем наложения жгутов на конечности для потенцирования защитных эффектов preconditioning на внутренние органы. В настоящее время доказана эффективность классического дистантного ишемического preconditioning, отсроченного дистантного ишемического preconditioning, дистантного посткондиционирования и preconditioning на расстоянии (за счет транзиторной ишемии-реперфузии отдаленного органа во время ишемии основного органа) [74, 76, 225].

Предполагают, что в дистантном ишемическом preconditioning задействованы те же сигнальные пути, которые были описаны выше для традиционного preconditioning. Ключевую роль в развитии эффектов дистантного ишемического preconditioning играет гуморальный фактор, что подтверждается необходимостью реперфузии отдаленного органа, в ходе которой в системный кровоток должен поступать какой-то медиатор, вероятнее всего пептидной природы, способствующий развитию протективного эффекта в основном

органе. На роль такого триггера претендуют ангиотензин II, эндогенные каннабиноиды, динорфин, эритропоэтин, ген-кальцитониновый пептид (CGRP). Последний обладает выраженной кардиопротекторной активностью, обнаруживается в крови в высокой концентрации после транзиторной ишемии-реперфузии, а блокада его рецепторов нивелирует защитный эффект дистантного ишемического preconditionирования. При этом оксид азота и АФК не могут быть гуморальными факторами дистантного ишемического preconditionирования, так как их время жизни сильно ограничено [94, 200].

Ишемическое посткондиционирование. Интерес представляет также постишемическое кондиционирование, выполняемое аналогично preconditionированию, но выполняемое уже после того, как смоделирован ишемически-реперфузионный синдром и начата реперфузия тканей. В некоторых клинических ситуациях уже приходится иметь дело со свершившимся фактом ишемического повреждения, что затрудняет планирование выполнения preconditionирования. Доказана эффективность и такого приема, заключающаяся в уменьшении объема некроза более полноценном восстановлении кровотока в поврежденной ткани. Важным условием эффективности является выполнение манипуляции как можно раньше, в первые часы после развития ишемически-реперфузионного синдрома. Механизмы протективного действия посткондиционирования практически полностью аналогичны preconditionированию, кроме временных рамок запуска процесса. Интересным дополнением защитных механизмов, реализующихся в ходе посткондиционирования может быть прекращение образования АФК в реперфузируемой ткани при ее кратковременном возвращении в ишемическую стадию. Это позволяет снизить активность перекисного окисления липидов и других молекул, интенсифицирующегося после восстановления кровотока и оказывающего основное повреждающее действие после развития ишемически-реперфузионного синдрома [127, 225].

Кроме различных модификаций метода ишемического preconditionирования к хирургическим методикам профилактики ишемически-реперфузионных

повреждений можно отнести применение гипотермии до 10–15 °С и гипербарическую оксигенацию [191]. При этом несмотря на высокую эффективность описанных в данном разделе методик, они редко находят применение в реальной клинической практике, так как требуют увеличения продолжительности оперативных вмешательств, что само по себе сопряжено с высоким риском интра- и послеоперационных осложнений.

1.4.2 Фармакологическое кондиционирование

Под фармакологическим прекондиционированием обычно понимают использование химических соединений для защиты от ишемически-реперфузионных повреждений. Фармакологическая коррекция в таких условиях чаще всего основана на природных защитных механизмах, возникающих в результате адаптации при выполнении ишемического прекондиционирования. Можно заметить, что сущностью фармакологического прекондиционирования является имитация отдельных сигнальных путей ишемического прекондиционирования, как наиболее эффективного способа коррекции. Для реализации таких защитных эффектов можно вводить в кровеносное русло или неишемизированные ткани такие триггеры прекондиционирования, как аденозин, форболовый эфир, брадикинин, производные глицерина и др. (таблица 1.2). В тоже время введение ингибиторов АТФ-зависимых калиевых каналов или ингибиторов протеинкиназы С нивелирует протективное действие прекондиционирования. Основным недостатком фармакологического прекондиционирования, логически следующим из описания самого метода, является селективность действия препаратов на отдельные механизмы или сигнальные пути, а не на комплекс факторов, вызывающих синдром ишемии-реперфузии и характерных для ишемического прекондиционирования [184].

Существуют различные подходы к классификации фармакологических средств, обеспечивающих феномен прекондиционирования. Можно

классифицировать на группы в зависимости от того, связаны механизмы протективного действия с набуханием митохондрий или нет. Можно также классифицировать в зависимости от длительности протективного эффекта: средства с малой или длительной «памятью». Средства с малой «памятью» обладают краткосрочным эффектом, который длится обычно в течение 10–15 минут после введения препарата. Средства с длительной «памятью» могут действовать в течение нескольких часов и даже суток.

В качестве примеров фармакологических агентов, имитирующих эффекты ишемического preconditionирования можно перечислить: аденозин, агонисты рецепторов аденозина, агонисты протеинкиназы C, препараты, открывающие АТФ-зависимые K^+ каналы, доноры оксида азота. Многие из них имеют ограниченные перспективы внедрения в клиническую практику, тем не менее есть примеры и успешного использования никорандила (открывает K_{ATP} -каналы) и аденозина, ингаляционных анестетиков (так называемое анестетическое preconditionирование), в том числе севофлуран [80, 168]. Показана возможность использования инертных газов для защиты донорской печени от ИРП при трансплантации [186].

Предложено использование препаратов, оказывающих влияние на механизмы контроля качества митохондрий, таких как берберин, цилостазол, гемин, генипин и др. Эти препараты через сигнальные пути SIRT1-AMPK обеспечивают увеличение белков митохондриального биогенеза – PGC-1 α , SIRT1, SIRT3 и другие, и облегчают течение ИРП печени [26, 219]. Перспективным направлением является стимуляция митофагии при ИРС. С этой целью введение 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотида, активатора AMPK, перед моделированием ИРП печени позволило усилить митофагию за счет регуляции активности PINK1/Parkin и ослабить проявления окислительного стресса [113]. Аналогичные результаты были получены при трансфузии мезенхимальных стволовых клеток и использовании 25-гидроксихолестерина и птеростильбена [22, 160, 217].

Критическая роль клеток Купфера в развитии и прогрессировании ИРП печени нацелила на поиск возможностей управления функциями макрофагов.

Представляют определенный интерес препараты, которые позволяют перепрограммировать фенотип макрофагов с воспалительного на регенеративный. Данный переход опосредован противовоспалительными цитокинами ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-13, введение против которых антител или их блокирование замедляет восстановление печени после ИРП [24]. Индуцировать поляризацию макрофагов по регенеративному типу можно с использованием иммунного медиатора нетрина-1 или путем введения агонистов PPAR- γ [23]. Для ограничения распространения и активности воспаления используют системные глюкокортикоиды (преднизолон) и препараты, подавляющие активность нейтрофилов [85]. Снижение активности печеночных аминотрансфераз в сыворотке крови и уменьшение некроза и апоптоза клеток печени наблюдалось при использовании антагониста формилпептидного рецептор – циклоспорина Н, ингибитора тирозинкиназы Брутона – ВТКВ66, ингибиторов пептидил-аргинин-деиминазы 4 или ДНКазы I [45]. Противовоспалительное действие в том числе подавление активации и хемотаксиса лейкоцитов наблюдалось при использовании перед моделированием ИРП печени простагличина PGI₂ или его аналогов – илопрост и трепростинил [56].

Перспективным направлением метаболической профилактики ИРП является использование препаратов, позволяющих управлять механизмами клеточной гибели. С этой целью использовали активаторы TRIM27, нейротрофический фактор MANF, антитела против компонента C5a системы комплемента, которые позволили добиться снижения выраженности воспаления и апоптоза при ИРП печени [58, 97, 115, 248]. Использование ингибиторов каспаз F573 и IDN-6556 позволяет снизить вероятность апоптотической гибели клеток и ослабить ИРП печени [72, 123]. Не только ингибирование апоптоза может ослабить ИРП печени, но и других типов клеточной гибели. Ингибирование ферроптоза путем использования Lip-1 (липроксстатин-1), ферростатина-1 (Fer-1), α -токоферола и хелаторов железа (дефероксамин) также предотвращало повреждение печени на фоне ишемии-реперфузии [79, 120].

Таблица 1.2 – Основные группы и представители фармакологических препаратов, используемых для профилактики ишемически-реперфузионных повреждений печени

Группы фармакологических препаратов	Представители
Антиоксиданты	ацетилцистеин, глутатион, аскорбиновая кислота, α -токоферол, β -каротин, цинк, селен и др.
Антиоксиданты/антигипоксанты	триметазидин
Противовоспалительные средства	ингибиторы системы комплемента, клеток Купфера, интерлейкина-1, ФНО α
Иммуносупрессанты	сиролимус
Вазодилататоры	донаторы и прекурсоры NO, аналоги простациклина, вазодилатирующий пептид
Ингибиторы апоптоза	Z-DEVD-FMK (ингибитор каспаз 3 и 7)
Ингибиторы ферментов	ингибиторы протеаз, НАДН-оксидазы, ЦОГ-2, ксантиноксидазы
Наркозные средства (анестезиологическое прекондиционирование)	севофлуран
антагонисты рецепторов повреждающих цитокинов	антагонисты эндотелина, ИЛ-8
Ингибиторы ферментов синтеза цитокинов	ингибитор тромбосан синтазы печени – EK506
Гормоны и гормоноподобные вещества	мелатонин, эритропоэтин, простагландин E1, метилпреднизолон, глюкокортикоиды и др.
Антикоагулянты и фибринолитики	антитромбин, гепарин, активатор плазминогена, активированный протеин С
Цитокины	фактор роста гепатоцитов, ИЛ-10
Иммунодепрессант	циклоспорин
Ингибиторы протеиназ	улинастатин
Энерготропные препараты	декстроза, сукцинат, реамберин, ремаксол, цитофлавин, глюкоза
Ингибиторы синтазы оксида азота	аргинин, какнаванин
Другие группы препаратов	аденозин, этанол, пируват, глицин, мелатонин, агонисты рецептора альфа активатора пролиферации пероксисом (PPAR α)

В качестве молекулярных мишеней фармакологических агентов для коррекции ишемически-реперфузионных повреждений можно обозначить

митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы (митоK_{АТФ}), митохондриальные мегапоры (mPTP), митохондриальная синтаза оксида азота (mtNOS), АФК и некоторые другие. Так фармакологическое открытие митоK_{АТФ} практически имитирует эффект ишемического preconditionирования. Для этого могут быть использованы активаторы – дифосфонуклеотиды, диазоксид, никорандил, b-эстрадиол и тестостерон. Ингибитором митоK_{АТФ} является глибенкламид [108, 124].

Структура mPTP включает потенциалзависимый анионный канал и периферический бензодиазепиновый рецептор в наружной мембране, адениннуклеотидтранслоказа во внутренней мембране, циклофиллин D в матриксе. Открытие мегапоры, происходящее при реперфузии, приводит к поступлению в матрикс воды и электролитов, набуханию митохондрий. В этих условиях повреждение наружной мембраны вызывает высвобождение в цитоплазму проапоптотических белков. Блокирование открытия mPTP может осуществляться с помощью убихинона, иммуносупрессора циклоспорина А или его аналогов [145]. Активаторами mPTP являются ионы кальция, адениннуклеотиды, NO, АФК, изменения пиримидинового и тиолового редокс-статуса, белки семейства Bcl-2, жирные кислоты и др. [259]

Другой мишенью фармакологических агентов является митохондриальная синтаза оксида азота (mtNOS), локализованная во внутренней мембране органелл. NO способен оказывать регуляторное влияние на митохондриальное дыхание за счет высокого сродства к цитохромоксидазе, возможно также участвует в регуляции апоптоза, аналогично немитохондриальному оксиду азота. Активация синтеза NO имеет защитное действие при умеренной гипоксии за счет адаптивного снижения митохондриальной активности. Более высокие концентрации оксида азота способны обеспечить обратные эффекты – угнетение синтеза АТФ, чрезмерное нитрозилирование тиоловых групп митохондриальных белков, усиление продукции АФК и открытие mPTP с индукцией апоптоза.

Большой группой потенциальных средств для метаболической профилактики и коррекции ишемически-реперфузионных повреждений являются

антиоксиданты. Отдельный интерес представляют митохондриально-направленные антиоксиданты, которые быстро и избирательно доставляются в митохондрии – основной источник АФК. Для этого осуществляется соединение эффективного антиоксиданта с липофильной положительно заряженной молекулой, способной заякориваться на внутренней стороне внутренней мембраны, заряженной отрицательно. Созданы различные варианты MitoQ и антиоксиданты на основе пластохинона – SkQ. Антиоксидантная часть таких молекул может быть представлена пластохиноном, а липофильные проникающие катионы – трифенилфосфоний или родамин. После использования SkQ способны быстро восстанавливаться комплексами I и II цепи переноса электронов, что обеспечивает их регенерацию и многократное использование.

Среди традиционных антиоксидантов цитопротективная эффективность на моделях ИРП печени показана при использовании альфа-токоферола, аскорбиновой кислоты, альфа-липоевой кислоты, мелатонина, глутатиона, N-ацетилцистеина, буцилламина (N-(2-меркапто-2-метилпропионил)-1-цистеин), кофермента Q [146, 162, 183]. Известна эффективность хелаторов ионов металлов с переменной валентностью, способных индуцировать свободнорадикальные процессы в реакции Фентона. Для коррекции ИРП печени применяли хелатор ионов железа дефероксамин. Разработаны ферментные препараты супероксиддисмутазы и каталазы. Однако эффективность ферментов-антиоксидантов остается спорной. Нерешенным остается вопрос о доставке таких препаратов к очагу патологического процесса и поглощении белков клетками. Представлен ряд интересных подходов по использованию селена, входящего в состав Se-зависимой ГПО [35, 214]. С учетом ключевой роли интенсификации свободнорадикальных процессов и эндотоксикоза значительный интерес представляет разработка и апробация эффективности инфузионных препаратов с комплексным составом на основе энерготропных и антиоксидантных средств.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в три основных этапа:

1) экспериментальные исследования на лабораторных животных, в ходе которых были определены ключевые патофизиохимические изменения на фоне различных моделей ишемии-реперфузии печени;

2) исследования влияния энерготропных средств и перспективных способов применения гепатопротекторов в условиях развития ишемически-реперфузионного повреждения печени в эксперименте;

3) клиническая часть исследования, основной задачей которой была апробация метаболической коррекции повреждений печени и способов лабораторной диагностики нарушений окислительного метаболизма.

Общая схема проведения исследования представлена на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

2.1 Дизайн экспериментальной части исследования

Экспериментальная часть исследования выполнена на лабораторных животных, которые были представлены самцами белых нелинейных крыс. Были сформированы группы животных: ложнооперированные животные, которые составили контрольную группу; животные, которым моделировали полную или частичную сосудистую изоляцию печени с различной по длительности ишемией и реперфузией без коррекции и в условии прекондиционирования различными фармакологическими средствами.

Экспериментальное исследование проведено в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (изложенными в национальном стандарте «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434-2009), с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о «Защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1986), в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003). Проведение исследования было одобрено независимым этическим комитетом при ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России на заседании 29 января 2021 г., протокол № 96.

2.1.1 Характеристика и условия содержания лабораторных животных

Экспериментальная работа выполнена на базе учебно-производственного отдела ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (справка о постановке на учет в государственном бюджетном учреждении ветеринарии Краснодарского края

«Управление ветеринарии города Краснодара» № 42/1551 от 29.11.2017 г.) с использованием белых половозрелых лабораторных крыс-самцов массой 200–250 г полученных из питомника «Рапполово» (ветеринарное удостоверение 247 № 0012767 от 04.02.2021 г., выдано НИЦ «Курчатовский институт» – ПЛЖ «Рапполово»). К использованию лабораторных животных приступали после прохождения ими карантина не менее 10–14 дней. Перед выполнением эксперимента определяли массу тела подопытных животных на весах с погрешностью не более $\pm 1 \%$, допускали отклонение массы тела животных в пределах одной формируемой экспериментальной группы не более 10 % от средней величины. Для исследования отбирали животных массой тела 200–250 грамм, что соответствовало возрасту 12–14 недель. Это связано с высокой чувствительностью возрастных крыс к стеатозным изменениям и ИРП печени, что обсуждалось в литературном обзоре [92, 129, 188], и рисками получения больших разбросов показателей в ходе исследования. В комнатах для содержания животных обеспечивали поддержание микроклимата: температура воздуха +18–24 °С, относительная влажность воздуха 60–75 %, вытяжная система вентиляции поддерживала скорость воздушного потока 1,–1,5 м/с. Площадь клетки для содержания белых лабораторных крыс была не менее 350 см², высота клетки – не менее 14 см. Освещение обеспечивалось люминесцентными лампами при наличии аварийного механизма, оснащенного осветителями с лампами накаливания. Освещенность помещения составляла 325 лк при измерении на высоте 1 м от пола. Ежесуточный режим включал чередования 12-часового цикла освещения с автоматическим переключением в 8:00 и 20:00. Световой поток направлялся в комнаты с лабораторными животными через матовые плафоны, установленные в потолке вивария. Изоляция плафонов позволяла проводить регулярную аэрозольную дезинфекцию и уборку комнат. Шумовой фон в комнатах содержания лабораторных животных составлял не более 85 Дб, который складывался из шума, создаваемого самими животными и персоналом, обеспечивающим уход за животными и выполнение экспериментальных работ. Для кормления лабораторных животных использовали полнорационный гранулированный комбикорм, произведенным в соответствии со стандартом

«Комбикорма полнораационные для лабораторных животных» ПК 121-10 (ГОСТ-Р 50258-92). Кормление крыс осуществляли *ad libitum* (неограниченно) или в соответствии с суточными нормами кормления, доступ к питьевой воде также был неограничен.



Рисунок 2.2 – Особенности морфологии печени крыс

2.1.2 Описание хирургических моделей сосудистой изоляции печени

В работе использовали 2 экспериментальные хирургические модели – полной (тотальной) и частичной (парциальной) сосудистой изоляции печени [236]. Работы выполняли в операционной учебно-производственного отдела (вивария) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Перед выполнением оперативного вмешательства выполняли общее обезболивание с использованием препарата Золетил 100 (Вирбак, Франция) или Телазол 100 (Зоэтикс, Испания). Действующие вещества комплексного анестетика: тилетамин и золазепам. Тилетамин – общий анестетик диссоциативного действия, вызывающий выраженный анальгетический эффект, но недостаточное расслабление мышц. Тилетамин не подавляет глоточный, гортанный, кашлевой рефлекс, не угнетает дыхательную систему. Золазепам угнетает подкорковые области мозга, вызывая

анксиолитическое и седативное действия, расслабляет поперечнополосатую мускулатуру. Золазепам усиливает анестетическое действие тилетамина. Он также предотвращает судороги, вызываемые тилетамином, улучшает мышечную релаксацию и ускоряет восстановление после наркоза. Препарат вводили в дозировке 15 мг/кг внутримышечно в медиальную поверхность задней конечности. Манипуляции выполняли в положении крыс лежа на спине на подогреваемой поверхности с поддержанием температуры +37 °С в ходе всего оперативного вмешательства. Во время ишемии и реперфузии разрез был прикрыт теплой, пропитанной физиологическим раствором марлей, чтобы избежать обезвоживания и переохлаждения животного.

Для выполнения полной сосудистой изоляции печени после срединной лапаротомии длиной около 3 см с соблюдением требований асептики выделяли аналог гепатодуоденальной связки (печечно-двенадцатиперстная связка) и пережимали атравматическим сосудистым зажимом типа Бульдог на 5–25 минут (рисунок 2.2. 2.3). По истечении срока ишемии снимали сосудистый зажим и выжидали реперфузионный период длительностью от 5 минут до суток. Контроль васкулярной эксклюзии проводили визуально по изменению цвета паренхимы печени.

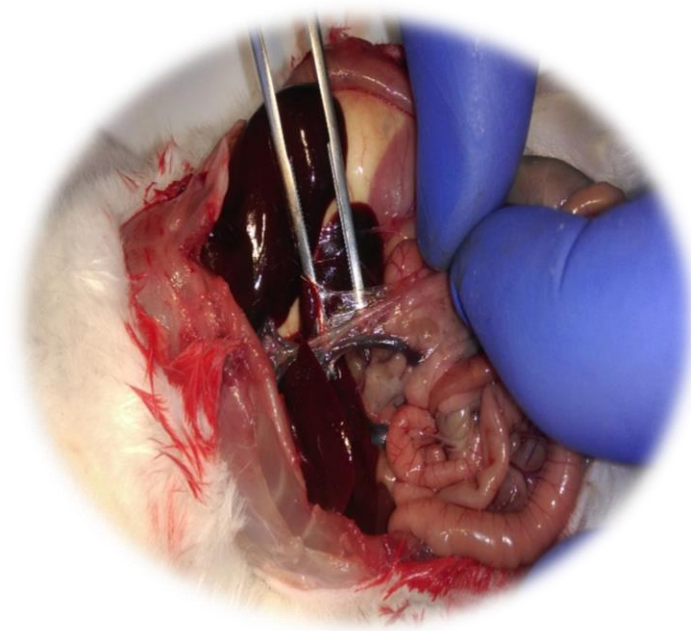


Рисунок 2.3 – Общий вид ворот печени крысы. Выделен аналог гепатодуоденальной связки

Для моделирования частичной или парциальной сосудистой изоляции после срединной лапаротомии длиной около 3 см с соблюдением требований асептики выделяли печень и атравматическим сосудистым зажимом типа Бульдог пережимали сосудистые пучки, питающие левую боковую и центральную доли печени крыс (рисунок 2.2, 2.4) на 20–40 минут. Контроль васкулярной эксклюзии проводили также визуально по побледнению соответствующих долей. Неишемизированные доли сохраняли интактный портальный и артериальный кровоток и венозный отток. По истечению срока ишемии снимали зажим и выжидали реперфузионный период длительностью от 5 минут до суток. При суточной продолжительности реперфузии рану ушивали и дополнительно обезболивали с использованием в/м введения нестероидного противовоспалительного препарата мелоксикам в дозировке 2 мг/кг.

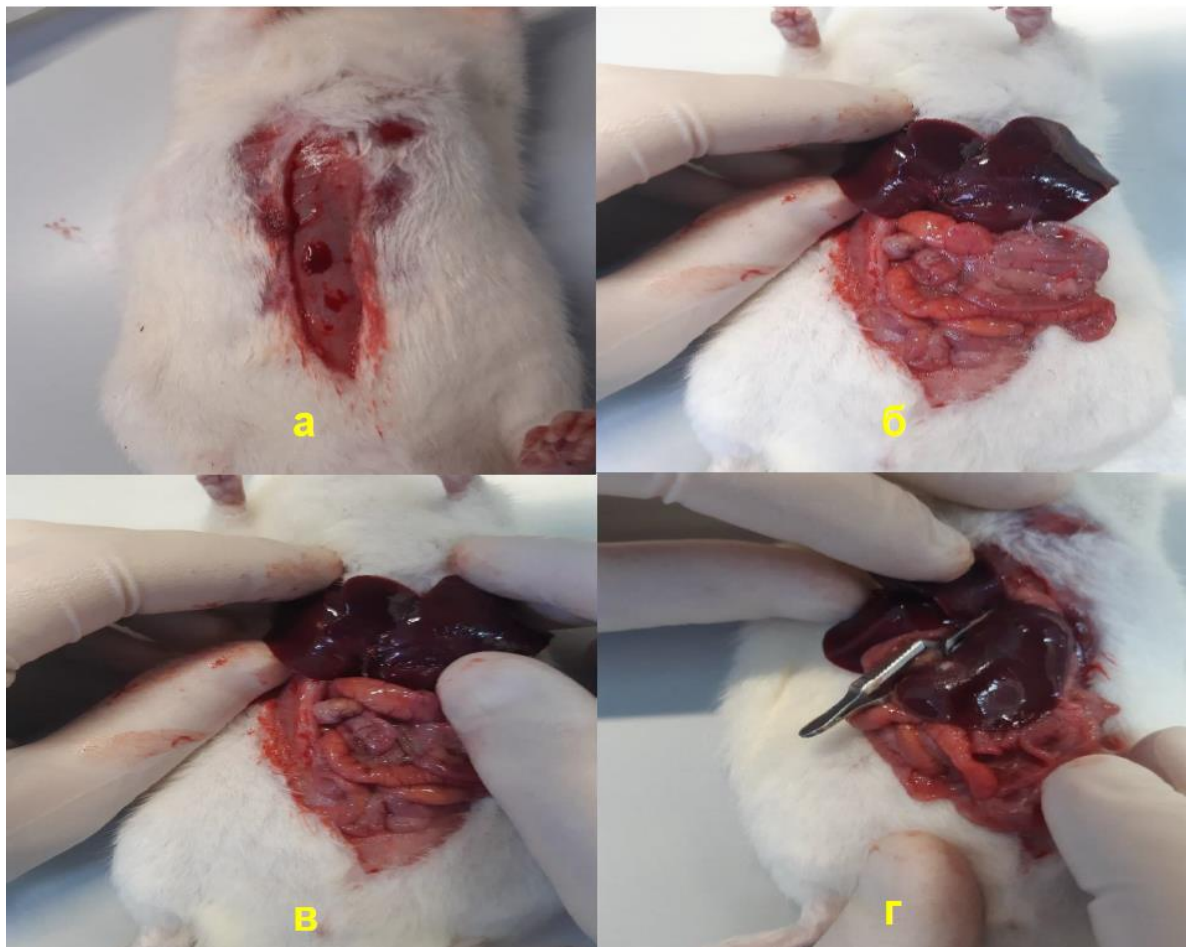


Рисунок 2.4 – Моделирование васкулярной эксклюзии печени в эксперименте:
а – подготовка операционного поля; б – общий вид гепатодуоденальной зоны крысы; в – левая латеральная сосудисто-секреторная ножка; г – селективная сосудистая изоляция печени

Лабораторным животным контрольной группы после общего обезболивания по тем же принципам, что и другим крысам, выполняли срединную лапаротомию без дальнейшего моделирования сосудистой изоляции печени. Таким образом формировали группу ложно- или псевдооперированных животных.

После ишемического или реперфузионного периода определенной продолжительности выполняли забор крови из каудальной поллой вены в шприцы с гепарином натрия и образцов ткани печени. При моделировании частичной васкулярной эксклюзии отдельно забирали ишемизированные и интактные доли органа. Ни одно животное не погибло во время анестезии, основного оперативного вмешательства или периода реперфузии.

Выведение животных из эксперимента выполняли путем эвтаназии в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, Правилами проведения исследований с вовлечением экспериментальных животных. Гуманная эвтаназия лабораторных животных для последующего забора печени соответствовала предъявляемым к ней требованиям: надежность, необратимость, легкость в исполнении, безопасность и эстетическая приемлемость для персонала, проводящего процедуру, а также была безболезненной, вызывала быструю потерю сознания и смерть, не вызывала волнения у животного, соответствовала возрасту, виду, состоянию здоровья животного, минимизировала испуг и физиологический стресс. После достижения глубокого наркотического сна животным вводили внутримышечно Золетил 100 в летальной дозировке (из минимального расчета 100 мг/кг). Установление смерти проводилось по оценке одного или нескольких факторов: прекращение сердцебиения и дыхания, отсутствие рефлексов и снижение температуры тела ниже 25 °C.

2.1.3 Пробоподготовка биологического материала

Для подготовки биоматериала к исследованию подвергали кровь центрифугированию в течение 10 мин при 2000 g, после чего отбирали плазму

крови, а эритроцитарную массу трижды отмывали физиологическим раствором. Печень использовали для приготовления гомогената, получения суспензии изолированных гепатоцитов, выделения суспензии изолированных митохондрий и постмитохондриальной (цитозольной) фракций.

2.1.3.1 Приготовление гомогената печени

Приготовление гомогената печени преследовало цель разрушения клеток с выходом их содержимого в супернатант, подвергающийся дальнейшим исследованиям активности ферментов и концентрации метаболитов. В отдельных случаях, описанных в разделах ниже, приготовление гомогената рассматривается как первый этап получения суспензии митохондрий и как один из этапов выделения суспензии изолированных гепатоцитов.

Все манипуляции выполняли при охлаждении до +2–4 °С. Выделенный из организма крысы орган на первом этапе подвергали измельчению скальпелем. Полученные на этом этапе кусочки печени подвергали дальнейшему измельчению с использованием ротор-статорного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T18 digital (IKA, Германия) при 3000 об/мин в течение 30 секунд. Гомогенизацию проводили в 5-ти кратном объеме среды, содержащей 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,6, 10 мМ ЭДТА, 0,5 мМ 2-меркаптоэтанол. Полученный гомогенат пропускали через 3 слоя марли и подвергали центрифугированию при 3000 об/мин в течение 15 минут. Для дальнейших исследований использовали супернатант, в котором предварительно определяли концентрацию белка с помощью метода Брэдфорд.

2.1.3.2 Получение суспензии изолированных гепатоцитов

Исследования на изолированных гепатоцитах были основаны на методике выделения клеточной суспензии из печени интактных крыс с помощью 2-стадийной ферментативной перфузии печени. На первом этапе проводили перфузию через канюлированную портальную вену безкальциевым буферным раствором (9 г/л NaCl, 10 мМ HEPES, pH = 7.4) в течение 7 минут при температуре 37,0 °С со скоростью потока не более 30 мл в минуту. На втором этапе проводили перфузию в течение

5 минут раствором, содержащим 0,07 % коллагеназу. Затем осуществляли забор печени и диспергирование паренхимы в чашке Петри с холодным раствором Хенкса. Отделение гепатоцитов от других клеток осуществляли путем центрифугирования клеточной суспензии в среде 90 % перколлы, забуференного 20 мМ HEPES при 400 об/мин в течение 15 минут. Оценку жизнеспособности полученных клеток проводили путем нативного окрашивания трипановым синим. Дальнейшие экспериментальные работы выполняли при условии наличия более 90 % жизнеспособных гепатоцитов в клеточной суспензии (рисунок 2.5).

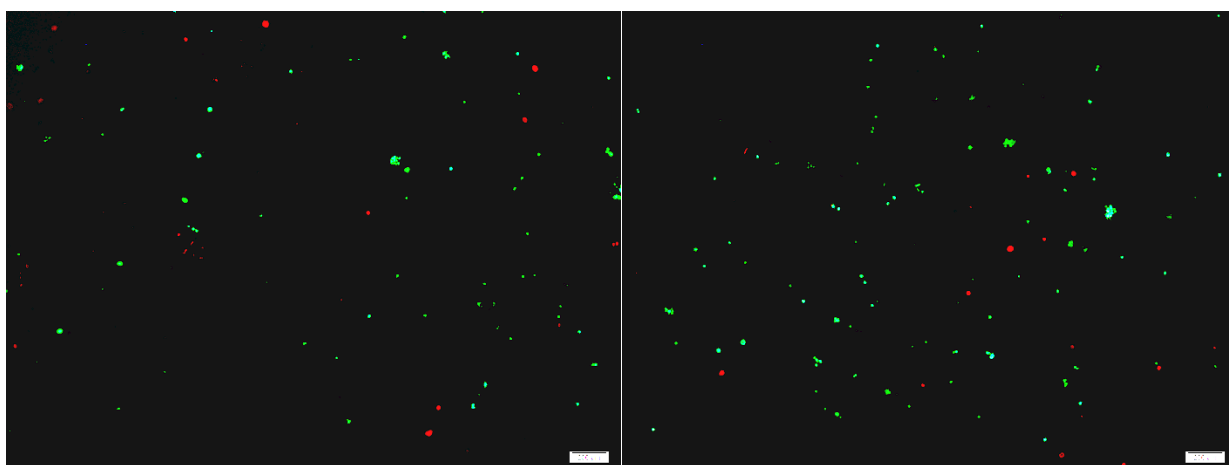


Рисунок 2.5 – Оценка жизнеспособности гепатоцитов в суспензии (разбавление в 16 раз).
Окраска трипановым синим

2.1.3.3 Получение суспензии изолированных митохондрий

Выделение суспензии изолированных митохондрий: печень сразу помещали в холодную среду, содержащую не менее 40 % замороженной составляющей, для выделения митохондрий (250 мМ сахараза, 1 мМ ЭДТА и 2 мМ хлорид магния в 0,02 М трис-HCl буфере с pH 7,4) и доставляли в лабораторию. Выделение митохондрий осуществляли методом дифференциального центрифугирования с использованием центрифуги Centrifuge 5424 R (Eppendorf, Германия) при охлаждении до +2 °С. Печень сразу после эксперимента измельчали и гомогенизировали в той же сахарозной среде (0,25 М сахаразы, содержащей ЭГТА и ионы Mg в 0,02 М трис-HCl буфере с pH = 7,4). После гомогенизации центрифугировали при 1000 g в течение 5 минут для удаления крупных обломков,

целых неразрушенных клеток, эритроцитов и прочего. Далее после центрифугирования в течение 10 минут при 12 000 g супернатант использовали в качестве цитозольной (постмитохондриальной) фракции, а осадок еще раз отмывали в тех же условиях и готовили из него рабочую суспензию митохондрий [178].

В цитозольной фракции и суспензии митохондрий определяли концентрацию белка с помощью метода Брэдфорд, после чего готовили рабочие растворы с концентрацией белка 3 мг/мл. Для определения белка использовали наборы реагентов Wuhan Elabscience Biotechnology Co., Ltd. (Китай).

2.1.4 Формирование экспериментальных групп лабораторных животных для анализа фундаментальных особенностей развития ишемически-реперфузионных повреждений печени

В зависимости от цели и задач были сформированы группы лабораторных животных, которым моделировали полную или частичную сосудистую изоляцию печени с различной длительностью ишемического и реперфузионного периодов.

2.1.4.1 Исследование динамики маркеров острого повреждения печени

Первым этапом была разработка дизайна исследования, который бы позволил обосновано определять биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов при ИРП печени. Для этого была выбрана экспериментальная модель полной сосудистой изоляции печени с ишемическим периодом 20 минут и забором крови после различной по длительности реперфузии. Всего было использовано 72 лабораторных животных, разделенных на группы по 8 особей. Забор крови в объеме 2–3 мл осуществляли через 5 минут ($n = 8$), 15 минут ($n = 8$), 30 минут ($n = 8$), 60 минут ($n = 8$), 120 минут ($n = 8$), 180 минут ($n = 8$), 8 часов ($n = 8$) и сутки ($n = 8$) после восстановления кровотока. Для сравнения результатов использовали данные группы ложнооперированных животных. Забор крови

осуществляли из каудальной поллой вены в процессе выведения животных из эксперимента. Данные представлены в разделе 3.1.

2.1.4.2 Исследование динамики развития метаболических нарушений при ишемии-реперфузии печени

Для исследования динамики развития метаболических нарушений при ишемически-реперфузионном повреждении печени сформировали 8 групп лабораторных животных. Были сформированы 4 контрольные группы: 1к (n = 8) – псевдооперированные животные, которым выполняли срединную лапаротомию и с последующим забором крови в объеме 150 мкл с интервалом 5 минут в течение 15 минут; 1п (n = 8) – аналогичная группа животных, у которых в те же временные периоды производили забор образцов печени массой 150–200 мг (около 2 % от массы органа); 2к (n = 8) – псевдооперированные животные, которым выполняли забор крови в объеме 150 мкл с интервалом 5 минут в течение 20 минут спустя 15 минут после лапаротомии (имитация сбора крови в реперфузионную стадию); 2п (n = 8) – аналогичная группа животных, у которых в те же временные периоды производили забор образцов печени массой 150–200 мг.

Далее были сформированы 4 опытные группы животных, которым моделировали 15-минутную полную сосудистую изоляцию печени: 3к (n = 10) – крысы, у которых забирали кровь в течение 15 минут ишемии с интервалом 5 минут; 3п (n = 8) – аналогичная группа животных, у которых в те же временные периоды забирали образцы печени; 4к (n = 10) – группа крыс, которым спустя 15 минут ишемии снимали сосудистые зажимы и забирали кровь в реперфузионном периоде спустя 5, 10, 15 и 20 минут; 4п (n = 9) – аналогичная группа животных, у которых забирали печень в те же временные периоды. В результате был разработан дизайн исследования, который позволил отследить динамику изменений окислительного метаболизма в крови и печени с интервалом в 5 минут в ранние сроки реперфузии после 15-минутной ишемии печени. Формирование контрольных групп позволило максимально нивелировать вклад кровопотери и частичной резекции печени в ходе эксперимента у крыс опытных групп. Результаты исследований представлены в разделе 3.2.

2.1.4.3 Сравнительное исследование экспериментальных моделей частичной и полной сосудистой изоляции печени

Сравнение экспериментальных моделей включало выполнение полной и частичной васкулярной эксклюзии печени. Для полной или тотальной сосудистой изоляции пережимали аналог печеночно-двенадцатиперстной связки у крыс на 20 минут ($n = 8$). Частичную сосудистую изоляцию воспроизводили пережатием сосудистых ножек, питающих левую боковую и центральную доли печени на 20 ($n = 8$) или 40 ($n = 8$) минут. Для сравнения в каждой из экспериментальных моделей выжидали 180 минут реперфузии перед забором биоматериала для лабораторных исследований. Результаты исследования описаны в разделе 3.3.

2.1.4.4 Исследование динамики развития метаболических нарушений при односторонней сосудистой изоляции почки

Для исследования динамики развития метаболических нарушений при ишемически-реперфузионном повреждении почки сформировали 4 группы лабораторных животных аналогично принципу, описанному в разделе 2.1.4.2. Были сформированы 2 контрольные группы: 1) псевдооперированные животные ($n = 7$), которым выполняли срединную лапаротомию и с последующим забором крови в объеме 150 мкл с интервалом 5 минут в течение 20 минут; 2) псевдооперированные животные ($n = 7$), которым выполняли забор крови в объеме 150 мкл с интервалом 5 минут в течение 20 минут спустя 20 минут после лапаротомии (имитация сбора крови в реперфузионную стадию). Далее были сформированы 2 опытные группы животных, которым моделировали 20-минутную одностороннюю сосудистую изоляцию левой почки: 3) крысы ($n = 7$), у которых забирали кровь в течение 20 минут ишемии с интервалом 5 минут; 4) группа крыс ($n = 7$), которым спустя 20 минут ишемии снимали сосудистые зажимы и забирали кровь в реперфузионном периоде спустя 5, 10, 15 и 20 минут. В результате был разработан дизайн исследования, который позволил отследить динамику изменений окислительного метаболизма в крови с интервалом в 5 минут в ранние сроки реперфузии после 20-минутной

односторонней ишемии почки. Формирование контрольных групп позволило максимально нивелировать вклад кровопотери в ходе эксперимента у крыс опытных групп. Результаты исследований представлены в разделе 3.3.

2.1.4.5 Исследование состояния окислительного гомеостаза в суспензии митохондрий и цитозольной фракции

Для оценки изменений окислительного гомеостаза в суспензии митохондрий и цитозольной фракции на фоне ИРП печени сформировали 3 группы лабораторных животных: 1) группа ложнооперированных крыс ($n = 10$), у которых забирали печень после срединной лапаротомии без экспериментальной модели ишемии-реперфузии; 2) группа животных ($n = 8$), у которых забирали печень после 15-минутного ишемического периода в ходе тотальной васкулярной эксклюзии без выхода в реперфузионную стадию; 3) группа животных ($n = 8$), у которых забирали печень после 15-минутной реперфузии, следующей за 15-минутной ишемией.

Для оценки изменений мембранного потенциала митохондрий дополнительно сформировали 8 групп лабораторных животных по 7 особей ($n = 56$). Были сформированы 4 группы животных, у которых в ишемической фазе осуществляли забор печени через 10, 15, 20 или 25 минут после начала моделирования полной сосудистой изоляции органа без перехода к реперфузионной стадии. Аналогичным образом были сформированы еще 4 группы крыс, которым также моделировали ишемию печени в течение 10, 15, 20 или 25 минут, но печень забирали спустя 30 минут после восстановления кровотока, т.е. в реперфузионной фазе.

2.1.4.6 Исследование изменений микроэлементного гомеостаза после ишемии-реперфузии печени

Предварительное исследование выполнено на 5 группах лабораторных животных: контрольная группа ложнооперированных крыс ($n = 10$), у которых забирали печень после срединной лапаротомии без экспериментальной модели ишемии-реперфузии (из п. 2.1.4.5) и 4 опытные группы, которым моделировали

полную сосудистую изоляцию печени длительностью 10 ($n = 8$), 15 ($n = 8$), 20 ($n = 8$) или 30 ($n = 8$) минут с последующим 15-минутным периодом реперфузии.

Для анализа изменений маркеров обмена железа в сыворотке крови крыс были сформированы 2 группы животных по 8 особей, которым моделировали 40-минутную частичную васкулярную эксклюзию левой боковой и центральной долей печени с последующим забором крови в реперфузионном периоде из центральной вены хвоста. Кровь забирали в объеме по 150 мкл у животных 1 группы через 5, 60 и 180 минут после восстановления кровотока, у 2 группы через 30 и 120 минут реперфузии. Для сравнения использовали кровь псевдооперированных животных из контрольной группы, описанной в п. 2.1.4.5.

Для оценки микроэлементного гомеостаза в крови и печени (методом ИСП-ОЭС) были сформированы 4 группы лабораторных животных: 1) группа ложнооперированных крыс ($n = 10$); 2) группа крыс, которым моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут ($n = 8$); 3) группа крыс, которым моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут с последующим 15-минутным реперфузионным периодом ($n = 8$); 4) группа крыс, которым моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут с последующим 180-минутным реперфузионным периодом ($n = 9$). У лабораторных животных забирали венозную кровь и ткань печени (отдельно интактные и ишемизированные доли). Результаты исследований описаны в разделе 3.5.

2.1.5 Формирование экспериментальных групп лабораторных животных для анализа фундаментальных особенностей развития ишемически-реперфузионных повреждений печени

В зависимости от цели и задач были сформированы группы лабораторных животных, которым моделировали полную или частичную сосудистую изоляцию печени в условии прекондиционирования различными энерготропными препаратами с разными схемами введения.

2.1.5.1 Исследование эффективности антиоксидантного прекондиционирования

Для сравнительной оценки эффективности метаболической коррекции были сформированы группы лабораторных животных, которым моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут с последующей 180-минутной реперфузией. Основной задачей была модификация состава метаболического препарата, относящегося к группе гепатопротекторов антиоксидантного и антигипоксанта действия – ремаксол (НТТФ Полисан, Россия). Данный препарат выпускается в инфузионной форме и содержит в 1,0 литре раствора янтарную кислоту (сукцинат) – 5,280 г; N-метилглюкамин (меглюмин) – 8,725 г; инозин (рибоксин) – 2,0 г; метионин – 0,75 г; никотинамид – 0,25 г.

Контрольная группа была представлена интактными животными (n = 10), не подвергавшимися каким-либо воздействиям и содержавшимся в аналогичных условиях с крысами других групп.

Крысам группы сравнения и опытных групп вводили:

1. Физиологический раствор 2 мл внутривентрально за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 8).
2. Ремаксол 2 мл внутривентрально за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 8).
3. Раствор аскорбиновой кислоты в дозировке 10 мг/100 г, внутривентрально по 2 мл за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 8).
4. Раствор липоевой кислоты 4 мг/100 г, внутривентрально по 2 мл за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 8).
5. Эмульсию α -токоферола ацетата 4 мг/100 г, внутривентрально по 2 мл за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 9).
6. Ремаксол 2 мл, в котором была предварительно растворена аскорбиновая кислота 10 мг/100 г, внутривентрально за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 8).

7. Ремаксол 2 мл, в котором была предварительно растворена липоевая кислота 4 мг/100 г, внутрибрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 9).

8. Ремаксол 2 мл совместно с эмульсией α -токоферола ацетата 4 мг/100 г внутрибрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 8).

9. Ремаксол 2 мл, в котором были предварительно растворены аскорбиновая кислота 10 мг/100 г и липоевая кислота 4 мг/100 г, внутрибрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 8).

10. Ремаксол 2 мл, в котором были предварительно растворены аскорбиновая кислота 10 мг/100 г и липоевая кислота 4 мг/100 г, совместно с эмульсией α -токоферола ацетата 4 мг/100 г внутрибрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента (n = 9).

После выжидания реперфузионного периода длительностью 180 минут осуществляли забор крови из каудальной полой вены и ткани печени. Выполняли отдельный забор долей печени, которые подвергались сосудистой изоляции и интактных, кровоснабжение которых не ограничивали. Результаты исследования представлены в разделе 4.1.

2.1.5.2 Исследование влияния модификации активности пируватдегидрогеназы

Для сравнительной оценки эффективности метаболической коррекции были сформированы группы лабораторных животных, которым моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут с последующей 180-минутной реперфузией. Основной задачей была оценка возможности preconditionирования ИРП печени путем модификации активности пируватдегидрогеназы. Для этого были использованы ДХА натрия (активатор), липоевая кислота и кокарбоксилаза (коферменты ПДК).

Контрольная группа была представлена интактными животными (n = 8), не подвергавшимися каким-либо воздействиям и содержавшихся в аналогичных условиях с крысами других групп.

Крысам группы сравнения и опытных групп вводили:

1. Физиологический раствор 2 мл внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).
2. Раствор дихлорацетата натрия 100 мг/100 г, внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).
3. Раствор липоевой кислоты 4 мг/100 г, внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).
4. Раствор кокарбоксилазы 4 мг/100 г, внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).
5. Раствор дихлорацетата натрия 100 мг/100 г и липоевой кислоты 4 мг/100 г, внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).
6. Раствор дихлорацетата натрия 100 мг/100 г и кокарбоксилазы 5 мг/100 г, внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).

После выжидания реперфузионного периода длительностью 180 минут осуществляли забор крови из каудальной полой вены. Результаты исследования представлены в разделе 4.2 таблицы 4.3 и 4.4.

Отдельно был проведен анализ возможности модификации ремаксолa за счет регуляторов ПДК. Для этого были сформированы группы:

Контрольная группа была представлена интактными животными ($n = 10$), не подвергавшимися каким-либо воздействиям и содержащимся в аналогичных условиях с крысами других групп. Использованы данные групп (1–3 группы), включенной в дизайн исследования, описанный в п 2.1.5.1.

Крысам группы сравнения и опытных групп вводили:

1. Физиологический раствор 2 мл внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).
2. Ремаксол 2 мл внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).
3. Ремаксол 2 мл совместно с раствором дихлорацетата натрия 100 мг/100 г внутривбрюшинно за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).

4. Ремаксол 2 мл совместно с раствором дихлорацетата натрия 100 мг/100 г и аскорбиновой кислотой 10 мг/100 г внутривентрально за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 8$).

5. Физиологический раствор 2 мл, в котором был предварительно растворен пируват натрия 10 мг/мл, липоевая кислота 10 мг/мл, тиаминдифосфат 10 мг/мл и дихлорацетат натрия 35 мг/мл, внутривентрально за 1 сутки и за 30 минут перед выполнением эксперимента ($n = 7$).

Животных группы сравнения и опытных групп моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут с последующей 180-минутной реперфузией. После выжидания реперфузионного периода осуществляли забор крови из каудальной полой вены. Результаты исследования представлены в разделе 4.2 таблица 4.5.

2.1.5.3 Исследование возможности прооксидантного прекондиционирования

Оценку возможности использования прооксидантов для коррекции ИРП печени проводили в условиях модели частичной сосудистой изоляции печени.

Соответственно были сформированы группы животных, которым моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут с 3-часовым реперфузионным периодом и вводили:

1) за сутки до моделирования сосудистой эксклюзии вводили 1 мл физиологического раствора внутривентрально ($n = 8$);

2) за сутки до моделирования сосудистой эксклюзии вводили 1 мл 0,5 % раствора трет-бутил гидропероксида внутривентрально ($n = 8$);

3) за сутки до моделирования сосудистой эксклюзии вводили 1 мл 0,1 % раствора трет-бутил гидропероксида внутривентрально ($n = 8$);

4) за сутки до моделирования сосудистой эксклюзии вводили 1 мл 1 % раствора трет-бутил гидропероксида внутривентрально ($n = 8$);

5) за сутки до моделирования сосудистой эксклюзии вводили 1 мл 0,01 % раствора трет-бутил гидропероксида внутривентрально ($n = 8$).

1-ю группу составили интактные животные ($n = 8$), доноры крови для формирования относительно нормальных значений (референсных). Также были набраны 3 группы животных по 5 особей, которым внутривенно вводили по 1 мл: 1) 1 % раствор пероксида водорода; 2) 2 % раствор пероксида водорода; 3) 3 % раствор пероксида водорода. Эксперимент проводили в аналогичных условиях, описанных выше в данном разделе.

После реперфузии длительностью 180 минут животных выводили из эксперимента и забирали кровь из каудальной полой вены для лабораторных исследований. Результаты исследований представлены в разделе 4.3.

2.1.5.4 Исследование прекондиционирования хелаторами ионов металлов

Оценку возможности использования хелаторов для коррекции ИРП печени проводили в условии модели частичной сосудистой изоляции печени. Были сформированы группы животных, которым моделировали частичную сосудистую изоляцию печени в течение 40 минут с 3-часовым реперфузионным периодом. Животным 1 группы (группа сравнения, $n = 8$) за 30 минут до эксперимента вводили 0,5 мл физиологического раствора, крысам 2 группы ($n = 7$) вводили 0,5 мл 0,2 % раствора неселективного хелатора – ЭДТА, крысам 3 группы ($n = 7$) вводили 0,5 мл 0,4 % раствора ЭДТА, крысам 4 группы ($n = 7$) вводили 0,5 мл раствора дефероксамина (Desferal 500 мг, Novartis) в пересчете на дозировку 50 мг/кг. После моделирования ИРП забирали кровь из каудальной полой вены для лабораторных исследований. Результаты исследований представлены в разделе 4.4.

2.2 Дизайн клинической части исследования

Клиническая часть исследования была посвящена анализу дисбаланса окислительного метаболизма у больных с поражением печени на фоне

употребления психоактивных веществ в том числе в условии терапии с использованием средств метаболической направленности действия.

Клиническое исследование выполнено на базе ГБУЗ «Наркологический диспансер» МЗ КК (г. Краснодар), в стационаре которого больные проходили курс дезинтоксикационно-стабилизационного лечения. Испытуемые лица контрольной группы были набраны из добровольцев, проходящих диспансеризацию на базе Клиники ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Лабораторный этап настоящего исследования выполнен на трех базах: клиничко-диагностические лаборатории университетской клиники и наркодиспансера, лаборатория кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Для оценки эффективности метаболической гепатопротекции (результаты представлены в разделе 5.1) у больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ были сформированы следующие группы испытуемых лиц:

- 1) контрольная группа – относительно здоровые добровольцы женского пола («К», $n = 20$);
- 2) больные с синдромом зависимости от опиоидов («О», $n = 30$);
- 3) больные с синдромом зависимости от психостимуляторов («П», $n = 30$);
- 4) больные с синдромом алкогольной зависимости («А», $n = 30$).

Больные наблюдались на базе ГБУЗ «Наркологический диспансер» Министерства здравоохранения Краснодарского края. Кровь у больных забирали на момент поступления больных в стационар и после 15–19 дней проведения дезинтоксикационно-стабилизационного курса лечения.

Больные 3 группы были разделены на 2 подгруппы в зависимости от проводимой дезинтоксикационной терапии: «С» (стандартный курс терапии) и «Р» (стандартный курс терапии, дополненный ремаксолом). Стандартный курс дезинтоксикационно-стабилизационного лечения включал применение медикаментозных средств для купирования психических нарушений: транквилизаторы, антидепрессанты, нейролептики и «малые» нейролептики. Ремаксол вводили по 400 мл 1 раз в день в течение 10 дней со скоростью внутривенной инфузии 2–3 мл/мин.

Больные 4 группы также были разделены на подгруппы в зависимости от схемы проводимой терапии и использования гепатопротекторов метаболического действия: «С» (стандартный курс терапии), «Р» (стандартный курс терапии, дополненный ремаксолом), «Р+» (стандартный курс терапии, дополненный ремаксолом, витамином С и липоевой кислотой). Вводили раствор аскорбиновой кислоты для инъекций 10 % 2 мл и «Октолипен» концентрат для приготовления раствора для инфузий 30 мг/мл 10 мл по 1 ампуле в сутки.

Критерии включения в исследование для контрольной группы: возраст 20–40 лет; мужской пол, отсутствие соматических патологий, состояние психического здоровья на момент обследования, наличие добровольного информированного согласия.

Критерии включения в исследование для больных группы 2: возраст 20–40 лет; мужской пол; диагноз в соответствии с МКБ: F11.2 Синдром зависимости. Стадия синдрома зависимости – вторая и третья. Реабилитационный потенциал: средний или высокий. Наличие добровольного информированного согласия.

Критерии включения в исследование для больных группы 3: возраст 20–40 лет; мужской пол; диагноз в соответствии с МКБ: F15.2 Синдром зависимости. Стадия синдрома зависимости – вторая и третья. Реабилитационный потенциал: средний или высокий. Наличие добровольного информированного согласия.

Критерии включения в исследование для больных группы 4: возраст 20–40 лет; мужской пол; диагноз в соответствии с МКБ: F10.2 Синдром зависимости. Стадия синдрома зависимости – вторая и третья. Реабилитационный потенциал: средний или высокий. Темп прогрессивности средний. Тип употребления постоянный. Наличие добровольного информированного согласия.

Критерии невключения: возраст старше 40 или моложе 20 лет; женский пол; наличие онкологических заболеваний; наличие любых острых или хронических заболеваний в стадии обострения, не относящихся к исследуемым нозологическим формам; тяжелые неврологические и психические расстройства; неконтролируемый прием ЛП, БАДов, лекарственных трав. Несоответствие требованиям критерий включения по стадии заболевания, реабилитационному

потенциалу, темпу прогрессивности, типу употребления. Отсутствие добровольного информируемого согласия.

Для оценки эффективности комбинированной метаболической коррекции повреждений печени при алкогольном гепатите с использованием серосодержащих гепатопротекторов (результаты представлены в разделе 5.2) были сформированы следующие группы испытуемых лиц:

Контрольная группа (№ 1) – 15 здоровых мужчин, которые проходили обследование на базе диспансерно-поликлинического отделения в рамках медицинских осмотров;

Основная группа – больные ($n = 30$) алкогольной болезнью печени (алкогольный гепатит). Больные были рандомизированы в три опытные группы, различающиеся по признаку получаемого гепатопротекторного средства в составе комплексной схемы дезинтоксикационно-стабилизационного курса лечения. Больные группы № 2 получали адеметионин (400 мг в/в ежедневно в составе лекарственного препарата «Гепцифол», Фармсинтез АО, Россия). Больным группы № 3 вводили липоевую кислоту (600 мг в/в ежедневно в составе лекарственного препарата «Октолипен», Уфимский витаминный завод, Россия). Больные группы № 4 получали комбинированную терапию, включающую введение адеметионина и липоевой кислоты в вышеуказанных дозировках и в составе вышеуказанных лекарственных препаратов. Общая продолжительность наблюдения и курса дезинтоксикационно-стабилизационного лечения составляла 15–18 суток на базе стационара. Сбор биоматериала (кровь) осуществляли двукратно: на этапе поступления больных в стационар – до начала лечения и перед их выпиской.

Критерии включения: возраст 20–40 лет; мужской пол; для контрольной группы – отсутствие соматических и психических заболеваний в стадии обострения; для больных – наличие установленного специалистами базе ГБУЗ «Наркологический диспансер» МЗ КК диагноза «алкогольная болезнь печени» (алкогольный гепатит); наличие добровольного информируемого согласия в письменной форме.

Критерии не включения: наличие злокачественных новообразований; наличие заболеваний легочной и сердечно-сосудистой системы, инфекционных заболеваний, нервных болезней и нарушений психического статуса; отягощенный аллергологический анамнез, бесконтрольный прием лекарственных препаратов и парафармацевтиков.

Критерии исключения: добровольный отказ пациента от оказания медицинской помощи или участия в данном исследовании; развитие осложнений, напрямую не связанных с проведением настоящего исследования, в том числе развитие острого респираторного инфекционного заболевания.

2.3 Лабораторные исследования

Используемые средства: для проведения лабораторных исследований были использованы: мультимодальный планшетный ридер FluostarOmega (BMG, Германия), автоматический биохимический анализатор Super Z (Rayto Life and Analytical Sciences Co, Китай), сканирующий двулучевой спектрофотометр УФ/Вид области спектра модель PERSEE T9DCS (PG Instrument, Китай), спектрометр эмиссионный с индуктивно связанной плазмой Plasma 3000 (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), термошейкер TS-100C BioSan с охлаждением, ультразвуковой гомогенизатор Sonopuls mini20, Bandelin (Германия), гомогенизатор IKA Ultra-TurraX T18 digital (IKA, Германия), pH-метр PH400F в комплекте с электродом E-301-QC (INESA Scientific Instrument Co, Ltd, Китай), промыватель микропланшетный BK-9622 (Biobase, Китай), центрифуга низкоскоростная DM0408 в комплекте с ротором A12-10P и адаптерами A10P15 и A10P15 plug (DLAB Scientific Co., Ltd, Китай), комплект нагревательной плитки

HP550-S с термодатчиком PT1000A и держателем (DLAB Scientific Co., Ltd, Китай), морозильник низкотемпературный DW-HW50 (Китай).

2.3.1 Определение маркеров цитолиза гепатоцитов и биохимических показателей крови

Для оценки выраженности поражения печени при моделировании ишемически-реперфузионного синдрома *in vivo* в плазме крови животных или в сыворотке крови больных клинической части исследования определяли ряд классических маркеров – активность АСТ, АЛТ, ЛДГ и ГГТ с использованием наборов реагентов АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия) ручным методом на спектрофотометре и Randox (Великобритания) с помощью автоматического биохимического многоканального анализатора Super Z (Rayto Life and Analytical Sciences Co, Китай). Артикулы наборов реагентов «Витал Девелопмент Корпорэйшн»: В 01.01, В 01.15, В 02.01, В 02.15, В 23.12. Артикулы наборов реагентов Randox: AL3801, AS3804, LD3818, GT3874.

Для комплексной характеристики функции печени в клинической части исследования в сыворотке крови испытуемых лиц определяли концентрацию общего билирубина и сывороточного альбумина с использованием наборов реагентов (BR3859, AB3800) Randox (Великобритания) колориметрическими методами на автоматическом биохимическом многоканальном анализаторе Super Z (Rayto Life and Analytical Sciences Co, Китай).

2.3.2 Определение показателей энергетического обмена

Для оценки энергетического обмена определяли следующие параметры: концентрация лактата и пирувата, изменения мембранного потенциала митохондрий, активность пируватдегидрогеназы.

Для определения концентрации лактата использовали набор реагентов LC3980 фирмы Randox (Великобритания). Лабораторные работы проводили в автоматическом режиме на анализаторе Super Z. Для определения концентрации пирувата использовали набор реагентов «ПИРУВАТ UV-АБРИС+ Энзиматический UV-метод» («НПФ АБРИС+», Россия). Лабораторные работы проводили в ручном режиме на спектрофотометре.

Для определения активности пируватдегидрогеназы (ПДГ) использовали набор реагентов ab110671 Pyruvate dehydrogenase (PDH) Combo (Activity +Quantity) Microplate Assay Kit (Abcam Limited, Великобритания). Принцип определения заключается в иммунозахвате ПДГ в лунках микропланшета, с последующим восстановлением НАД⁺ до НАДН в сочетании с восстановлением репортерного красителя и получения окрашенного (желтого) продукта реакции, концентрацию которого можно контролировать путем измерения поглощения при 450 нм. Измерения проводили в микропланшетном формате с использованием мультимодального ридера.

Определение мембранного потенциала митохондрий осуществляли с использованием катионного флуоресцентного красителя сафранин О (AppliChem, США) в конечной концентрации в реакционной смеси 1 мкМ [18]. Концентрация митохондрий в конечной смеси составляла 0,3 мг белка/мл. Энергизацию осуществляли внесением в реакционную смесь 10 мкМ ротенона и 5 мМ сукцината. Для деэнергизации в реакционную смесь вносили ингибитор цитохромов 1 мМ азид натрия. Регистрацию интенсивности флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра CM 2203 (Solar, Беларусь) при длине волны возбуждения – 495 нм и длине волны испускания – 586 нм (рисунок 2.6). Все измерения выполняли в термостатируемой кювете при 25 °С при постоянном перемешивании. Расчет мембранного потенциала митохондрий осуществляли теоретически по формуле, предложенной и апробированной в работах [21, 83].

Микровязкость мембран определяли по данным коэффициента эксимеризации пирена. Для этого использовали 0,1 мМ раствор пирена в этаноле,

суспензию митохондрий с концентрацией белка 1 мг/мл. Измерения интенсивности флуоресценции эксимеров пирена осуществляли при длине волны испускания флуоресценции 470 нм, мономеров пирена при длине волны флуоресценции 371,5 нм. Длина волны возбуждения – 340 нм.

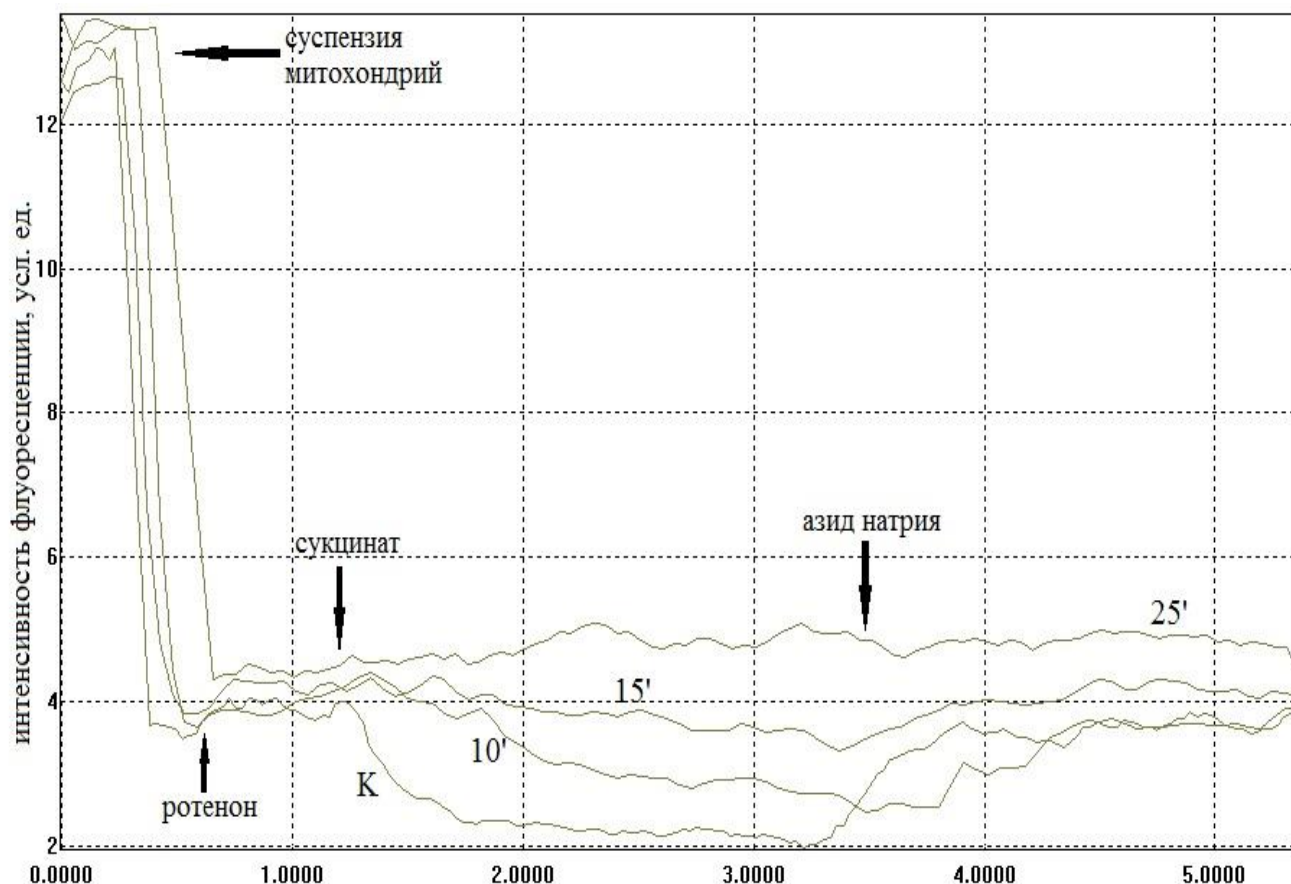


Рисунок 2.6 – Типичные кинетические кривые интенсивности флуоресценции сафранина О в энергизированном и деэнергизированном состоянии митохондрий после различной по длительности ишемии печени крыс: К – митохондрии печени крысы из контрольной группы; 10', 15', 25' – образцы митохондрий печени крыс после 10-, 15- и 25-минутной сосудистой изоляции соответственно

Коэффициент эксимеризации пирена F , величина которого обратно пропорциональна микровязкости мембраны, определяли по формуле:

$$F = (I_{470\text{пир}} - I_{470\text{б/пир}}) / (I_{370\text{пир}} - I_{370\text{б/пир}}),$$

где $I_{470\text{пир}}$ – интенсивность флуоресценции клеточной суспензии в присутствии пирена; $I_{470\text{б/пир}}$ – интенсивность флуоресценции клеточной суспензии в отсутствии пирена; аналогично построены подстрочные обозначения для I_{370} [4].

2.3.3 Определение показателей прооксидантно-антиоксидантной системы

Для оценки состояния прооксидантно-антиоксидантного статуса биожидкостей определяли общую антиоксидантную активность, содержание восстановленного и окисленного глутатиона, тиоловых групп белков плазмы крови, активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, каталазы и супероксиддисмутазы, содержание диеновых конъюгатов, 8-гидрокси 2-деоксигуанозина (8-OHdG) и ТБК-реактивных продуктов.

Для определения общей антиоксидантной активности использовали 2 химических колориметрических способа: железо-восстанавливающий (FRAP) и способ оценки скорости сорбции катионного радикала АБТС (рисунок 2.7). Определение железо-восстанавливающей способности биообразцов в среде ацетатного буфера с pH 3,6 инкубировали с раствором FeCl_3 и 2,2'-дипиридилем, который дает красный окрашенный комплекс (максимум поглощения при 520 нм) с восстановленной формой Fe^{+2} [91]. Для оценки антирадикальной активности биожидкостей использовали раствор катионного радикала 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) диаммониевой соли (АБТС). Водный раствор катионного радикала имеет интенсивно зеленую окраску, которая имеет максимум поглощения 734 нм. При внесении биожидкости, содержащей антиоксиданты, радикал восстанавливается и переходит в бесцветную форму. По скорости снижения оптической плотности, сравнивая со стандартными растворами аскорбиновой кислоты, судили об общей антиоксидантной (антирадикальной) активности [213].

Содержание восстановленного и окисленного глутатиона определяли по методике, основанной на использовании реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), ДТБН) (рисунок 2.7). Биожидкость подвергали депротеинизации сульфосалициловой кислотой в конечной концентрации 5 %,

отбирали надосадочную жидкость в которую в условии среды трис-НСl буфера рН = 8,5 вносили раствор ДТНБ. Концентрация восстановленной формы глутатиона прямо пропорциональна интенсивности окраски тионитрофенильного аниона с максимумом поглощения при 412 нм [5].

Принцип определения ОАОА железо-восстанавливающим методом



Принцип определения способности радикальной сорбции биожидкостей



Принцип определения тиолсодержащих соединений

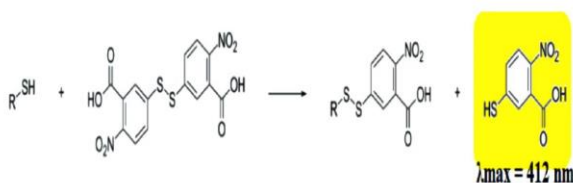


Схема образования ТБК-реактивных продуктов

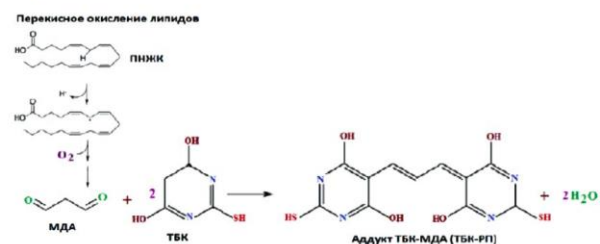


Рисунок 2.7 – Принципы определения состояния неферментного звена прооксидантно-антиоксидантной системы

В гомогенате печени содержание восстановленного и окисленного глутатиона определяли с использованием коммерческого набора реагентов E-BC-K097-M Total Glutathione (T-GSH)/Oxidized Glutathione (GSSG) Colorimetric Assay Kit,96T (Elabscience, КНР).

Определение тиоловых групп белков плазмы крови, их отдельных фракций (легко- и труднодоступные SH-группы) определяли по их способности реагировать с ДТНБ с высвобождением тионитрофенильного аниона. Реакцию проводили в среде фосфатного буферного раствора с рН 7,4 [14, 234].

Определение активности глутатионпероксидазы проводили по методике, основанной на расходовании глутатиона при нейтрализации гидроперекиси трет-бутила (ГПТБ). Для этого использовали гемолизат эритроцитов (1 : 499) или гомогенат печени, сложный буферный раствор, содержащий 15 мг

восстановленного глутатиона, 7,8 мг азиды натрия в 10 мл 0,1М трис-HCl буферного раствора pH = 8,5. После инкубации биожидкости со сложным буфером вносили 0,05 % раствор ГПТБ и через 10 минут останавливали реакцию внесением 20 % раствора ТХУК. В контрольные пробы вносили раствор ТХУК до ГПТБ. В супернатанте полученном после осаждения белков определяли концентрацию глутатиона, об активности фермента судили по разнице концентраций остаточного глутатиона в контрольной и опытной пробах [5].

Определение активности глутатионредуктазы выполняли по методике, основанной на реакции фермента – восстановлении окисленной формы глутатиона с использованием НАДФН. Об активности судили по изменению поглощения НАДФН, которое регистрировали в УФ-области спектра при 340 нм [5].

Определение активности глутатион-S-трансферазы осуществляли по методике, основанной на измерении скорости образования конъюгата с 2,4-динитро-1-хлорбензолом. Фотометрические измерения проводили в УФ-области спектра света при 340 нм [5].

Определение активности каталазы было основано на способности перекиси водорода поглощать свет в УФ-области спектра при 260 нм [5].

Определение активности супероксиддисмутазы выполняли по непрямому методу, основанному на регистрации степени торможения реакции окисления кверцетина в среде с генерацией супероксидных анион-радикалов [7].

Определение первичных продуктов перекисного окисления липидов в крови (диеновых конъюгатов) проводили по методике, основанной на оценке интенсивности поглощения липидным экстрактом при длине волны 233 нм [15].

Для определения концентрации 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) использовали коммерческие наборы реагентов ab201734 (Abcam, USA), основанные на иммуноферментном методе.

Определение содержания продуктов липопероксидации выполняли по методике, основанной на реакции карбонильных соединений с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), с образованием так называемых ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП) (рисунок 2.6). Для определения использовали коммерческие наборы реагентов ТБК-АГАТ (ООО «Агат-Мед», Россия).

Интенсивность клеточной генерации АФК в гепатоцитах определяли с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата, который инкубировали с суспензией клеток в течение 1 часа при 37 °С в темноте. Интенсивность флуоресценции измеряли при условии $\lambda_{\text{возб/рег}} = 485/535$ нм на спектрофлуориметре CM2203 (Solar, Беларусь). Значения, полученные при различных условиях, были выражены как процентное изменение по сравнению с контрольным условием [66].

2.3.4 Определение показателей микроэлементного обмена

Для оценки выраженности поражения печени при моделировании ишемически-реперфузионного синдрома *in vivo* в плазме крови животных определяли концентрацию ионов кальция, магния и цинка с использованием наборов реагентов АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия) ручным методом на спектрофотометре. Использовали реагенты со следующими артикулами: В 18.01, В 25.11 и В 22.01.

Для определения сывороточного железа и ферритина использовали наборы реагентов (SI8330, FN3452) Randox (Великобритания) на автоматическом биохимическом многоканальном анализаторе Super Z (Rayto Life and Analytical Sciences Co, Китай).

Анализ общего содержания в плазме крови и печени железа, меди, магния, цинка, кальция и кремния проводили методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Использовали спектрометр эмиссионный с индуктивно связанной плазмой Plasma 3000 (Китай). Минерализацию проб осуществляли мокрым методом с концентрированной азотной кислотой в СВЧ-печи. Подача проб осуществлялась автосамплером. Распылительная система характеризовалась скоростью потока 0,75 л/мин. Настройки измерения: время измерения 8,0 с, мощность детектора 1150 Вт.

Определение концентраций микроэлементов проводили по стандартной кривой, построенной с использованием многоэлементного стандартного образца МЭС-1, партия 123-3 (ООО НПП «Скат», Россия). Измерения кальция проводили на длине волны 396.847 нм, железа – 238.204 нм, магния – 279.553, цинка – 213.856, меди – 327.396 нм, кремния – 251.612 нм. Для анализа кальция использовали радикальный обзор плазмы, в остальных случаях – аксиальный.

2.4 Статистический анализ данных

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием программы AnalystSoft Inc., StatPlus – программа статистического анализа. Версия 7. См. www.analystsoft.com/ru/. Описательная статистика включала расчет характеристик выборок, таких как среднее значение, стандартное отклонение, медиана, 25 и 75 процентиля (1 и 3 квантили). Проверка на нормальность включала автоматическое определение целого ряда критериев, среди которых ориентировались в первую очередь на критерий Шапиро-Уилка, который предпочтителен для использования при небольших объемах выборки [19]. Дальнейшая работа с данными была основана на характере распределения: в случае соответствия их нормальному закону распределения использовали параметрические методы статистического анализа, в случае несоответствия – непараметрические [20]. Для сравнения выборок, которые не подчиняются нормальному закону распределения, использовали непараметрический аналог дисперсионного анализа – критерий Краскела-Уоллиса. В том случае, если рассчитанное значение критерия Краскела-Уоллиса превышало критическое, различия показателей считались статистически значимыми. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. В противном случае признавалась верной нулевая гипотеза. В случае обнаружения статистически значимых различий между группами, дополнительно проводилось парное сравнение

совокупностей при помощи апостериорного критерия Данна. При сравнении более двух зависимых совокупностей, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический критерий Фридмана. С целью изучения связи между явлениями, представленными количественными данными, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический метод – расчет коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для анализа взаимосвязи показателей использовали метод множественной линейной регрессии с обратной подборкой предикторов для формирования наиболее оптимальной модели.

ГЛАВА 3.

ПАТОБИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ОКСИДАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ- РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

В литературном обзоре обсуждалось, что ключевым патобиохимическим процессом при ишемии и в особенности реперфузии является окислительный стресс, развивающийся на фоне интенсификации свободнорадикальных реакций в результате генерации АФК и АФА целым рядом источников. Накоплено большое количество данных о механизмах развития ишемически-реперфузионного синдрома, однако целостная картина развития патологического процесса окончательно не сформирована. В этой главе представлены данные, задача которых решение данной проблемы в области детализации динамики развития дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы. Для этого был проведен анализ изменений окислительного метаболизма в разные сроки ишемического и реперфузионного периодов, проведено сравнение экспериментальных моделей частичной и полной васкулярной эксклюзии печени, изучены изменения маркеров окислительного стресса и функционального состояния антиоксидантной системы в крови и гомогенате печени, в суспензии митохондрий гепатоцитов и цитозоле.

3.1 Оценка динамики маркеров острого повреждения печени в эксперименте

Одной из первых задач, на решение которой нацелена диссертационная работа, был выбор оптимального маркера повреждения гепатоцитов при ишемии-реперфузии печени и оптимальной экспериментальной модели сосудистой изоляции печени. Традиционно оценка степени повреждения печени

основывается на определении маркеров цитолитического синдрома – печеночных ферментов, таких как АЛТ, АСТ, ЛДГ и др. Активность этих индикаторных ферментов возрастает в сыворотке крови на фоне поражения паренхимы печени, однако требует уточнения динамика их роста и восстановления для использования в диагностических целях, особенно при анализе способов коррекции ишемически-реперфузионного синдрома. Дизайн этой части исследования подробно описан в разделе 2.1.4.1 главы «Материалы и методы».

Определение активности АЛТ позволило установить наличие определенного пика, приходящегося на 3 час после восстановления кровотока следом за 20-минутной полной сосудистой изоляцией печени, которую моделировали путем пережатия аналога гепатодуоденальной связки у крыс (рисунок 3.1).

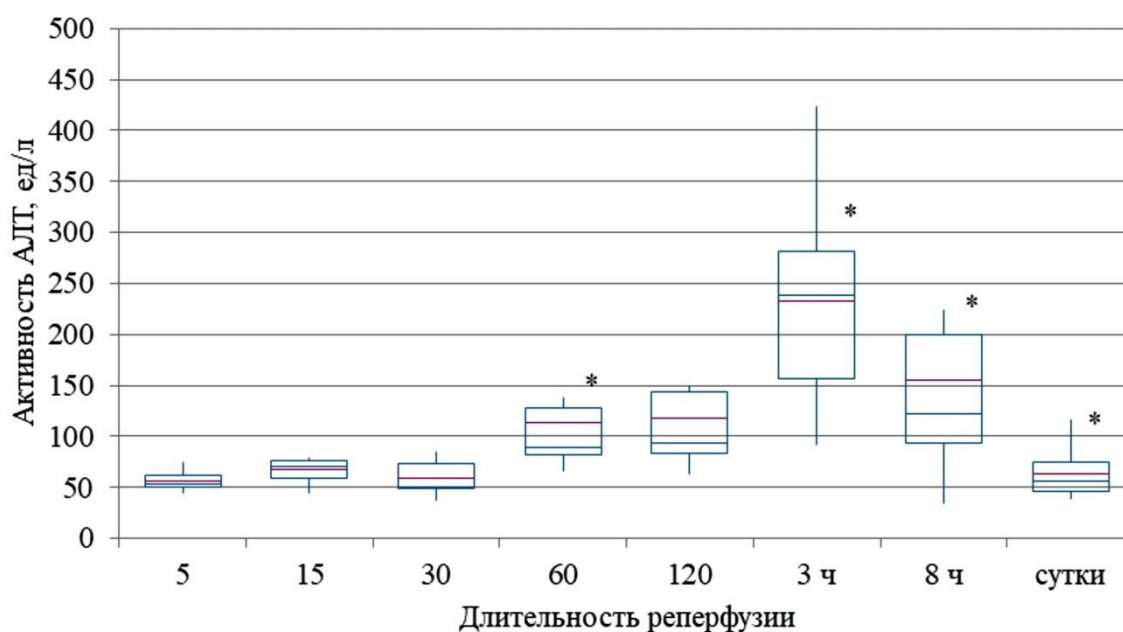


Рисунок 3.1 – Изменение активности аланинаминотрансферазы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

В эти сроки реперфузионной фазы активность АЛТ в 10,3 раза превышает активность фермента в контрольной группе лабораторных животных (23,4 (18,8/25,4) ед/л). Увеличенные в 2,2–3,0 раза значения активности АЛТ

регистрировались практически сразу после начала реперфузии и в течение полу часа поддерживались на таком же уровне. В течение 2-го часа наблюдения регистрировалось увеличение активности АЛТ до уровня, превышающего контрольные значения в 4,0 раза. Определение активности фермента спустя 8 часов и сутки после ишемии показало постепенную и почти полную нормализацию показателя, что отражает острое течение патологического процесса и вероятно легко обратимый характер выявленных изменений.

Активность АСТ во многом повторяла изменения активности аминотрансферазы, рассмотренной выше. Для нее был также характерен максимум через 3 часа после восстановления кровотока в паренхиме печени (рисунок 3.2).

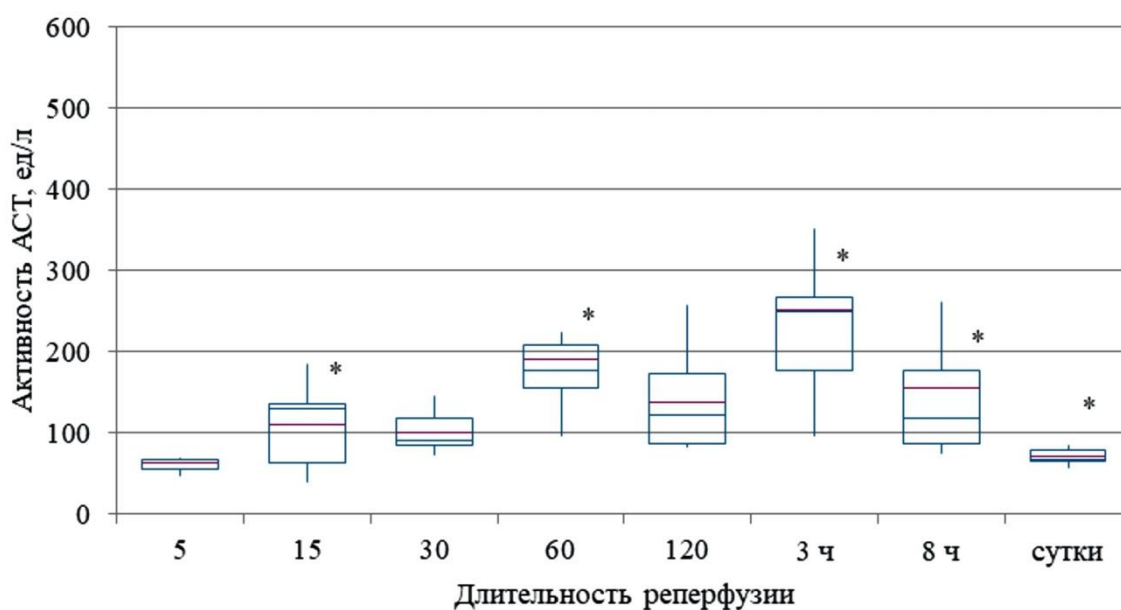


Рисунок 3.2 – Изменение активности аспартатаминотрансферазы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Однако рост активности АСТ был не таким значительным и составлял 5,7 раза относительно контрольных цифр (43,8 (41,6/48,4 ед/л)). До этого момента наблюдался также постепенный рост активности фермента в плазме крови, особенно в период между 30 и 60 минутами реперфузионной фазы. Через сутки после моделирования полной сосудистой изоляции печени активность АСТ

оставалась выше контрольного уровня только на 54 %, что в целом соответствовало изменениям активности АЛТ.

Активность другого известного маркера цитолиза гепатоцитов – ЛДГ изменялась несколько иным образом (рисунок 3.3).

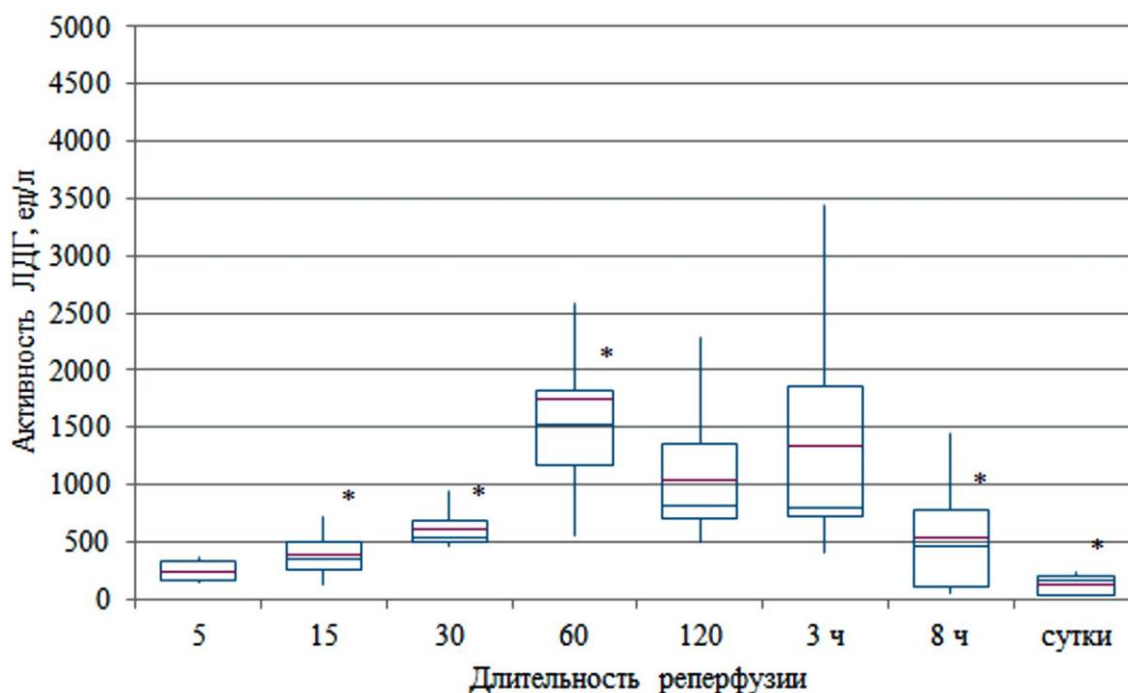


Рисунок 3.3 – Изменение активности лактатдегидрогеназы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

В данном случае не было выявлено какого-то фиксированного максимума значения показателя, привязанного к определенной временной точке. Однако максимальные значения активности ЛДГ были определены на достаточно широком временном интервале от 60 минут до 3 часов после восстановления кровотока в паренхиме печени. Увеличение активности фермента в плазме крови в этом периоде достигало 10,0 раз относительно контрольных цифр (152,3 (103,4/165,7 ед/л)). К 60 минуте восстановления кровотока отмечалось постепенное нарастание активности ЛДГ, достигающее 3,5 раз к 30-й минуте реперфузии, а после 3-х часов постепенно активность фермента снижалась, достигая контрольного уровня значений соответствующего показателя через сутки после экспериментального моделирования сосудистой изоляции печени.

Активность глутатион-S-трансферазы в плазме крови животных после ишемии печени в отличие от аминотрансфераз и ЛДГ изменялась принципиально другим образом (рисунок 3.4).

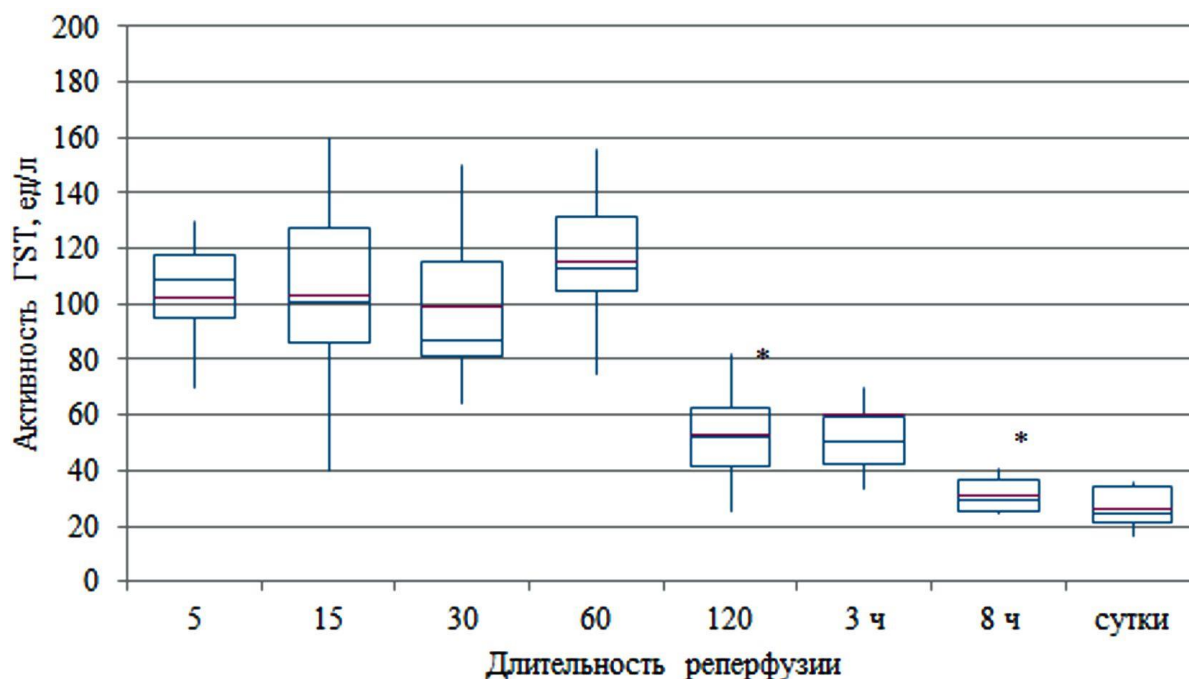


Рисунок 3.4 – Изменение активности глутатион-S-трансферазы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Определение активности данной трансферазы показало увеличенные ее значения уже на 5 минуте реперфузии с сохранением высокого уровня значений, превышающих контрольные в 4,0–5,2 раза, до 60 минуты восстановления кровотока через сосудистые пучки печечно-двенадцатиперстной связки. Однако уже ко 2 часу реперфузии наблюдалось резкое снижение активности GST. В течение 120–180 минут реперфузионного периода активность анализируемого фермента еще поддерживалась на увеличенном в 2,0 раз уровне, а затем и вовсе снижалась до контрольных значений аналогичного параметра. Таким образом, для GST были характерны резкие значительные изменения в отличие от постепенного нарастания и снижения активности АЛТ, СТ и ЛДГ, а также был характерен другой временной интервал максимальной активности фермента в плазме крови.

Концентрация молочной кислоты – одна из ключевых метаболических характеристик, определяющих тяжесть гипоксии и ишемии печени. Ожидаемо максимальная концентрация лактата в плазме крови – в 4,4 раза выше контроля (2,5 (2,2/2,8) ммоль/л) была определена сразу после восстановления кровотока. При этом высокий уровень молочной кислоты в плазме крови поддерживался в течение 60 минут реперфузии ткани печени с последующим постепенным снижением вплоть до контрольного уровня через сутки после 20-минутной тотальной ишемии печени (рисунок 3.5).

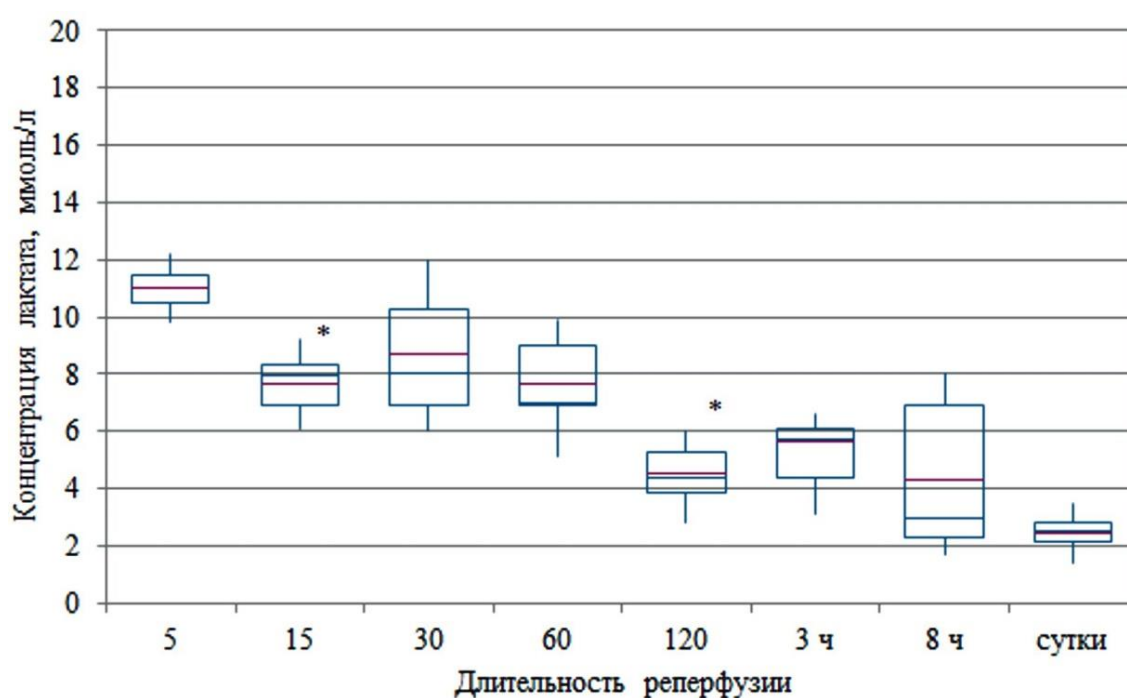


Рисунок 3.5 – Изменение концентрации молочной кислоты в плазме крови в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Параллельно оценке маркеров цитолитического синдрома выполняли определение в крови некоторых маркеров окислительного стресса и функционального состояния системы антиоксидантной защиты (таблица 3.1). Это конечно обусловлено тем, что оксидативный стресс – основная причина повреждения гепатоцитов при ишемии-реперфузии и эти две группы маркеров должны хорошо коррелировать друг с другом.

Таблица 3.1 – Изменение антиоксидантного потенциала и активности каталазы в крови в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q₁/Q₃))

Длительность реперфузии	Показатели		
	FRAP, мМ вит С	АБТС, мМ вит С	КАТ, моль/л*мин
	плазма крови		эритроциты
контроль	0,41 (0,38/0,44)	0,50 (0,47/0,53)	28,5 (27,5/29,4)
5 мин	0,80 (0,82/1,10)*	1,15 (0,96/1,16)*	23,3 (19,9/26,7)*
15 мин	1,68 (1,42/1,82)*	0,67 (0,51/0,76)*	20,3 (17,1/24,9)
30 мин	1,58 (1,47/1,96)	1,11 (0,89/1,33)*	25,4 (18,8/27,2)
60 мин	0,64 (0,40/0,92)*	0,98 (0,85/1,11)	26,9 (20,2/32,6)
120 мин	0,42 (0,32/0,56)	0,75 (0,52/0,78)*	16,5 (8,5/19,1)*
3 ч	0,37 (0,30/0,49)	0,21 (0,15/0,31)*	23,6 (14,1/24,1)
8 ч	0,25 (0,16/0,49)	0,15 (0,09/0,19)	25,9 (18,8/28,2)
сутки	0,52 (0,49/0,57)	0,16 (0,13/0,22)	18,4 (15,5/19,4)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения.

Ожидаемым результатом изменения уровня антиоксидантной активности крови на фоне ишемии-реперфузии печени было снижение данного показателя (таблица 3.1). Однако результаты оказались не такими однозначными. Определение железо-восстанавливающей способности и степени радикальной сорбции плазмы крови показало увеличение обоих параметров в течение 60 минут после восстановления кровотока, следующего за 20-минутной ишемией печени. Максимальный рост 1-го показателя наблюдался к 15 минуте и достигал 4,1 раза относительно контроля, 2 показатель достигал максимальных значений, превышающих контрольные в 2,2 раза, к 30 минуте. При этом оба показателя уже на 5 минуте реперфузии были увеличены относительно соответствующих параметров группы ложнооперированных крыс в 2,0–2,2 раза. На временном отрезке 60–120 минут уровень антиоксидантной активности плазмы крови животных, подвергшихся полной сосудистой изоляции в течение 20 минут, определялся в пределах контрольных значений аналогичных маркеров, и только после 3 часов реперфузионного периода наблюдалось снижение значений обоих рассматриваемых показателей. Показатель антирадикальной активности оставался

сниженным в 2,4–3,3 раза вплоть до конца эксперимента в течение суток, а для железо-восстанавливающей способности было характерно увеличение значения до контрольного уровня спустя сутки после снятия зажима с аналога гепатодуоденальной связки и реваскуляризации печени.

Каталазная активность изменялась другим образом, что возможно связано с определением этого показателя в эритроцитарной взвеси, более устойчивой к системным изменениям, чем плазма крови. Для активности этого фермента, обеспечивающего разрушение перекиси водорода, были характерны сниженные значения с периодическим небольшим увеличением до контрольного уровня. Наиболее низкие значения активности каталазы наблюдались через 2 часа и сутки после восстановления кровотока в печени – сниженные на 42 % и 35 % соответственно (таблица 3.1).

Оценка изменений тиолового метаболизма включала определение уровня SH-групп в плазме крови, концентрации глутатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитарной взвеси (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Изменение показателей метаболизма тиолсодержащих веществ в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q₁/Q₃))

Длительность реперфузии	Показатели		
	SH-группы, е.о.п./белок*100	Глутатион, мкмоль/мл	ГПО, мкмоль/л*мин
	плазма крови	эритроциты	
контроль	0,32 (0,29/0,35)	2,46 (2,42/2,51)	320 (305/337)
5 мин	0,29 (0,26/0,29)*	2,59 (2,50/2,75)*	439 (422/451)*
15 мин	0,21 (0,20/0,22)*	1,80 (1,42/1,85)*	121 (107/129)*
30 мин	0,27 (0,26/0,30)*	2,89 (2,64/3,09)*	190 (169/202)*
60 мин	0,30 (0,28/0,35)	2,42 (2,30/2,60)*	189 (178/196)
120 мин	0,23 (0,21/0,26)*	1,89 (1,77/2,08)*	182 (174/196)
3 ч	0,28 (0,24/0,29)	2,07 (1,87/2,11)	223 (213/230)*
8 ч	0,26 (0,20/0,28)	1,90 (1,82/2,01)	183 (171/305)
сутки	0,30 (0,28/0,32)	2,52 (2,38/2,67)*	178 (169/194)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения.

Содержание тиоловых групп в плазме крови в целом имело тенденцию к снижению, кроме 60-минутного и суточного срока реперфузии. В остальное время было зафиксировано сниженное на 13–34 % значение анализируемого маркера с минимумами через 15 и 120 минут после начала восстановления кровотока в предварительно ишемизированной ткани печени. Концентрация глутатиона в эритроцитарной взвеси также имела тенденцию к снижению на 16–27 %, которая кратковременно наблюдалась через 15 минут и на временном отрезке от 2 до 8 часов реперфузионной фазы. В период остальных наблюдений, в том числе спустя сутки после восстановления кровотока, содержание восстановленной формы трипептида поддерживалось в пределах контрольного уровня, характерного для псевдооперированных крыс. Активность глутатионпероксидазы кратковременно увеличивалась на 37 %, что регистрировалось на 5 минуте реперфузии, с последующим снижением до конца эксперимента. Наиболее низкие значения активности анализируемого фермента были определены на 15 минуте реперфузии, когда значение показателя было в 2,6 раза ниже контроля. Начиная с 30 минуты регистрировались значения глутатионпероксидазной активности, сниженные на 31–44 % относительно группы псевдооперированных животных.

Оценка содержания продуктов перекисного окисления липидов – ТБК-реактивных продуктов показала более однозначные результаты в сравнении с вышеописанными маркерами состояния антиоксидантной системы. Уже к 15 и 30 минутам реперфузии регистрировалось увеличение тиобарбитурового числа эритроцитарной взвеси крови крыс в 1,8–2,1 раза относительно контрольной группы псевдооперированных животных (рисунок 3.6). На временном отрезке 60–120 минут были определены максимальные значения содержания ТБК-реактивных продуктов, увеличенные в 2,3–2,8 раза относительно контрольных цифр. В последующем с увеличением длительности реперфузии отмечалась тенденция к снижению тиобарбитурового числа, но с сохранением увеличенных относительно контроля в 1,7–2,0 раза значений до конца эксперимента.

С учетом того, что ведущим патобиохимическим механизмом повреждения печени при ишемии-реперфузии является окислительный стресс можно было бы

ожидать наличия корреляционных взаимосвязей между вышеописанными маркерами цитолиза гепатоцитов и состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса.

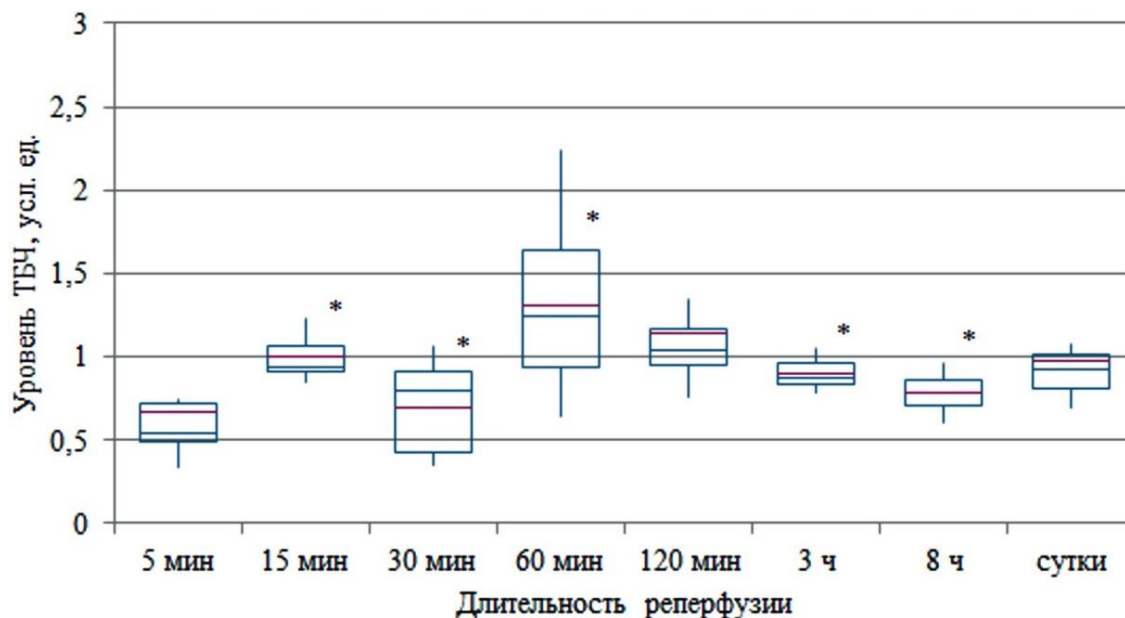


Рисунок 3.6 – Изменение содержания продуктов перекисного окисления липидов в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

В таблице 3.3 представлены данные, полученные при анализе коэффициентов корреляции между показателями подгрупп животных с 5 минуты до суток реперфузии, объединенных в одну большую группу. В данном случае статистически значимая корреляция между лабораторными показателями выявлена в половине случаев, основные из которых включены в таблицу. Коэффициент корреляции составлял в большинстве наблюдений 0,2-0,5, что при более детальном анализе оказалось связанным с влиянием значений показателей, определенных в первые 2 часа после восстановления кровотока. Широкая амплитуда изменений показателей и разница в скорости формирования пиков маркеров цитолиза гепатоцитов обуславливала практически полное отсутствие статистически значимой корреляции между показателями в этом временном промежутке.

Таблица 3.3 – Корреляция между лабораторными показателями крови при ишемически-реперфузионном повреждении печени крыс

Показатели	R Пирсона	p
АЛТ vs. Лактат	–0,2142	0,0161
АЛТ vs. ТБЧ	0,1643	0,0141
АЛТ vs. FRAP	–0,4634	0,0002
АЛТ vs. Глутатион	–0,3023	0,0150
АЛТ vs. ABTS	–0,3641	0,0257
Лактат vs. ТБЧ	–0,2234	0,0364
Лактат vs. FRAP	0,5214	0,0012
Лактат vs. Глутатион	0,3440	0,0209
Лактат vs. ABTS	0,6329	< 0,001
ТБЧ vs. FRAP	–0,3986	0,0040
ФРАП vs. Глутатион	0,2722	0,0080
ФРАП vs. ABTS, %	0,5637	< 0,001
Глутатион vs. ABTS	0,5187	0,0011
Глутатион vs. SH-сумма	0,5360	0,0003
ГПО vs. KAT	0,2587	0,0364

Анализ данных, полученных при интерпретации результатов 3-х и 8-часовой реперфузии позволил сделать ряд дополнительных наблюдений (таблица 3.4). В этих случаях уже наблюдались более высокие уровни коэффициентов корреляции, составляющие в большинстве случаев 0,6-0,8, что свидетельствует о наличии сильного взаимодействия между показателями.

С увеличением длительности реперфузии анализ данных позволил получить лучшие результаты оценки корреляции маркеров, что вероятно связано со снижением влияния выброса метаболитов, в том числе нормальных компонентов системы антиоксидантной защиты, из разрушенных клеток печени. Наиболее высокие статистически значимые корреляции были выявлены между активностью АЛТ и уровнем тиобарбитурового числа ($R = 0,9372$ при 8 часовой реперфузии, $R = 0,8877$ при 3 часовой реперфузии), АЛТ и железо-восстанавливающей способностью, ТБК-реактивными продуктами и железо-восстанавливающей способностью, SH-группами плазмы крови и железо-восстанавливающей способностью, концентрацией глутатиона и активностью глутатионпероксидазы.

Таблица 3.4 – Корреляция между лабораторными показателями крови после 20-минутной ишемии и 3-/8-часовой реперфузии печени крыс

Показатели	3 часа реперфузии		8 часов реперфузии	
	R Пирсона	p	R Пирсона	p
АЛТ vs. ТБЧ	0,8877	0,0143	0,9372	0,0030
АЛТ vs. FRAP	–0,9497	0,0500	–0,8393	0,0243
АЛТ vs. Глутатион	–0,8878	0,1416	–0,8980	0,0065
АСТ vs. Глутатион	–0,8970	0,1416	–0,7868	0,0478
АСТ vs. ГПО	–0,8148	0,1416	–0,5427	0,0260
АСТ vs. КАТ	–0,8047	0,1416	–0,5009	0,0478
ЛДГ vs. Глутатион	–0,8651	0,3272	–0,8567	0,0260
ЛДГ vs. ГПО	–0,6766	0,3272	–0,7786	0,0133
ТБЧ vs. FRAP	–0,8895	0,0500	–0,8790	0,0243
ТБЧ vs. Глутатион	–0,8008	0,1416	–0,8729	0,0260
ФРАП vs. ABTS	0,9869	0,0415	0,8283	0,0401
ФРАП vs. SH-сумма	0,9068	0,0143	0,9187	0,0388
Глутатион vs. ГПО	0,9257	0,0143	0,7227	0,0260
Глутатион vs. КАТ	0,6826	0,1416	0,7591	0,0133
ГПО vs. КАТ	0,7888	0,1416	0,6266	0,0065

3.2 Оценка динамики развития нарушений окислительного гомеостаза при ишемически-реперфузионном повреждении печени

В дополнение к представленным выше данным была изучена динамика изменения показателей окислительного гомеостаза с акцентом на ишемический период и первые 20 минут реперфузии. Для этого был разработан дизайн исследования с поэтапным 3–4-кратным забором крови и печени у лабораторных животных. Дизайн подробно представлен в разделе 2.1.4.2. «Исследование динамики развития метаболических нарушений» главы «Материалы и методы».

Оценка лабораторных показателей антиоксидантной системы крови включала определение активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, концентрации глутатиона в эритроцитарной взвеси в течение 15 минут ишемии и 20 минут реперфузии.

Оценка изменений активности супероксиддисмутазы в эритроцитарной взвеси показала тенденцию к постепенному увеличению в ишемической фазе со снижением в период реперфузии (рисунок 3.7). К 10 и 15 минутам ишемии ферментативная активность увеличивалась настолько, что составляла 157 % и 172 % от контрольного уровня аналогичного показателя. На этапе наблюдения, соответствующему 5 минутам ишемии уровень супероксиддисмутазной активности находился в пределах контрольного уровня. В процессе реперфузии активность изученного фермента снижалась относительно ишемии, но оставался выше уровня контрольных цифр на 13–46 %.

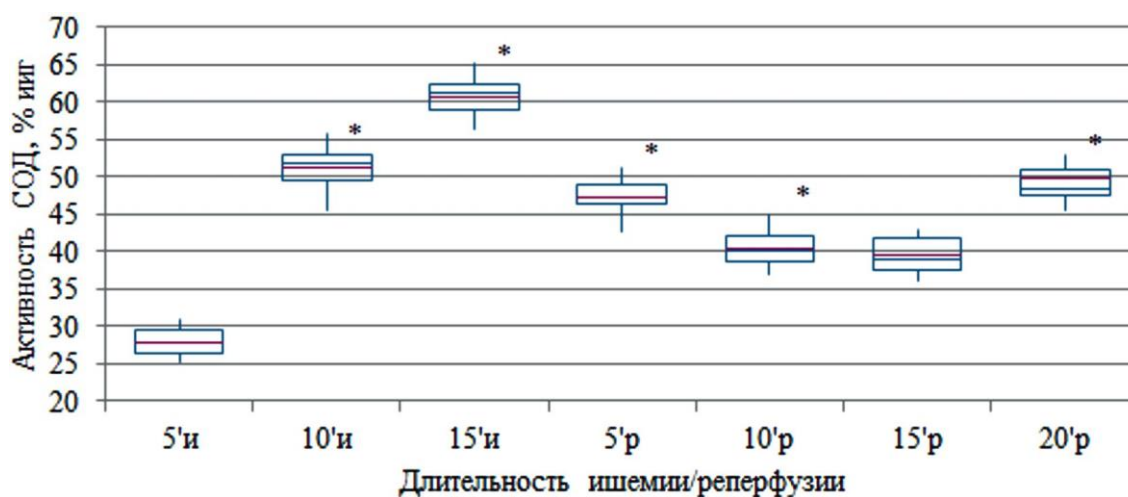


Рисунок 3.7 – Динамика активности супероксиддисмутазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Для активности каталазы была характерна похожая тенденция – на 5 минуте ишемии было определено значение показателя в пределах контроля, а с 10 минуты регистрировали увеличенные значения вплоть до окончания эксперимента (рисунок 3.8). На этапах наблюдения 10 и 15 минут ишемической фазы активность каталазы превышала контрольные значения соответствующего показателя в 1,7–2,0 раза. Переход к реперфузии сопровождался увеличенными значениями каталазной активности эритроцитов в 2,1–2,2 раза в течение первых 10 минут после восстановления кровотока в печени. Спустя 15–20 минут после снятия зажима с аналога печеночно-двенадцатиперстной связки наблюдались увеличенные в 2,2–2,4

раза значения активности фермента 2 линии антиоксидантной защиты, обеспечивающего нейтрализацию продукта двухэлектронного восстановления кислорода – пероксида водорода. Активность каталазы в контрольных наблюдениях в среднем соответствовали значениям 5,08–6,02 моль/л·мин.

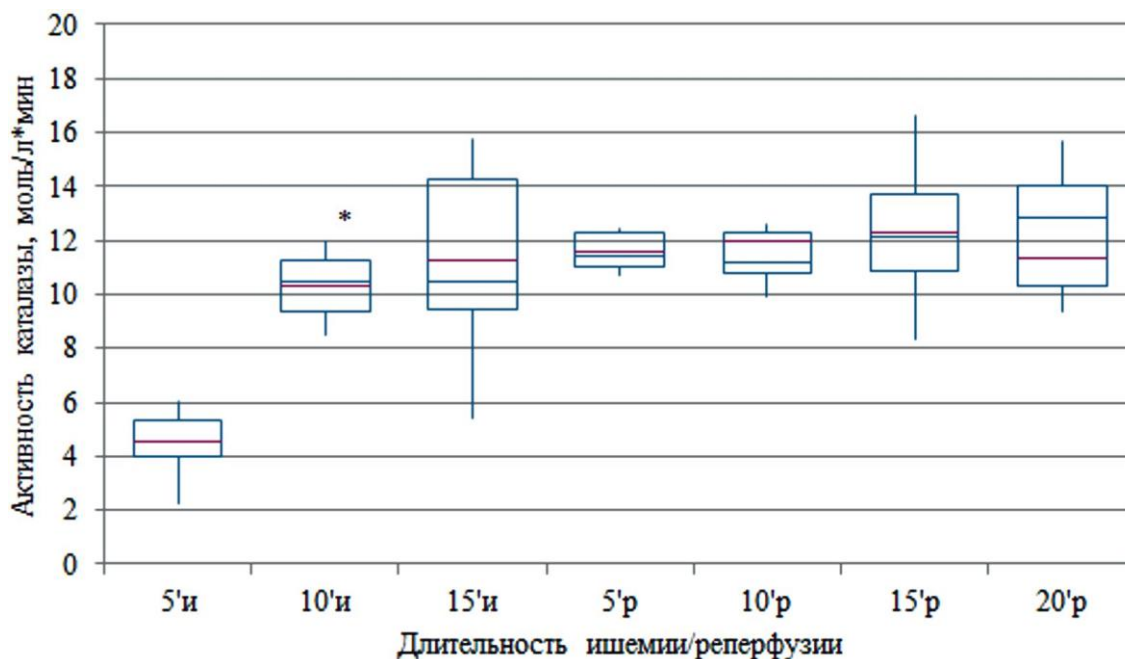


Рисунок 3.8 – Динамика активности каталазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Активность глутатионпероксидазы в ишемическую и реперфузионную фазы изменялась волнообразно (рисунок 3.9). Начало ишемического периода характеризовалось значениями активности анализируемого фермента в пределах контрольных цифр в течение 5 минут после пережатия аналога гепатодуоденальной связки. 10 минутный период сосудистой изоляции печени характеризовался ростом глутатион-зависимой пероксидазной активности на 19 %, рост активности фермента через 15 минут после начала эксперимента достигал 45 % относительно соответствующих контрольных групп. Начало реперфузионного периода сопровождалось по-прежнему высокими значениями активности фермента, превышающими контрольные цифры на 84 %. Однако при прогрессировании реоксигенации после восстановления кровотока наблюдалось некоторое снижение активности глутатионпероксидазы, которая составляла 123 % от контрольного

уровня на 10 минуте реперфузии с последующим постепенным восстановлением роста показателя. Так, на 15 минуте активность возрасла до значений, превышающих контрольные цифры на 229 %, а на 20 минуте – в 2,5 раза, достигая максимального уровня.

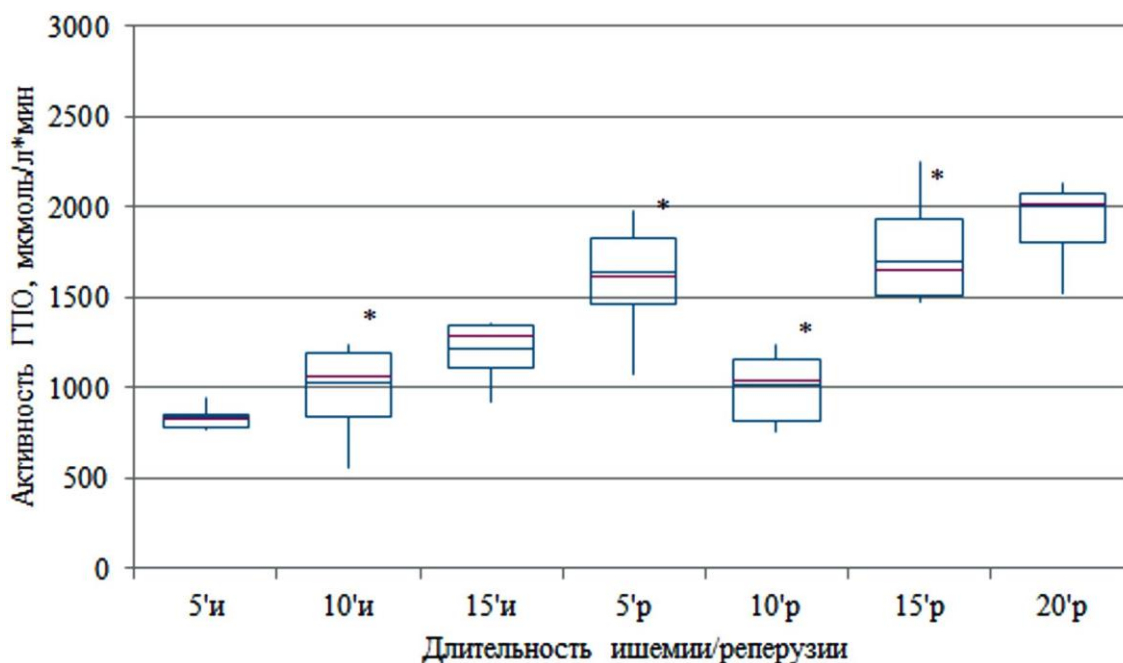


Рисунок 3.9 – Динамика активности глутатионпероксидазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Активность глутатионредуктазы в эритроцитарной взвеси изменялась при ишемии-реперфузии печени аналогично глутатионпероксидазной активности. Также в течение ишемической фазы наблюдался рост активности анализируемого фермента на 150 %, 120 %, 210 % с достижением максимальных значений на 5 минуте реперфузии (рисунок 3.10). Определение показателя на 5 минуте после восстановления кровотока в сосудах печеночно-двенадцатиперстной связки показало увеличенные в 3,1 раза значения относительно соответствующей контрольной группы. Дальнейшее течение реперфузионной фазы характеризовалось также высокими значениями глутатионредуктазной активности с кратковременным минимумом на 10 минуте восстановления кровотока. Тем не менее как на любом этапе наблюдений в ишемическую фазу, так и в реперфузионную наблюдались высокие значения активности обоих изученных ферментов метаболизма глутатиона.

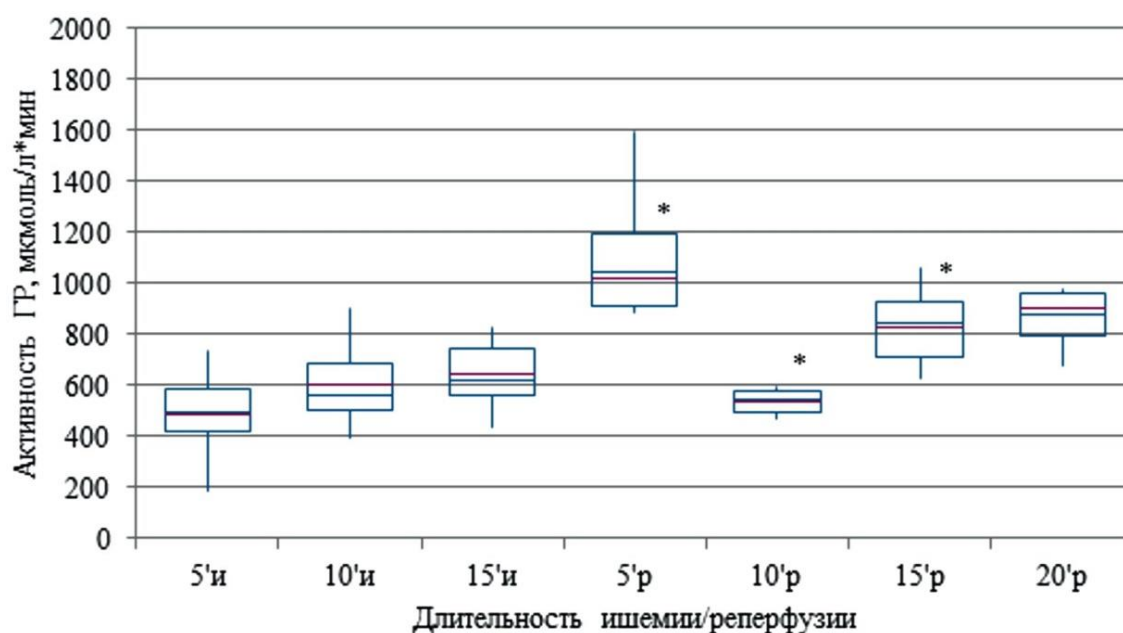


Рисунок 3.10 – Динамика активности глутатионредуктазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Завершает анализ динамики изменений показателей антиоксидантной системы крови при ишемии-реперфузии печени крыс определение концентрации глутатиона (рисунок 3.11). Содержание трипептида гамма-глутамил-цистеинил-глицина в эритроцитарной взвеси было снижено относительно контроля на 13–16 % на протяжении всех 15 минут сосудистой изоляции ткани печени. Однако после восстановления кровотока уровень рассматриваемого метаболита быстро возвращался к исходным относительно нормальным значениям, соответствующим контрольных цифрам.

Определение показателей состояния системы антиоксидантной защиты в печени выполняли с использованием гомогената ткани печени, полученного в условиях другого эксперимента, состоящего из 20-минутного ишемического повреждения печени и следующего за ним 20-минутного реперфузионного периода. В этих условиях также проводили оценку изменений активности ферментов антиоксидантной защиты, концентрации глутатиона, общей антиоксидантной активности и активности пируватдегидрогеназы.

Определение активности супероксиддисмутазы в гомогенате ткани печени крыс показало наличие тенденции к снижению данного показателя относительно

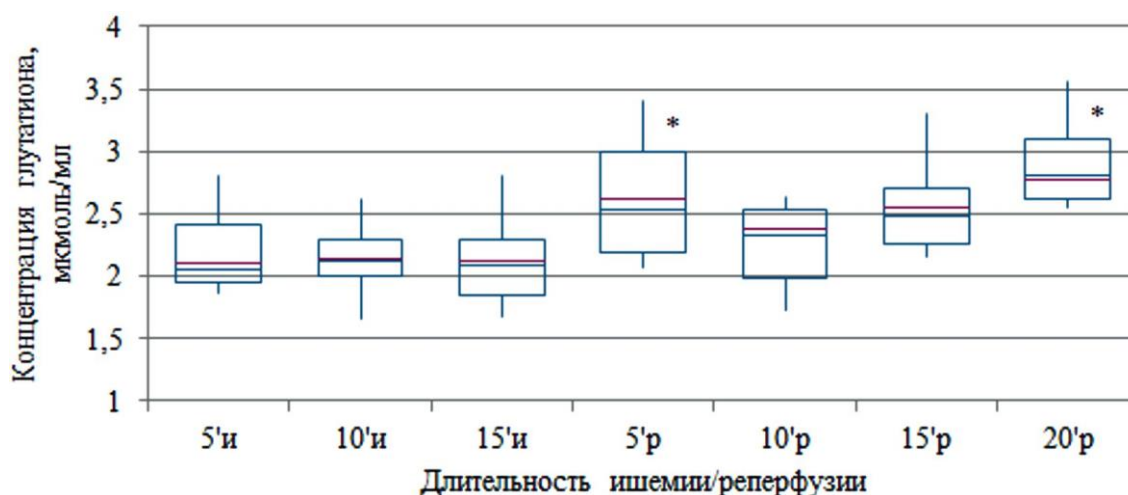


Рисунок 3.11 – Динамика концентрации глутатиона в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

контроля в ишемической фазе (таблица 3.5). Уже на 5-й минуте ишемического периода активность анализируемого фермента была снижена на 14 %. В дальнейшем до 20 минуты сосудистой изоляции печени были зарегистрированы более низкие значения супероксиддисмутазной активности – на 22–28 % относительно соответствующих контрольных групп. Переход к стадии реперфузии характеризовался кратковременным ростом активности рассматриваемого фермента, который определялся в течение 15 минут после снятия зажима с гепатодуоденальной связки. В этом периоде активность фермента в ткани печени крыс опытных групп соответствовала контрольным значениям. Только на 20 минуте реперфузии вновь отмечалось сниженное значение активности супероксиддисмутазы на 26 %. Было бы интересно наблюдать за изменениями системы антиоксидантной защиты в течение более длительного периода, чтобы определить насколько они стабильны, однако эксперимент был окончен на 20 минутном сроке васкулярной эксклюзии.

Каталазная активность гомогената печени в течение ишемической фазы экспериментального патологического процесса сохранялась в пределах контрольного уровня, кроме кратковременного роста параметра на 34 % после 15 минутной сосудистой изоляции (таблица 3.5). После перехода к реперфузионной фазе ишемического синдрома наблюдалось значительное снижение анализируемого маркера состояния антиоксидантной системы органа. На 5 минуте после

восстановления кровотока через сосудистые элементы печеночно-двенадцатиперстной связки активность каталазы была на 39 % ниже значений показателя соответствующей контрольной группы. К 15 минуте реперфузии активность фермента 2 линии антиоксидантной защиты была снижена уже на 56 %, а после 20 минутного периода реоксигенации сохранялось сниженное значение анализируемого показателя на 36 %.

Таблица 3.5 – Динамика активности ферментов антиоксидантной системы печени крыс при ишемии-реперфузии (Me (Q₁/Q₃))

Этап эксперимента	подгруппа	Показатели	
		СОД, % инг	КАТ, моль/г*мин
5 мин	ишемия	10,7 (10,0/11,2)	2,54 (2,03/2,95)
	контроль	12,5 (11,6/12,8)	2,91 (2,71/3,28)
10 мин	ишемия	9,0 (8,7/9,4)*	2,05 (1,95/2,26)
	контроль	11,6 (11,3/12,8)	2,17 (2,03/2,45)
15 мин	ишемия	9,7 (8,8/10,6)	2,51 (2,16/2,90)*
	контроль	12,0 (11,3/12,7)	1,88 (1,71/2,00)
20 мин	ишемия	9,2 (8,7/9,8)	1,71 (1,60/1,89)*
	контроль	11,8 (10,9/12,5)	1,88 (1,76/2,09)
5 мин	реперфузия	12,4 (11,7/13,1)*	1,41 (1,25/1,59)*
	контроль	11,6 (11,0/12,2)	2,31 (2,29/3,38)
10 мин	реперфузия	11,8 (11,1/13,1)	1,67 (1,55/1,97)*
	контроль	11,8 (11,4/12,3)	2,22 (1,95/2,34)
15 мин	реперфузия	12,2 (11,9/12,7)	0,8 (0,7/1,17)*
	контроль	12,1 (11,6/13,1)	1,83 (1,79/1,92)
20 мин	реперфузия	8,5 (7,9/9,1)*	1,23 (1,01/1,49)
	контроль	11,5 (10,9/12,2)	1,92 (1,80/2,02)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения.

Аналогичным образом была проведена оценка изменений активности глутатион-зависимых ферментов системы антиоксидантной защиты – глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (таблица 3.6). В этом случае были выявлены разнонаправленные и более амплитудные изменения. Так активность глутатионпероксидазы в первые 10 минут ишемической фазы была снижена на

25–30 %, однако увеличивалась к 15 минуте моделирования патологического процесса, достигая значений, составляющих 233 % от контрольного уровня. При этом окончание наблюдения за изменениями в ишемической фазе завершалось выявлением нормального уровня ферментативной активности, соответствующего значению показателя в контрольной группе животных. Переход к реперфузионной стадии характеризовался продолжением тенденции к росту активности глутатионпероксидазы. Увеличение значения активности анализируемого фермента после восстановления кровотока составляло 2,2–3,2 раза относительно соответствующих контрольных групп.

Таблица 3.6 – Динамика активности глутатион-зависимых ферментов антиоксидантной системы печени крыс при ишемии-реперфузии (Me (Q₁/Q₃))

Этап эксперимента	подгруппа	Показатели	
		ГПО, ммоль/г*мин	ГР, ммоль/г*мин
5 мин	ишемия	0,47 (0,44/0,57)	0,49 (0,44/0,54)
	контроль	0,67 (0,66/0,70)	0,87 (0,85/0,91)
10 мин	ишемия	0,49 (0,44/0,50)	0,33 (0,26/0,39)*
	контроль	0,65 (0,58/0,66)	0,72 (0,68/0,78)
15 мин	ишемия	1,63 (1,31/1,80)*	0,48 (0,47/0,51)*
	контроль	0,70 (0,63/0,94)	0,63 (0,61/0,76)
20 мин	ишемия	0,79 (0,70/0,88)*	0,39 (0,37/0,42)*
	контроль	0,76 (0,68/0,83)	0,61 (0,59/0,64)
5 мин	реперфузия	2,33 (2,09/2,41)*	0,57 (0,53/0,58)*
	контроль	0,73 (0,66/0,86)	0,71 (0,64/0,83)
10 мин	реперфузия	1,74 (1,59/1,96)*	0,44 (0,36/0,48)*
	контроль	0,73 (0,66/0,87)	0,78 (0,71/0,85)
15 мин	реперфузия	2,64 (2,34/2,92)*	0,67 (0,64/0,73)*
	контроль	0,70 (0,61/0,83)	0,65 (0,63/0,73)
20 мин	реперфузия	1,70 (1,49/1,91)*	0,59 (0,50/0,64)
	контроль	0,76 (0,72/0,80)	0,62 (0,61/0,65)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения.

Для активности глутатионредуктазы было характерно поддержание низкого уровня в течение всего ишемического периода и первых 10 минут реперфузии

(таблица 3.6). Снижение активности данного фермента в ишемическом периоде достигало 54 % от контрольного уровня на 10 минут выключения кровоснабжения печени. В начале реперфузионной фазы были определены несколько более высокие значения активности фермента, сниженные относительно контроля на 20–44 %. Увеличение длительности реперфузии до 15–20 минут позволяло полностью восстановиться глутатионредуктазной активности, достигнув контрольных значений соответствующих групп лабораторных животных.

Динамика изменения концентрации глутатиона в гомогенате печени хорошо просматривается на диаграмме (рисунок 3.12). В данном случае отмечается существенно более низкая концентрация тиолсодержащего регулятора редокс гомеостаза в фазе выключения печени из системного кровотока. В числовом выражении снижение анализируемого маркера в первые 15 минут ишемии достигало 60–72 % относительно соответствующих контрольных групп, к 20 минуте ишемии концентрация глутатиона была снижена на 50 %. Восстановление кровотока сопровождалось частичным восстановлением концентрации глутатиона в ткани печени. Так в первые 15 минут реперфузии уровень анализируемого трипептида был ниже контроля на 21–40 %, а к 20 минуте дополнительно увеличивался, оставаясь ниже контрольного уровня только на 17 %.

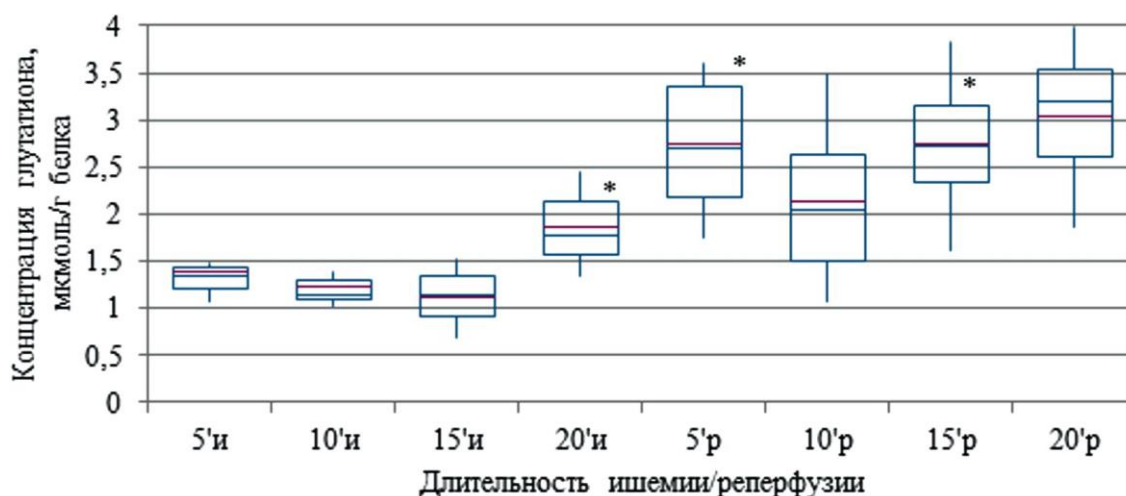


Рисунок 3.12 – Динамика концентрации глутатиона в гомогенате печени крыс при ишемии-реперфузии печени крыс (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Общая антиоксидантная активность гомогената печени крыс, определенная железо-восстанавливающим способом, поддерживалась на протяжении всего эксперимента, включающего 20 минут ишемии и 20 минут реперфузии, на практически одинаковом уровне. Медианные значения данного показателя у крыс опытных групп составляли 0,03–0,06 ммоль аскорбиновой кислоты/г белка. При этом данные значения были ниже уровня показателей соответствующих контрольных групп лабораторных животных на 41–69 % без каких-то межгрупповых особенностей динамики показателей (рисунок 3.13).

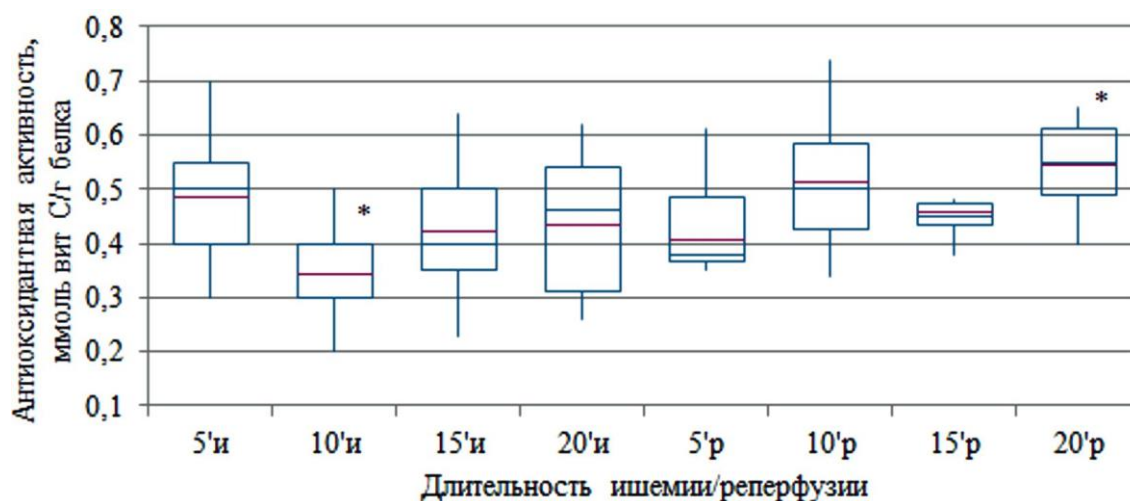


Рисунок 3.13 – Динамика железо-восстанавливающей способности в гомогенате печени крыс при ишемии-реперфузии (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Определение активности пируватдегидрогеназы показало наличие интересных особенностей, заключающихся в подержании относительно высокой активности фермента в ишемической фазе и снижении при переходе к реперфузии (рисунок 3.14). Так на протяжении 20 минут сосудистой изоляции печени уровень пируватдегидрогеназной активности был на 16–30 % ниже значений, характерных для печени ложнооперированных животных (0,44 (0,41/0,49) ед.). Определение аналогичного показателя на временных отрезках 5, 10 и 20 минут после восстановления кровоснабжения органа показало сниженные значения уже на 34–44 %.

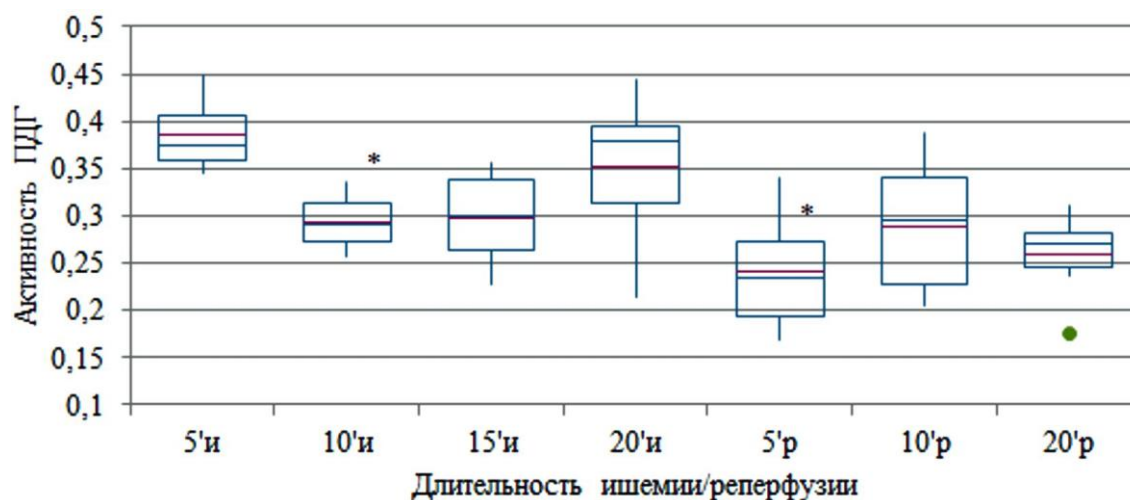


Рисунок 3.14 – Динамика активности пируватдегидрогеназы в гомогенате печени крыс при ишемии-реперфузии (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

3.3 Сравнение экспериментальных моделей частичной и полной сосудистой изоляции печени и почек

Сравнение экспериментальных моделей включало выполнение полной и частичной сосудистой эксклюзии печени по схеме, описанной в разделе 2.1.4.3 главы «Материалы и методы».

В результате проведенных исследований было установлено, что на фоне всех 3-х экспериментальных моделей активность ферментов маркеров цитолитического синдрома увеличивается в несколько раз (таблица 3.7). При этом 20 минутная полная сосудистая изоляция характеризовалась более высокими значениями активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в сравнении с 20 минутной частичной сосудистой эксклюзией. Активность АЛТ при условии 20 минутной полной сосудистой эксклюзии была на 63 %, АСТ – на 13 %, ЛДГ – в 3,1 раза выше показателя животных с 20 минутной частичной ишемией органа. Пролонгирование сосудистой изоляции до 40 минут на модели частичной сосудистой эксклюзии характеризовалось еще более значительным ростом

активности изученных ферментов в плазме крови. В сравнении с 20 минутной частичной ишемией печени после 40 минутной парциальной сосудистой изоляции активность АЛТ была увеличена в 3,1 раза, АСТ – в 2,9 раза, ЛДГ – в 3,3 раза. Таким образом, значения анализируемых маркеров существенно превысили также значения аналогичных показателей в группе животных с полной ишемией органа.

Таблица 3.7 – Изменения маркеров цитолиза гепатоцитов на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени (Me (Q₁/Q₃))

Группы	Показатели		
	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЛДГ, ед/л
Контроль	34,3 (26,0/42,3)	23,4 (18,8/25,4)	152,3 (103,4/165,7)
Полная 20И/180Р	391,6(296,4/557,9)*	332,6(246,0/401,7)*	1430,0(1162,0/1626,0)*
Частичная 20И/180Р	240,5(225,3/280,4)*	295,0(262,0/339,3)*	455,5(320,5/506,5)*
Частичная 40И/180Р	739,3(562,4/1258,3)*	841,5(532,8/1589,8)*	1521,0(1011,0/3367,8)*

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы.

Оценка прооксидантно-антиоксидантного баланса включала сравнение показателей общей антиоксидантной активности и накопления в крови ТБК-реактивных продуктов (таблица 3.8). Было определено снижение железо-восстанавливающей способности и антирадикальной активности плазмы крови относительно контроля в равной степени не зависимо от применяемой модели васкулярной эксклюзии печени. Анализ уровня ТБЧ показал наличие закономерности роста содержания продуктов окислительных модификаций биомолекул в зависимости от продолжительности ишемии и в меньшей степени от объема пораженной паренхимы. Так у крыс, которые подвергались 20 минутной частичной ишемии печени уровень ТБЧ был увеличен в 1,6 раза относительно контроля, в группе животных после 20 минутной полной ишемии – в 1,9 раза, а после 40 минутной частичной сосудистой изоляции печени – в 4,9 раза.

Определение активности ферментов антиоксидантной защиты показало снижение каталазной активности в равной степени после 20 минутной ишемии по любой из экспериментальных методик (таблица 3.9). Однако наиболее низкие

значения активности каталазы, сниженные на 46 % относительно контроля, наблюдались после 40 минутной сосудистой изоляции. Активность глутатионпероксидазы изменялась несколько другим образом. На фоне полной ишемии органа активность данного фермента была снижена на 30 %. После 20 минутной парциальной ишемии активность была даже несколько увеличена и превышала контрольные цифры на 12 %. Частичная ишемия в течение 40 минут после 3 часовой реперфузии характеризовалась наиболее низкими значениями активности глутатионпероксидазы, сниженным в 3,4 раза относительно аналогичного показателя группы псевдооперированных животных.

Таблица 3.8 – Изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса крови на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени (Me (Q₁/Q₃))

Группы	Показатели		
	FRAP, мМ вит С	ABTS, мМ вит С	ТБЧ, усл. ед.
Контроль	0,41 (0,39/0,44)	0,50 (0,49/0,52)	0,45 (0,37/0,49)
Полная 20И/180Р	0,32 (0,29/0,37)*	0,15 (0,06/0,27)*	0,86 (0,84/0,91)*
Частичная 20И/180Р	0,23 (0,18/0,33)*	0,19 (0,18/0,27)*	0,73 (0,69/0,78)*
Частичная 40И/180Р	0,32 (0,28/0,36)*	0,15 (0,13/0,19)*	2,22 (1,85/2,39)*

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы. Обозначения: FRAP – антиоксидантная активность (железо-восстановливающая способность), ABTS – антиоксидантная (антирадикальная) активность (ABTS-метод), ТБЧ – тиобарбитуровое число.

Таблица 3.9 – Изменения активности ферментов антиоксидантной системы на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени (Me (Q₁/Q₃))

Группы	Показатели	
	КАТ, моль/л*мин	ГПО, мколь/л*мин
Контроль	28,5 (27,6/29,4)	320 (305/337)
Полная 20И/180Р	23,6 (14,1/24,1)*	223,1 (213,7/230,6)*
Частичная 20И/180Р	18,9 (18,3/25,1)*	357 (341/485)*
Частичная 40И/180Р	15,4 (11,2/17,4)*	95 (84/136)*

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы.

Оценка неферментного тиолового звена антиоксидантной системы показала отсутствие существенных отличий между показателями групп животных, которые подвергались 20 минутной тотальной или парциальной ишемии печени (таблица 3.10). Содержание общих SH-групп в плазме крови этих двух групп крыс было снижено на 16–19 % относительно контроля, а концентрация глутатиона эритроцитарной взвеси была на 9–16 % ниже значения аналогичного показателя псевдооперированных животных. После 40 минутной частичной ишемии печени содержание тиоловых групп белков плазмы крови не отличалось от значений аналогичных маркеров других рассматриваемых групп животных, однако для концентрации глутатиона в эритроцитах было характерно наличие статистически значимых различий. Содержание SH-содержащего трипептида в биожидкости животных данной группы было на 38 % ниже контрольного параметра.

Таблица 3.10 – Изменения состояния тиолового звена антиоксидантной системы на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени (Me (Q₁/Q₃))

Группы	Показатели	
	SH-группы, е.о.п./белок*100	Глутатион, мкмоль/мл
Контроль	0,32 (0,30/0,35)	2,46 (2,42/2,51)
Полная 20И/180Р	0,27 (0,24/0,29)*	2,07 (1,87/2,11)*
Частичная 20И/180Р	0,26 (0,24/0,29)*	2,25 (1,97/2,38)*
Частичная 40И/180Р	0,28 (0,26/0,30)	1,53 (1,41/1,55)*

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы. Обозначения: КАТ – активность каталазы, ГПО – активность глутатионпероксидазы.

Для проведения сравнительного анализа особенностей ишемически-реперфузионных повреждений печени были проведены исследования динамики патобиохимических изменений в крови животных на фоне односторонней сосудистой изоляции почки по схеме, описанной в разделе 2.1.4.4 главы «Материалы и методы». В результате проведенных исследований были установлены некоторые особенности изменений функционального состояния антиоксидантной системы крови на фоне ишемии-реперфузии почки (таблица

3.11). Так наблюдалось увеличение активности супероксиддисмутазы к 20 минуте ишемии относительно контроля на 46 %, в то время как на протяжении первых 15 минут активность фермента оставалась в пределах контрольных значений. В самом начале реперфузионной стадии наблюдалось небольшое кратковременное снижение активности супероксиддисмутазы, достигающее 28 % ниже контрольного уровня, с последующим восстановлением сравнительно высоких значений активности в течение 10–20 минут после восстановления кровотока в почечной артерии. Активность каталазы в эритроцитарной взвеси на протяжении всего ишемического периода и большей части реперфузионного поддерживалась в пределах уровня контрольных значений. Только на 5-й минуте после восстановления кровотока в почке наблюдалось увеличение активности рассматриваемого фермента, достигающее 21 % от медианного значения аналогичного параметра животных контрольной группы.

Таблица 3.11 – Динамика изменений активности ферментов антиоксидантной системы эритроцитов на фоне односторонней ишемии почки (Me (Q₁/Q₃))

Группы	Показатели			
	СОД, % инг	КАТ, моль/л*мин	ГПО, мколь/л*мин	ГР, ммоль/г*мин
Контроль	30,2 (27,8/33,8)	28,5 (27,5/29,4)	320 (305/337)	255 (244/271)
5'И	33,0 (31,2/35,5)	34,4 (27,3/42,9)*	328 (305/352)	263 (219/303)
10'И	31,8 (30,7/33,0)	28,8 (27,1/31,0)	375 (344/395)	198 (179/219)*
15'И	37,6 (33,7/41,6)*	33,5 (31,0/35,8)	369 (343/392)	352 (306/381)*
20'И	44,1 (40,3/48,3)*	30,6 (26,1/34,8)	338 (309/367)	241 (200/292)*
5'Р	21,6 (20,0/22,4)*	34,4 (28,5/43,1)	150 (113/173)*	173 (137/195)*
10'Р	44,2 (36,4/49,9)*	31,1 (26,7/37,7)	495 (441/539)*	284 (251/308)*
15'Р	35,3 (32,1/37,4)*	26,2 (22,3/30,6)	261 (249/276)*	247 (211/288)
20'Р	40,7 (40,0/42,4)*	30,0 (28,4/31,5)	345 (322/370)*	244 (225/262)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения. Обозначения: СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ГПО – глутатионпероксидаза, ГР – глутатионредуктаза.

Активность ферментов системы глутатиона крови при ишемии-реперфузии почки была более динамична (таблица 3.11). Ключевыми выявленными

тенденциями были стремление к увеличению активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, но наиболее низкие значения обоих ферментов в начале реперфузии. Так на 15 минуте ишемии активность данных ферментов превышала контрольные значения на 15 % и 38 % соответственно. Максимальные значения активности глутатионпероксидазы, достигающие 155 % от контрольного уровня, были определены на 10 минуте реперфузии. При переходе к реперфузионной фазе наблюдалось резкое снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. В этой временной точке активность анализируемых энзимов была минимальной и составляла 47 % и 68 % соответственно от контрольного уровня аналогичных показателей.

Концентрация глутатиона в эритроцитарной взвеси на протяжении всего эксперимента поддерживалась в пределах контрольного уровня соответствующего показателя (рисунок 3.15). Можно охарактеризовать тенденцию постепенного роста содержания анализируемого метаболита в биожидкости к 20 минуте ишемии или реперфузии с минимальными значениями соответственно в начале фаз ишемически-реперфузионного синдрома.

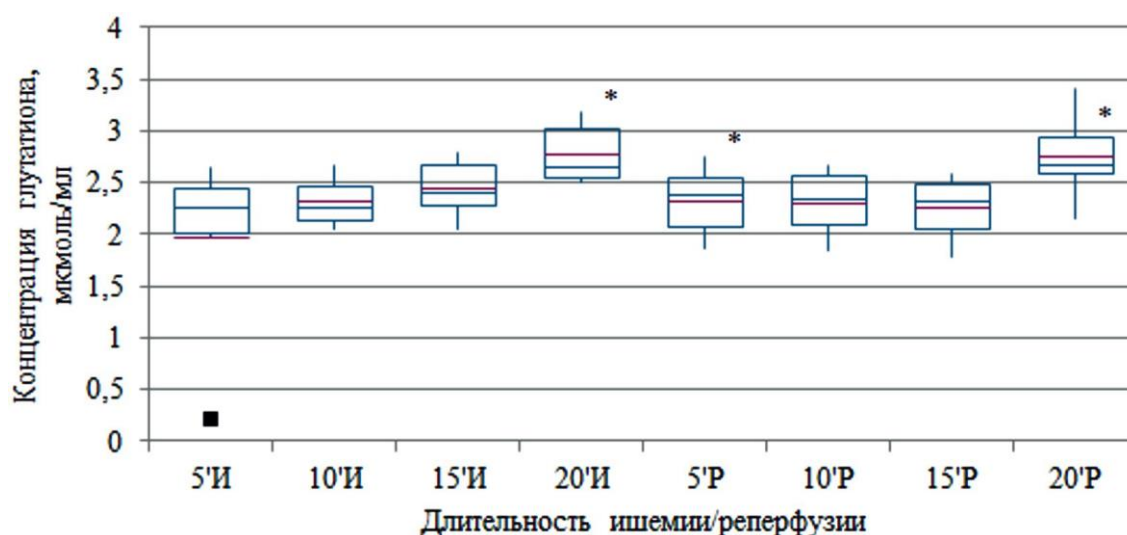


Рисунок 3.15 – Динамика изменений концентрации глутатиона в эритроцитарной взвеси на фоне односторонней ишемии почки (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

3.4 Особенности изменений окислительного гомеостаза в суспензии митохондрий и цитозольной фракции при ишемии-реперфузии печени

Сложность структурно-функциональной организации прооксидантно-антиоксидантной системы организма человека и животных обуславливает необходимость поиска патобиохимических изменений не только в крови и в целостном гомогенате органов, но и в отдельных его фракциях. Ключевым местом образования и утилизации АФК являются митохондрии, поэтому митохондриальная суспензия представляет первоочередный интерес для анализа нарушений окислительного гомеостаза. При выделении митохондриальной суспензии остается постмитохондриальная фракция, которую условно можно обозначить цитозольной. Фрагменты ядер, клеточных мембран и другие крупные структуры удаляются еще на начальном этапе фракционирования в ходе центрифугирования на малых скоростях. Таким образом, был проведен детальный анализ особенностей метаболизма при ИРП печени. Дизайн исследования описан в разделе 2.1.4.5 главы «Материалы и методы».

Определение общей антиоксидантной активности железо-восстанавливающим методом показало нестандартную тенденцию в сторону роста ее значения (таблица 3.12). В митохондриальной суспензии рост данного показателя составлял 15–30 % без характерных отличительных особенностей между значениями в ишемической и реперфузионной фазах. В цитозольной фракции наблюдалась аналогичная тенденция с ростом значения показателя на 33–38 %. Концентрация ключевого внутриклеточного регулятора редокс гомеостаза – глутатиона в митохондриях печени при ишемии и реперфузии статистически значимых изменений не претерпевала, однако в цитозоле данный показатель прогрессирующе снижался. На этапе сосудистой изоляции печени уровень цитозольного глутатиона был снижен на 28 % относительно контроля. Для реперфузионной фазы патологического процесса было характерно значение,

сниженное уже в 2,2 раза. Оценка уровня продуктов липопероксидации также показала более существенные изменения в постмитохондриальной фракции. Если в суспензии митохондрий регистрировалось увеличение содержания диеновых конъюгатов на 25 % в ишемическом периоде, то в цитозольной фракции гомогената печени в аналогичных условиях показатель был увеличен на 40 %. В стадии реперфузии концентрация диеновых конъюгатов в цитозоле печени крыс превышала контрольные значения аналогичного показателя в 2,2 раза. Таким образом, в целом для вышеописанных показателей были характерны более значительные изменения в цитозольной фракции, нарастающие при переходе от ишемии к реперфузии.

Таблица 3.12 – Показатели состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса в цитозоле и суспензии митохондрий печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения (Me (Q₁/Q₃))

Исследуемые показатели	Биожидкость	Исследуемые группы		
		1 (контроль)	2 (ишемия)	3 (реперфузия)
Общая АОА, мМ вит С / мг белка	мтх	2,0 (1,9/2,1)	2,3 (2,1/2,5)*	2,6 (2,3/2,7)*
	цит	2,4 (2,3/2,6)	3,3 (3,0/3,5)*	3,2 (3,0/3,4)*
GSH, нмоль/мг белка	мтх	10,1 (9,6/10,3)	9,6 (9,5/10,2)	9,5 (9,4/10,1)
	цит	8,0 (7,8/8,2)	5,8 (5,6/6,2)*	3,6 (3,4/4,0)*^
ДК, усл. ед.	мтх	0,08 (0,07/0,09)	0,10 (0,09/0,10)*	0,08 (0,07/0,09)
	цит	0,10 (0,09/0,11)	0,14 (0,13/0,15)*	0,22 (0,19/0,23)*^

Примечание: * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от соответствующего показателя 1-й группы; ^ – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от показателя 2-й группы. Длительность ишемии – 15 минут, реперфузии – 15 минут. Обозначения: АОА – антиоксидантная активность, GSH – глутатион, ДК – диеновые конъюгаты.

Более детальный анализ изменения содержания глутатиона в цитозольной фракции гомогената печени позволили выявить некоторые особенности в разных экспериментальных условиях. Так была определена прогрессирующая динамика снижения уровня трипептида в ишемической фазе – снижение на 30 % и 48 % при 15 и 25 минутной сосудистой изоляции органа (рисунок 3.16). При этом 10 минутный период ишемии еще характеризовался поддержанием высокого уровня глутатиона в цитозоле, соответствующего контрольному. После реперфузии

аналогичная неблагоприятная тенденция сохранялась. 10 минутный период ишемии, дополненный реперфузией в течение 10 или 60 минут уже сопровождался снижением концентрации анализируемого метаболита на 11 % и 25 % соответственно относительно контроля. В условии 15 минутной васкулярной эксклюзии печени отличия в длительности реперфузии 15 или 30 минут были не существенны. 25 минутная ишемия, предшествовавшая 30 минутному периоду восстановления кровотока, характеризовалась наиболее низкими концентрациями глутатиона в цитозольной фракции печени крыс, сниженными на 64 % относительно контроля.

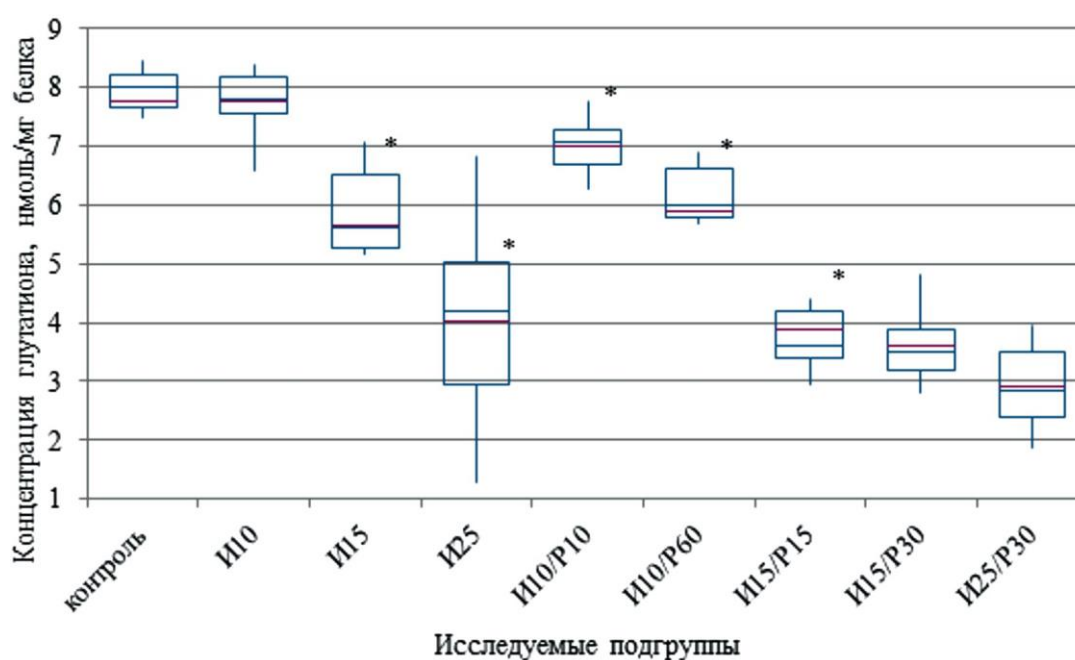


Рисунок 3.16 – Концентрация глутатиона в цитозольной фракции печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения; И – ишемия (длительность в минутах); Р – реперфузия (длительность в минутах)

Увеличение длительности ишемии до 25 минут без или с последующим 30 минутным реперфузионным периодом отражалось также на концентрации глутатиона в митохондриальной суспензии печени крыс, которая была в этих случаях снижена в 1,8–2,0 раза относительно контрольных значений соответствующего показателя. Тем не менее цитозольный глутатион был более чувствительным маркером окислительного стресса при ишемии-реперфузии печени лабораторных животных.

Анализ изменений показателей ферментного звена системы антиоксидантной защиты включал определение активности каталазы, ГПО и ГР (таблица 3.13).

Таблица 3.13 – Показатели состояния ферментов антиоксидантной системы в цитозоле и суспензии митохондрий печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения (Me (Q₁/Q₃))

Исследуемые показатели	Био-жидкость	Исследуемые группы		
		1 (контроль)	2 (ишемия)	3 (реперфузия)
КАТ, нмоль/(мин×мг белка)	МТХ	992,3 (945,1/1024,5)	726,1* (678,4/766,5)	919,6*^ (880,7/930,2)
	ЦИТ	217,8 (205,9/221,6)	213,0 (204,0/220,0)	309,8*^ (290,5/318,6)
ГПО, нмоль/(мин×мг белка)	МТХ	86,8 (82,4/89,5)	91,6 (86,3/94,5)	120,6*^ (112,8/126,2)
	ЦИТ	120,6 (113,6/127,0)	168,8* (155,2/178,4)	106,1^ (104,1/119,6)
ГР, нмоль/(мин×мг белка)	МТХ	96,7 (94,3/98,5)	103,6* (101,0/105,2)	155,4*^ (143,1/160,8)
	ЦИТ	120,9 (116,7/125,3)	130,1* (126,4/137,8)	125,6 (122,1/128,3)

Примечание: * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от соответствующего показателя 1-й группы; ^ – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от показателя 2-й группы. Длительность ишемии – 15 минут, реперфузии – 15 минут.

В этом случае были определены более динамичные изменений в обеих фракциях гомогената печени крыс. Так каталазная активность была снижена в митохондриальной фракции в ишемической фазе на 27 % относительно контроля, однако практически полностью восстанавливалась при переходе к реперфузии. В цитозоле после восстановления кровотока данный показатель был на 42 % выше контрольных цифр. При этом в целом в митохондриальной фракции активность рассматриваемого фермента была в 3–4 раза выше, что соответствует потребности в быстрой утилизации АФК в месте образования. Активность двух других ферментов была сопоставима в обоих изученных компартментах. Для активности ГПО и ГР была характерна тенденция к росту. Так в митохондриях печени

активность ГПО была увеличена относительно контроля на 39 % на стадии реперфузии, а активность ГР – на 61 %. В цитозольной фракции более выражены были изменения в ишемическом периоде. Активность ГПО в этом случае превышала контрольные значения на 40 %, активность ГР была увеличена всего на 8 %. К забору печени в реперфузионной фазе активность ферментов метаболизма глутатиона возвращалась к нормальным значениям, характерным для группы псевдооперированных животных.

Отдельно для анализа изменений функционального состояния митохондрий на фоне ИРП печени была определена способность генерировать мембранный потенциал в среде с флуоресцентным зондом сафранином О после энергизации сукцинатом (таблица 3.14).

Таблица 3.14 – Изменения мембранного потенциала в суспензии митохондрий печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения (Me (Q₁/Q₃))

Исследуемые группы	Длительность ишемии, мин	Длительность реперфузии, мин	Мембранный потенциал, мВ
Контрольная	–	–	180,2 (172,3/185,6)
Ишемия	10	–	117,8 (107,1/123,5)
	15	–	61,5 (55,2/68,9)*
	20	–	28,3 (24,5/33,1)*
	25	–	10,1 (0/17,1)*
Реперфузия	10	30	154,7 (148,2/160,5)^
	15	30	102,6 (95,7/107,1)*^
	20	30	59,9 (54,2/60,4)*^
	25	30	14,3 (8,3/21,2)*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении между показателями групп животных с длительностью ишемии 10 и 15 минут, 15 и 20 минут, 20 и 25 минут; ^ – $p < 0,05$ при сравнении между показателями групп животных с одинаковой длительностью ишемии, но с реперфузией или без.

В результате проведенных исследований было установлено снижение уровня генерации мембранного потенциала во всех подгруппах лабораторных животных (таблица 3.14). При этом более низкие значения были определены на фоне ишемии без реперфузии. Так 10 минутный ишемический период характеризовался снижением мембранного потенциала в митохондриальной

сuspензии на 34 %, а спустя еще 30 минут реперфузии уровень анализируемого показателя был ниже контроля только на 14 %. Аналогичная тенденция была выявлена при исследовании 15 минутной ишемии, однако в этом случае и в дальнейшем с увеличением длительности сосудистой изоляции печени наблюдалось прогрессирующее снижение способности митохондрий генерировать разность потенциалов на внутренней мембране. 15 минутный период ишемии без восстановления кровотока сопровождался снижением рассматриваемого показателя на 66 %, с реперфузионной стадией – на 43 %, для 20 минутного периода ишемии были характерны значения показателя на 84 % и 67 % ниже контроля до и после восстановления кровоснабжения печени соответственно. 25 минутный период васкулярной эксклюзии печени сопровождался настолько низкими характеристиками функционального состояния митохондриальной суспензии, что в ряде случаев были выявлены образцы органелл совершенно не способные генерировать мембранный потенциал. Это кроме того подтверждалось потерей способности поврежденной печени в результате 25 минутной ишемии восстанавливать мембранный потенциал в течение последующих 30 минут реперфузии.

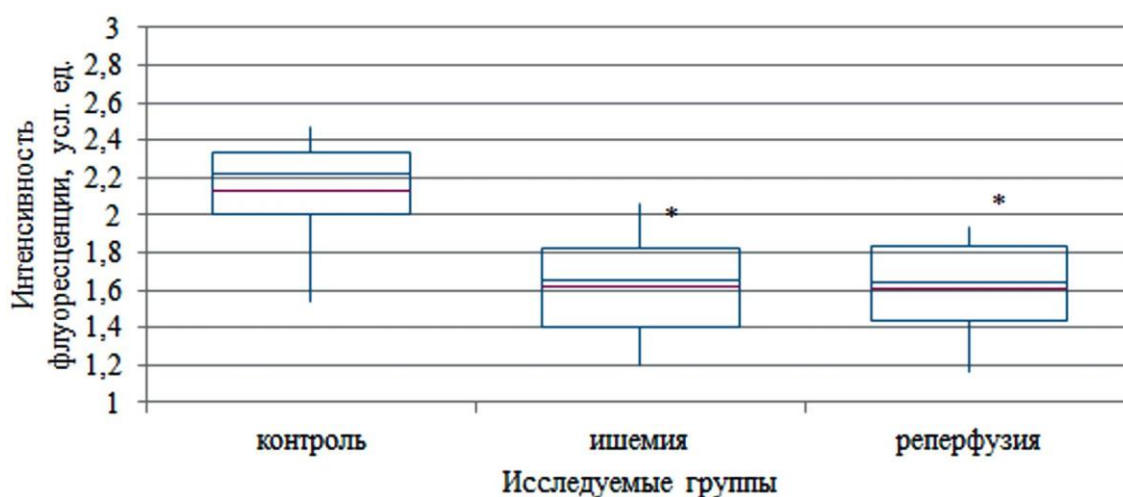


Рисунок 3.17 – Изменения микровязкости мембран митохондрий печени крыс в фазе ишемии и реперфузии (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от соответствующего показателя контрольной. Длительность ишемии – 15 минут, реперфузии – 15 минут

ИРП печени характеризовалось не только изменениями функционального состояния митохондрий, выраженными снижением мембранного потенциала, но

также были установлены структурные модификации, проявляющиеся снижением параметра микровязкости мембран по данным коэффициента эксимеризации пирена. Было установлено, что на фоне 25 минутной сосудистой изоляции без реперфузии или с 30 минутным реперфузионным периодом анализируемый показатель был снижен в равной степени – на 26 % относительно контроля (рисунок 3.17).

3.5 Исследование изменений микроэлементного гомеостаза после ишемии-реперфузии печени в эксперименте

Печень принимает важное участие в регуляции металл-лигандного гомеостаза, выполняя депонирующую функцию для ряда микроэлементов. Среди прочих в печени депонируется и обеспечивается метаболизм соединений железа и меди – металлов с переменной валентностью, способных индуцировать свободнорадикальные процессы. Одной из потенциальных причин развития системного окислительного стресса в реперфузионную стадию поражения печеночной паренхимы может быть высвобождение ионов таких металлов и металлопротеинов в кровоток в результате цитолиза гепатоцитов. Данная гипотеза была сформулирована после предварительного исследования биохимических маркеров в ходе которого были определены концентрации некоторых электролитов в плазме крови после моделирования 10-30 минутной тотальной ишемии печени с последующим 15 минутным реперфузионным периодом и забором венозной крови для лабораторного анализа.

Определение концентрации ионов кальция, магния и цинка выполняли колориметрическими методами с использованием наборов реагентов производства «Витал Девелопмент Корпорейшн» (Санкт-Петербург, Россия). В результате проведенных исследований было установлено, что концентрация Ca^{2+} способна поддерживаться в пределах нормальных значений, характерных для

контрольной группы, несмотря на сосудистую изоляцию и повреждение печени. Это было вполне ожидаемо ввиду того, что данный электролит не депонируется в печени, а его концентрация в крови регулируется гормональными сигналами, основными мишенями которых являются костная ткань, кишечник и почки. Определение двух других электролитов показало тенденцию к прогрессирующему увеличению их содержания в плазме крови в зависимости от длительности сосудистой изоляции печени.

Концентрация ионов магния увеличивалась в плазме крови после 10 минутной ишемии печени и реперфузии на 25 % относительно контрольных цифр (рисунок 3.18).

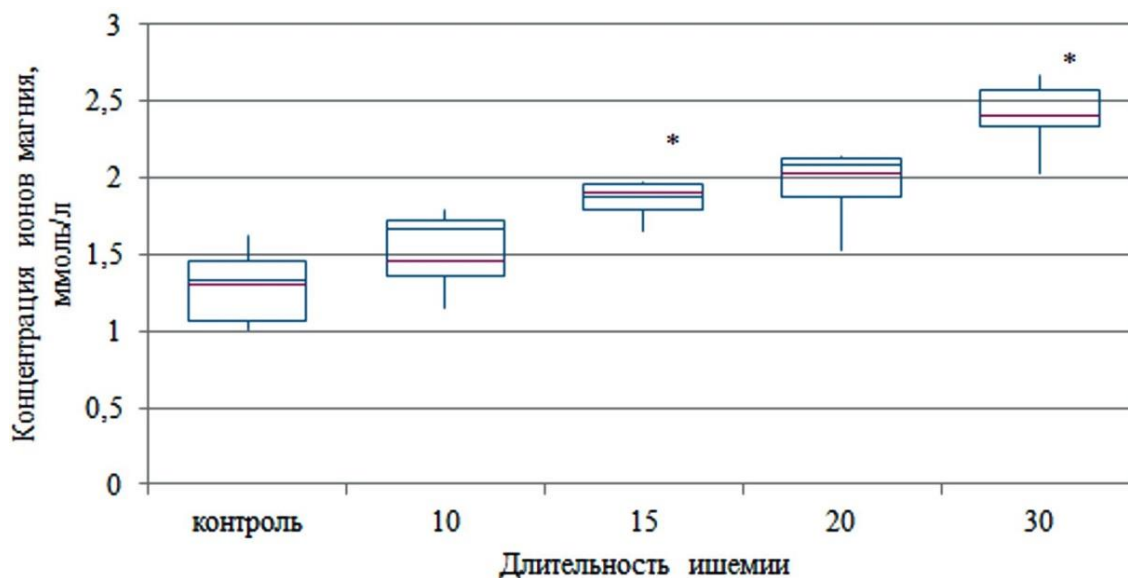


Рисунок 3.18 – Изменения концентрации ионов магния после ишемически-реперфузионного повреждения печени в эксперименте (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия при сравнении с показателем, определенном на предыдущем этапе

Увеличение длительности сосудистой изоляции органа до 15 минут сопровождалось ростом концентрации Mg^{2+} на 41 %, 20 минутная васкулярная эксклюзия – на 56 %, 30 минутная – на 85 %. Аналогичным образом наблюдался рост концентрации ионов цинка в плазме крови (рисунок 3.19), который после 10 минутной длительности ишемической фазы составлял 33 %, после 15 минут ишемии – 57 %, 20 минут ишемии – 150 % относительно контрольного значения соответствующего лабораторного маркера. Постепенный рост концентрации

ионов магния в плазме крови наблюдался в процессе увеличения длительности ишемической фазы до 30 минут и соответственно тяжести патологического процесса, тогда как пик концентрации ионов цинка достигался уже после 20 минутной полной сосудистой изоляции печени. Более быстрый рост уровня цинка может быть обусловлен тем, что магний – более жесткая биохимическая константа в биологических жидкостях, в том числе в крови. Концентрация цинка в крови регулируется менее эффективными механизмами, а также более низкая размерность самого лабораторного показателя позволяет быстрее достигать высоких значений в результате развития цитолитического синдрома.

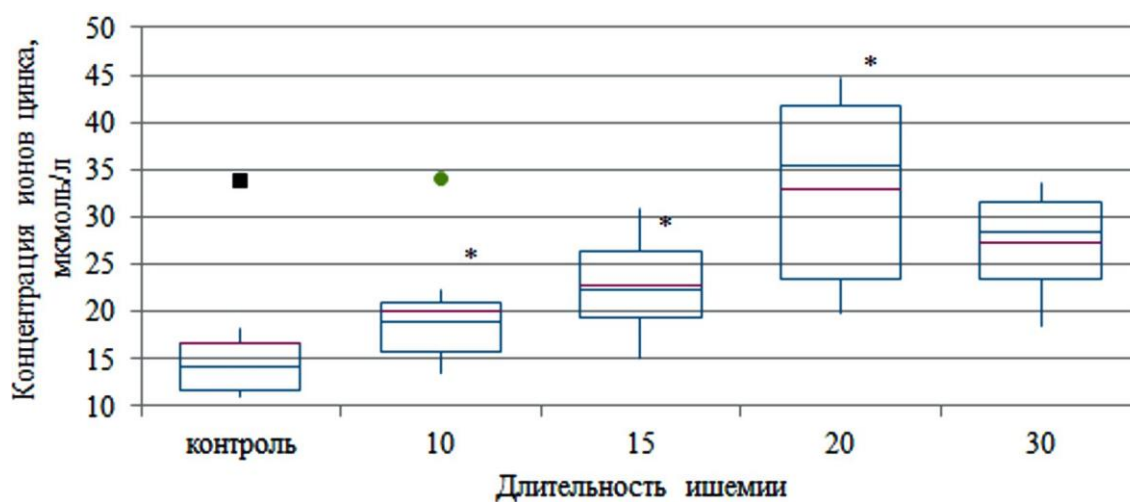


Рисунок 3.19 – Изменения концентрации ионов цинка после ишемически-реперфузионного повреждения печени в эксперименте (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые различия при сравнении с показателем, определенном на предыдущем этапе

Ионы магния и цинка – в основном внутриклеточные ионы, которые тем не менее также не депонируются преимущественно в печени, а распространены повсеместно. Поэтому установление факта увеличения их концентрации в остром периоде повреждения печеночной паренхимы указывает на то, что они могут использоваться в качестве неспецифических маркеров цитолитического синдрома. Однако эффект высвобождения этих электролитов из поврежденных гепатоцитов и других клеток печени указывает на потенциальную возможность еще более массивного высвобождения и других ионов, таких как железо и медь.

Для оценки быстрых изменений метаболизма железа после ишемии-реперфузии печени в условиях моделирования экспериментального

патологического процесса были определены концентрации сывороточного железа и ферритина. Исследование выполнено на модели 40 минутной частичной васкулярной эксклюзии левой боковой и центральной долей печени с последующим 5, 30, 60, 120 или 180 минутным периодом реперфузии.

В результате проведенных исследований было установлено, что концентрация сывороточного железа не увеличивается в раннем реперфузионном периоде продолжительностью от 5 до 180 минут (таблица 3.15). Железо в депо содержится в связанной с белком ферритином форме, очевидно даже при попадании в сыворотку крови в свободной форме будет быстро связываться с трансферрином или образовывать комплексы с другими белками. Анализ концентрации ферритина в сыворотке крови продемонстрировал значительный и статистически значимый рост данного маркера после моделирования ишемии печени и восстановления кровотока. Уже к 5 минуте реперфузии содержание ферритина в сыворотке крови было увеличено в 6,0 раз, к 30 минуте зарегистрировали дальнейший рост анализируемого белкового маркера на 59 %. Статистически значимое увеличение концентрации ферритина наблюдалось до 60 минуты после восстановления кровотока, когда уровень анализируемого маркера достигал значений, превышающих исходные в 12,5 раз и поддерживался в дальнейшем на этом уровне до конца наблюдения.

Таблица 3.15 – Динамика изменений маркеров обмена железа в сыворотке крови крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени (Me (Q₁/Q₃))

Условия эксперимента		Исследуемые показатели	
ишемия, мин	реперфузия, мин	Сывороточное железо, мкмоль/л	Ферритин, мкг/л
0	0	27,6 (23,4/30,2)	44,5 (32,4/48,8)
40	5	24,5 (21,9/28,7)	268,8 (157,8/327,0)*
40	30	23,5 (21,6/28,0)	427,3 (348,2/460,7)*
40	60	27,9 (23,0/31,1)	557,3 (488,2/611,2)*
40	120	29,6 (25,2/33,8)	579,3 (504,3/608,5)
40	180	24,1 (21,3/29,5)	517,2 (463,2/580,4)

Примечание: * – статистически значимые различия при сравнении с показателем, определенном на предыдущем этапе.

Более подробно микроэлементный гомеостаз в крови и печени в условии развития ИРП печени был изучен с использованием метода ИСП-ОЭС. Использовали спектрометр эмиссионный с индуктивно связанной плазмой Plasma 3000 (Китай). Экспериментальные работы проведены с 4 группами лабораторных животных, схема исследования описана в разделе 2.1.4.6 главы «Материалы и методы».

Анализ изменений содержания микроэлементов в плазме крови в целом подтвердил данные, полученные колориметрическими методами и описанные выше. Основной тенденцией, которая наблюдалась при ИРП печени, было возрастание концентрации некоторых электролитов, предположительно вследствие их выброса в кровь из разрушаемой ткани органа (таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Изменения некоторых микроэлементов в плазме крови крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени (Me (Q_1/Q_3))

Условия эксперимента		Исследуемые показатели				
ишемия, мин	реперфузия, мин	Fe, мкг/мл	Cu, мкг/мл	Mg, мкг/мл	Zn, мкг/мл	Ca, мкг/мл
0	0	2,3 (1,8/2,5)	0,8 (0,6/1,0)	22,0 (15,6/25,1)	0,98 (0,84/1,13)	86,8 (82,3/94,5)
40	0	8,4* (5,5/10,3)	0,9 (0,6/1,5)	33,6* (24,7/36,7)	1,55* (1,29/1,70)	110,3* (93,3/118,3)
40	15	13,4* (10,3/15,2)	0,7 (0,5/1,1)	42,0* (35,2/46,8)	1,61* (1,36/1,75)	95,0 (84,5/104,0)
40	180	6,3* (3,8/7,3)	0,6 (0,5/1,0)	23,2 (18,4/29,5)	1,13 (0,97/1,30)	81,8 (73,0/93,6)

Примечание: * – статистически значимые различия при сравнении с показателем контрольной группы.

Наиболее отчетливо наблюдалось возрастание содержания железа, которое сразу после начала реперфузионного периода было увеличено в 3,7 раза относительно контрольной группы ложнооперированных животных. Спустя 15 минут после начала восстановления кровотока анализируемый показатель возрастал до уровня, превышающего контрольный, в 5,8 раз, а через 180 минут наблюдалась тенденция к нормализации уровня железа в плазме крови. Тем не менее на этом временном промежутке содержание железа оставалось увеличенным в 2,7 раза в сравнении со значением контрольного показателя.

Аналогичная железу динамика изменений микроэлементов была характерна для магния и цинка (таблица 3.16). На этапе выхода из ишемической фазы содержание обоих элементов в плазме крови животных было увеличено на 53–58 %, спустя 15 минут реперфузии поврежденного органа регистрировались увеличенные на 64 % и 91 % значения концентрации цинка и магния соответственно. Через 180 минут реперфузии уровень обоих микроэлементов в плазме крови возвращался к условно нормальным значениям, характерным для контрольной группы. Концентрация кальция была увеличена на 27 % только в самом начале реперфузии, после чего быстро снижалась до уровня, характерного для группы ложнооперированных крыс. Статистически значимых изменений концентрации меди в плазме крови выявлено не было.

Среди микроэлементов-неметаллов была определена концентрация кремния в плазме крови, которая также увеличивалась в плазме крови к окончанию ишемической фазы на 74 %, оставалась увеличенной на 50 % через 15 минут после восстановления кровотока и возвращалась к нормальным значениям спустя 180 минут после начала реперфузии ткани печени.

Анализ изменений содержания микроэлементов в эритроцитарной взвеси крыс в условии моделирования ИРП печени показал высокую стабильность внутриклеточного элементного гомеостаза крови в сравнении с плазмой. Среди всех изученных микроэлементов было определено только снижение содержания в эритроцитах кальция на 39–51 % и кремния в 2,7–3,3 раза относительно контроля во всех опытных группах животных (таблица 3.17).

Отдельного внимания заслуживает оценка изменений микроэлементного гомеостаза на местном уровне – в паренхиме печени (таблица 3.18). Как и в случае с эритроцитарной взвеси состав элементов на клеточном уровне в органе очевидно был более стабильный, чем в плазме крови. Тем не менее было установлено снижение содержания железа на 30 % в интактной и постишемической долях печени крыс сразу после окончания этапа васкулярной эксклюзии органа. При этом в интактных долях сохранялся дефицит железа и спустя 15 минут после начала реперфузии, тогда как в ишемизированных долях при наблюдении через 180 минут восстановления кровотока уровень железа в печени восстанавливался до нормальных значений.

Таблица 3.17 – Изменения некоторых микроэлементов в эритроцитах крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени (Ме (Q_1/Q_3))

Условия эксперимента		Исследуемые показатели				
ишемия, мин	реперфузия, мин	Fe, мг/мл	Cu, мкг/мл	Mg, мкг/мл	Zn, мкг/мл	Ca, мкг/мл
0	0	8,8 (7,2/10,2)	10,8 (8,5/12,4)	65,2 (53,4/72,7)	10,3 (8,4/11,6)	24,8 (19,6/26,2)
40	0	9,7 (8,0/10,6)	8,2 (7,2/9,6)	62,7 (54,0/78,2)	11,5 (9,4/12,4)	14,2* (11,5/17,8)
40	15	11,1 (8,5/11,8)	8,8 (7,4/10,0)	74,2 (58,2/80,3)	13,3* (11,5/15,3)	15,2* (13,2/20,4)
40	180	9,9 (8,2/11,0)	8,7 (7,7/10,8)	62,2 (53,4/72,5)	11,4 (9,8/13,0)	12,1* (10,4/19,3)

Примечание: * – статистически значимые различия при сравнении с показателем контрольной группы.

Таблица 3.18 – Изменения некоторых микроэлементов в гомогенате печени крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени (Ме (Q_1/Q_3))

Условия эксперимента			Исследуемые показатели				
ишемия, мин	реперфузия, мин	Доля печени	Fe, мкг/г	Cu, мкг/г	Mg, мкг/г	Zn, мкг/г	Ca, мкг/г
0	0	К	168 (141/180)	29,1 (25,4/35,0)	171 (158/193)	30,4 (27,4/33,5)	210 (183/230)
40	0	К	118* (103/135)	36,0 (32,2/48,7)	227* (204/256)	28,8 (25,4/33,2)	247 (224/261)
		И	118* (101/130)	36,8 (33,2/41,7)	201 (183/211)	26,8 (24,0/29,7)	266* (237/285)
40	15	К	132* (119/143)	28,6 (24,6/34,4)	172 (157/193)	22,0* (18,5/25,0)	190 (178/215)
		И	178 (132/190)	22,3 (18,9/26,8)	149* (127/160)	15,4* (13,2/18,9)	395* (310/455)
40	180	К	141 (123/160)	30,0 (25,7/34,8)	187 (165/202)	27,4 (24,1/29,6)	186 (166/221)
		И	147 (130/162)	25,2 (21,5/32,0)	191 (174/220)	27,3 (23,3/30,2)	208 (183/232)

Примечание: * – статистически значимые различия при сравнении с показателем контрольной группы. Сокращения: К – интактная (контрольная) доля печени, И – ишемизированная доля печени.

Существенных изменений содержания меди и магния в ткани печени в условиях ИРП выявлено не было. Содержание цинка после 40 минут ишемии и 15 минут реперфузии было снижено в ткани интактных и постишемических долей печени на 28 % и 49 % соответственно. Для кальция было характерно увеличение только в ишемизированных участках печени сразу после восстановления кровотока и через 15 минут на 27 % и 88 % соответственно. Во всех опытных группах животных (в интактных и постишемических долях печени) было определено снижение концентрации кремния. Сразу после восстановления кровотока после 40-минутной ишемии было определено сниженное содержание кремния в интактной доли в 2,3 раза, в ишемизированном участке – на 35 %. Наблюдение в реперфузионной фазе спустя 15 минут после начала восстановления кровотока позволило установить сниженное содержание кремния в обеих долях печени на 41 %. На следующем этапе (180 минут реперфузии) анализируемый маркер был снижен на 35–40 % в обеих долях печени относительно контрольного уровня.

3.6 Обсуждение

3.6.1 Анализ динамики маркеров острого повреждения печени в реперфузионном периоде

Анализ изменений маркеров цитолитического синдрома позволил сделать ряд наблюдений и промежуточных выводов. Во-первых, наблюдается постепенное увеличение активности аминотрансфераз в плазме крови после ишемии печени с достижением максимальных значений через 3 часа. В данной ситуации с одной стороны может иметь место разрушение ткани печени в результате повреждающего действия реперфузии с высвобождением большего

количества ферментов-маркеров цитолиза в кровь, с другой стороны такой отсроченный характер увеличения активности АЛТ и АСТ может быть результатом сохранения ишемии в части печеночной паренхимы после восстановления кровотока. Как обсуждалось, в ишемической фазе отек эндотелиальных клеток, стаз микрососудистого русла и рекрутирование лейкоцитов приводят к микроциркуляторным нарушениям, в результате которых несмотря на восстановление кровотока большая часть паренхимы остается в ишемизированном состоянии [22, 102]. Таким образом, можно предположить, что в первые 3 часа наблюдается постепенная нормализация микроциркуляции и высвобождение аминотрансфераз из поврежденных гепатоцитов в кровь. Соплассуется с обоими предположениями изменение активности ЛДГ, которая, однако, несколько быстрее высвобождается в кровь. Принципиально другим образом изменяется активность GST, максимальные значения которой наблюдаются сразу после ишемии. В чем заключается механизм не совсем ясно, но это позволяет предположить, что определение изменений активности GST, как и концентрации лактата в плазме крови через 5 минут после восстановления кровотока позволяют оценить выраженность повреждения ткани факторами ишемии, тогда как изменения активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в большей степени определяются процессами, происходящими в реперфузионную фазу.

Другим наблюдением является высокая скорость нормализации 5 обсуждаемых показателей, значения которых спустя сутки достигали контрольного уровня, характерного для ложнооперированных крыс. Необходимо учитывать, что в работе выполнялось моделирование острого повреждения печени, которое при условии прекращения действия патологического фактора ишемии и отсутствия необратимых изменений еще в фазе сосудистой изоляции может сравнительно быстро перейти к регенеративным процессам и восстановлению паренхимы печени. Аналогичные данные, подтверждающие нормализацию в течение суток активности аминотрансфераз получены и другими исследовательскими коллективами [135]. Морфологические изменения, выявляемые гистологическими методами, хотя проявляются дольше, обычно

хорошо соотносятся с изменениями биохимических маркеров цитолиза гепатоцитов, поэтому вполне оправдано использование только лабораторных методов оценки повреждения печени [9, 61].

Оценка динамики изменений показателей окислительного гомеостаза в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс показала ряд особенностей, требующих обсуждения. Это увеличение антиоксидантной активности плазмы крови после начала реперфузионной стадии. Мы склонны полагать, что это результат эффекта высвобождения в кровь метаболитов с восстановительной активностью из поврежденных клеток печени, аналогичный эффекту высвобождения ферментов, которые традиционно рассматривают как маркеры цитолитического синдрома. В пользу такого предположения свидетельствует сравнительно небольшой период регистрации высоких значений железо-восстанавливающей способности и степени радикальной сорбции, который спустя 60–120 минут переходил в фазу с резким снижением анализируемых показателей, уже вероятно отражающих реальное состояние системы антиоксидантной защиты крови. Полученные данные демонстрируют временные ограничения лабораторных исследований ишемически-реперфузионного синдрома. В большинстве исследований анализ состояния окислительного гомеостаза проводят не ранее 3 часов или даже суток после ишемии [236]. Однако исследования в более ранние сроки могут демонстрировать хорошую корреляцию между повреждением печени и уровнем антиоксидантной активности, как потенциального маркера цитолиза, отражающего объем патологического процесса, сопровождающегося гибелью клеток. Интересно, что увеличения в плазме крови уровня тиоловых групп выявлено не было, что указывает на то, что эффект увеличения антиоксидантного потенциала плазмы крови связан с другими группами веществ-восстановителей. SH-группы наиболее реакционноспособные функциональные группы в биологических молекулах и наиболее реактивные восстановители среди соединений класса антиоксидантов. Поэтому высвобождение данных веществ из поврежденной ткани могло сопровождаться быстрым их окислением. Поэтому

данный маркер в ранние сроки реперфузии может более объективно отражать состояние системы антиоксидантной защиты плазмы крови.

Изменения показателей эритроцитарной взвеси были более очевидными, что может быть связано с меньшим или опосредованным влиянием продуктов распада, высвобождающихся из поврежденной паренхимы печени. Это дополнительно подчеркивает ценность оценки состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса в форменных элементах, а не плазме крови. Выявленные изменения прямо указывают на снижение защитного потенциала антиоксидантной системы крови, что проявлялось снижением каталазной и глутатионпероксидазной активности, концентрации глутатиона. Однако следует отметить, что этому предшествовал небольшой период напряжения состояния системы неспецифической резистентности, компенсаторных или адаптивных изменений, характеризующийся поддержанием более высокой активности глутатионпероксидазы в первые 5 минут и концентрации глутатиона в течение 60 минут. Показательны в этом отношении изменения уровня ТБК-реактивных продуктов, образование или накопление которых сдерживалось вплоть до 60 минут реперфузии. Интенсификация окислительного стресса к 60 минуте, что также сопровождалось снижением железо-восстанавливающей и антирадикальной способности плазмы крови, формировало основу для прогрессирования реперфузионных повреждений печени, которые проявлялись максимальным ростом активности АЛТ, АСТ и ЛДГ к 60–180 минутам.

Разная динамика изменений показателей как цитолиза, так и окислительного гомеостаза, особенно в течение первых 2 часов реперфузионного периода не позволила выявить корреляционные взаимосвязи между определяемыми маркерами. Однако по мере увеличения длительности реперфузии и перехода к этапу восстановления, характеризующемуся в том числе снижением выброса в кровь печеночных ферментов, наблюдалось усиление корреляционных взаимосвязей между показателями, в том числе при анализе маркеров цитолитического синдрома и состояния прооксидантно-антиоксидантной системы. Это подтверждает ключевую роль

свободнорадикальных процессов и окислительного стресса при ишемически-реперфузионном повреждении печени. Множественный регрессионный анализ позволил построить уравнение зависимости выраженности повреждения печени по данным маркеров цитолиза от нарушений окислительного гомеостаза. Оптимальным уравнением для 8 часового периода реперфузии на основании полученных данных является:

$$\text{АЛТ} = - 321,1635 + 533,0977 * \text{ТБЧ} + 312,9255 * \text{АВТС},$$

для которого все включенные независимые переменные оказывают статистически значимое влияние на зависимую переменную, а скорректированный R-квадрат, показывающий, в какой степени представленное уравнение обуславливает изменения зависимой переменной составил 0,9382. Включение в уравнение других показателей не позволило добиться лучших результатов коэффициента детерминации, а ряд показателей оказывал влияние, не подтвержденное статистическим анализом.

Аналогичным образом выглядит уравнение, полученное при анализе данных после 3-часовой реперфузии:

$$\text{АЛТ} = - 711,8420 + 1110,5560 * \text{ТБЧ} - 372,7475 * \text{АВТС}.$$

В данном случае скорректированный R-квадрат составил 0,8996.

Таким образом, цитолиз гепатоцитов может быть в значительной степени обусловлен нарушениями прооксидантно-антиоксидантного баланса, а уравнение регрессии может описать изменения уровня АЛТ влиянием 2 показателей – тиобарбитурового числа и антирадикальной активности плазмы крови. Следует отметить, что это практически интегральные характеристики оксидативного гомеостаза, которые само собой взаимосвязаны с остальными маркерами окислительного стресса и состояния антиоксидантной системы крови. Это дополнительно подчеркивает актуальность поиска и разработки интегральных подходов в лабораторной диагностике, особенно таких сложных и многокомпонентных, многоуровневых патологических процессов как окислительный стресс.

3.6.2 Анализ динамики развития нарушений окислительного гомеостаза

Оценка изменений маркеров окислительного гомеостаза в крови и печени животных в динамике развития ишемически-реперфузионного повреждения печени также позволила сделать несколько промежуточных выводов. Так изменения каталазной и супероксиддисмутазной активности в крови, направленные в сторону увеличения позволяют судить об адаптации системы антиоксидантной защиты эритроцитов. Это вполне соответствует имеющимся представлениям об обратимости изменений при 20 минутной сосудистой изоляции печени у животных [236]. Можно также отметить реагирование ферментов сразу 2 линий антиоксидантной защиты, что позволяет эффективно нейтрализовать супероксидные анион-радикалы и перекись водорода – АФК, образующиеся на начальных этапах интенсификации свободнорадикальных процессов [17]. Небольшое снижение активности супероксиддисмутазы при переходе в реперфузионную фазу указывает на изменение характера патологического процесса с начальными признаками декомпенсации ввиду возможного повреждения фермента избыточно образующимися радикальными частицами в ходе одноэлектронного восстановления кислорода.

Изменения активности ферментов первых двух линий антиоксидантной защиты на местном уровне – в гомогенате печени имели противоположный характер. В данном случае имела место тенденция к снижению значений обоих анализируемых показателей, что в значительной степени соответствует тяжести патологического процесса на системном и локальном уровнях. Однако более важным было то, что изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы были несинхронизированы. Активность первого фермента была снижена преимущественно в ишемической фазе, тогда как низкие значения активности каталазы относительно контроля наблюдались после восстановления кровотока в постишемической ткани печени. Поддержание более высокой каталазной

активности в условии низкого напряжения кислорода в паренхиме печени может быть связано с косвенной функцией этого фермента в гипоксических условиях, направленной на возвращение кислорода в энергообмен. Однако рассинхронизация работы ферментов первых двух линий антиоксидантной защиты не позволяет адекватно прерывать свободнорадикальные процессы еще на этапе зарождения цепи реакций. Выделяют 3 основные ситуации в изменении функционального состояния первых двух линий антиоксидантной защиты, которые можно описать изменениями коэффициента соотношения КАТ/СОД: преобладание активности супероксиддисмутазы, преобладание активности каталазы, сохранение нормального баланса ферментов. В каждом случае можно также выделять отдельные особенности, связанные с относительным увеличением или снижением значений показателей. Тем не менее, обычно при увеличении каталазной активности на фоне нормальной или сниженной супероксиддисмутазной можно судить о накоплении в клетках гидроперекисей. В обратной ситуации прооксидантный эффект достигается гиперпродукцией супероксидного анион-радикала [10].

Ферменты системы глутатиона в эритроцитарной взвеси изменялись однонаправленно с супероксиддисмутазой и каталазой – при ишемии-реперфузии печени наблюдалась тенденция к постепенному росту их активности. Это свидетельствует о сравнительно низкоинтенсивном окислительном стрессе на системном уровне, который характеризуется умеренным ростом интенсивности генерации свободных радикалов, в ответ на который наблюдается быстрый адаптационный рост активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. В работе обоих ферментов наблюдалась определенная особенность, связанная с пиковыми значениями активности на 5 минуте реперфузии с последующим кратковременным снижением показателя, но сохранением значений, превышающих контрольные. Таким образом, в работе ферментов системы глутатиона крови наблюдалось отсроченное реагирование на изменение окислительного гомеостаза в результате перехода от ишемии к реперфузии. Усиление роста активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы на

5 минуте реперфузии могло быть связано с резкой интенсификацией свободнорадикальных процессов, а последующий спад с частичным ингибированием вследствие повреждения. На этом фоне наблюдалась сниженная концентрация глутатиона в эритроцитарной взвеси только в ишемической фазе.

С учетом вышеописанных изменений окислительного метаболизма в крови животных при развитии ИРП печени можно сделать вывод о том, что, несмотря на ограниченность патологического процесса паренхимой органа в ишемической фазе, на системном уровне уже в этот период наблюдаются выраженные проявления окислительного стресса компенсаторного характера. При этом на этапе восстановления кровотока в печени наблюдались характерные изменения динамики активности ферментов антиоксидантной защиты, которые, однако, не позволяют уверенно судить о тяжести патологического процесса. Имеет место тенденция к нормализации параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса в эритроцитах, что подтверждено в том числе увеличением до нормального уровня содержания глутатиона. Это свидетельствует об обратимости изменений в ткани печени за 20 минут сосудистой изоляции и высоком защитном потенциале системы неспецифической резистентности организма на системном уровне.

Изменения тиолового гомеостаза в печени при ишемии-реперфузии также отличались от крови, как и ферментные системы первых двух линий антиоксидантной защиты. Для глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы и гомогенате было более характерно снижение активности, особенно в период ишемии. При этом в стадию реперфузии наблюдалось резкое увеличение пероксидазной активности и постепенная нормализация редуктазной. Эти изменения хорошо отражают реакцию системы на интенсификацию свободнорадикальных процессов и необходимость активной поддержки внутриклеточной концентрации глутатиона. Необходимо отметить, что глутатионредуктаза хорошо справляется с этой задачей – содержание глутатиона в гомогенате печени в реперфузионную стадию патологического процесса увеличивалось до контрольного уровня. В этом также наверняка участвует другой косвенный фермент антиоксидантной системы – глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа,

обеспечивающая поставку необходимых восстановительных эквивалентов НАДФН. Некоторая задержка роста концентрации глутатиона в первые 15 минут ишемии может быть связана как с более активным его использованием в пероксидазных и трансферазных реакциях, так и с необходимостью синтеза большего количества НАДФН, кроме того расходующегося на работу митохондриальной цепи окисления и обезвреживание эндотоксинов. Тем не менее общая картина метаболических изменений свидетельствует о том, что в условиях моделируемого синдрома ишемии-реперфузии система глутатиона справляется с поддержанием адекватного редокс гомеостаза в печени.

Таким образом, в паренхиме печени при ее ишемически-реперфузионном повреждении наблюдались более значительные изменения окислительного метаболизма, характеризующиеся сравнительно высоким уровнем оксидативного стресса. Это подтверждается выраженными тенденциями к снижению активности ферментов антиоксидантной защиты, концентрации глутатиона и интегральной характеристики – общей антиоксидантной активности. При этом также, как и по данным параметров крови можно судить об обратимости изменений ввиду наличия тенденций нормализации изученных показателей в динамике реперфузионной фазы экспериментального патологического процесса.

Отдельного внимания заслуживает анализ изменений функционального состояния пируватдегидрогеназного комплекса. Существует мнение, что ингибирование активности данного мультиферментного комплекса служит одним из ключевых механизмов повреждения клеток к реперфузионной стадии ввиду метаболического блока энергоэффективного окисления глюкозы. В нашем исследовании было показано, что и в условиях ИРП печени также наблюдается эффект снижения активности пируватдегидрогеназы при восстановлении кровотока после поддержания ее на уровне, близком нормальному, в ишемической фазе. Полученные данные являются основанием для поиска способов метаболической коррекции, нацеленной на регуляцию активности пируватдегидрогеназного комплекса с помощью его активатора дихлорацетата натрия, кофакторов и изменения концентрации субстрата.

3.6.3 Сравнение экспериментальных моделей частичной и полной сосудистой изоляции печени и почек

В экспериментальной практике используют различные модели, включая полную сосудистую изоляцию, которую воспроизводят, пережимая аналог гепатодуоденальной связки у крыс. Предпочтительнее использование крыс ввиду оптимальных размеров гепатобилиарной зоны, облегчающих выполнение хирургических манипуляций. В экспериментальной практике используют моделирование различных вариантов частичной или парциальной сосудистой изоляции печени. За счет селективной изоляции отдельных долей печени возможно воссоздание различных по объему повреждений паренхимы органа. Кроме того, возможны различные вариации связанные с изменением длительности ишемии и реперфузии печени. Разнообразие экспериментальных подходов диктует обоснование выбора конкретной модели, что должно быть связано с целью и задачами исследования.

Анализ изменений уровня цитолиза на фоне различных экспериментальных моделей ИРП печени показал, что в условии одинаковой длительности ишемии-реперфузии значение имеет объем поврежденной паренхимы. При этом изменения активности АЛТ и ЛДГ более информативны, чем АСТ, которая не отличалась в группах животных, которые подвергались 20 минутной полной или частичной сосудистой изоляции органа. Однако пролонгирование эксперимента, включающего пережатие аналога гепатодуоденальной связки более 20 минут сопровождается высоким риском смертности в результате гемодинамических нарушений. По нашим данным интраоперационная смертность при 30 минутной сосудистой изоляции печени у крыс достигает 50 %, а моделирование васкулярной эксклюзии продолжительностью более 40 минут практически невозможно. Однако известно, что печень сравнительно легко переносит 20 минутный ишемический период. Это подтверждается также использованием приема Прингла в реальной хирургической практике, когда пережимается

печеночно-двенадцатиперстная связка на 15–20 минут без серьезных клинических последствий [118, 130]. Высокий потенциал органа к регенерации делает структурно-функциональные изменения в таких условиях легко обратимыми, не требующими дополнительных терапевтических вмешательств. Таким образом, экспериментальное моделирование тотальной сосудистой изоляции печени продолжительностью около 20 минут не совсем соответствует реальным клиническим ситуациям, хотя и может ограниченно использоваться для оценки гепатопротективной активности лекарственных препаратов. Преимуществом данной модели являются сравнительно гомогенные результаты.

С учетом вышеописанных проблем модели полной васкулярной эксклюзии печени предпочтительнее выглядит модель частичной сосудистой изоляции органа, позволяющая воспроизводить разные по объему повреждения. В нашей работе использовали пережатие сосудистых ножек, питающих левую боковую и центральную доли органа, что примерно соответствует 70 % его объема. В данном случае клинически значимых нарушений системной гемодинамики не наблюдается, что позволяет пролонгировать ишемию до 40–60 минут и более. Также на фоне 40 минутной частичной ишемии с 3 часовым реперфузионным периодом достигается увеличение в плазме крови уровня аминотрансфераз и ЛДГ, превышающего контрольные значения в несколько десятков раз. Это позволяет технически упростить задачу оценки эффективности гепатопротективного действия различных вариантов ишемического и фармакологического кондиционирования.

Оценка изменений общей антиоксидантной активности плазмы крови на фоне различных экспериментальных моделей показала, что принципиальных различий между ними нет, общая тенденция на снижение железозависимой активности и способности радикальной сорбции развивается в равной степени. Однако уровень ТБЧ хорошо коррелировал с показателями цитолиза гепатоцитов. Увеличение данного показателя в 5 раз после 40 минутной парциальной ишемии печени свидетельствует об интенсификации свободнорадикальных процессов в геометрической прогрессии при увеличении

длительности повреждающего фактора сосудистой изоляции. Это в значительной степени объясняет резкое увеличение рисков постишемических, в том числе послеоперационных осложнений и печеночной недостаточности.

Данные об усилении окислительного стресса при пролонгировании ИРП печени хорошо согласуются с изменениями функционального состояния системы антиоксидантной защиты. Наиболее отчетливо прослеживается срыв компенсаторных возможностей ферментов на фоне модели, включающей 40 минут частичной ишемии и 180 минут реперфузии, тогда как еще после 20 минутной ишемии активность глутатионпероксидазы поддерживалась на уровне, превышающем контрольный. Аналогичные данные были получены при определении концентрации глутатиона в эритроцитарной взвеси.

Таким образом, анализируя перспективы и возможности лабораторной биохимической оценки повреждения печени при ее ишемии-реперфузии, следует выделить ряд маркеров, которые изменялись в соответствии с тяжестью патологического процесса и могут быть использованы для лабораторного мониторинга. Это содержание ТБК-реактивных продуктов, активность глутатионпероксидазы и концентрация глутатиона. Все три перечисленных маркера были определены в эритроцитарной взвеси лабораторных животных.

Для сравнения особенностей ишемии-реперфузии печени был проведен анализ динамики лабораторных показателей при одностороннем ИРП почки крыс. Исследование выполнено по дизайну, включающему сбор 100–150 мкл крови через каждые 5 минут в течение 20 минут ишемии и 20 минут реперфузии. Результаты проведенных исследований показали, что изменения в основном носили адаптивный характер и сопровождались тенденциями к росту активности ферментов антиоксидантной защиты. Следует отметить реакцию метаболических систем на переход к реперфузионной стадии, который характеризовался резким кратковременным снижением активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Однако уже к 10 минуте восстановления кровотока активность ферментов возвращалась к увеличенным относительно контроля значениям. Концентрация глутатиона в эритроцитарной

взвеси практически не претерпевала изменений при моделировании ИРП почки. Определение состояния обмена веществ в ткани почки было бы более информативно, но не представлялось возможным ввиду небольшого объема органа. Представленные данные отличаются от результатов, полученных при моделировании ИРП печени крыс. При этом общая направленность изменений совпадает – наблюдаются тенденции к увеличению активности ферментов антиоксидантной системы. Однако выключение печени из системного кровотока сопровождалось более амплитудными изменениями с выраженной реакцией на восстановление кровотока, которая наблюдалась в течение 5–10 минут после снятия зажима с аналога гепатодуоденальной связки в виде снижения активности изученных ферментов. Выявленные отличия могут быть связаны с несколькими факторами. С одной стороны, объем повреждения при сосудистой изоляции печени существенно больше, чем одной из почек. Моделирование двусторонней васкулярной эксклюзии обеих почек не находит клинического приложения, так как такие ситуации реже встречаются в реальной практике. Более того в экспериментальной практике для объективного сравнения часто используют анализ ишемизированной и интактной контралатеральной почек. С другой стороны, ключевая метаболическая роль печени и ее нарушения при ИРП не могут не сказываться на состоянии системного обмена веществ и лабораторных показателей крови. Вероятно, что оба фактора оказывают сочетанное действие на развитие вышеперечисленных особенностей ишемии-реперфузии печени. Из литературных данных известно, что пролонгирование ишемии почек до 60 минут и одновременная двусторонняя сосудистая изоляция сопровождаются снижением активности каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, концентрации глутатиона на фоне роста уровня малонового диальдегида в крови [8]. Однако даже моделирование одностороннего повреждения почки характеризуется увеличением в гомогенатах ткани контралатерального органа биомаркеров хронических заболеваний почек и острой почечной недостаточности, таких как L-тип белка, связывающего жирные кислоты, интерлейкин 18, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов и молекула повреждения почек

KIM1 [2]. Тем не менее системные изменения, определяемые в крови, регистрируются на значительно более низком уровне, чем при ИРП печени [11, 240]. Широко обсуждается в литературе возможность повреждения печени после ишемии-реперфузии почек, что может вносить дополнительный вклад в реализацию проявлений цитолитического синдрома [238]. Считается, что причиной полиорганных нарушений является выброс в системный кровоток после ишемии отдаленных органов таких гуморальных медиаторов как цитокины.

3.6.4 Анализ изменений окислительного гомеостаза в суспензии митохондрий и цитозольной фракции

Оценка ряда параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената печени крыс после ишемии-реперфузии позволила сделать несколько выводов. Во-первых, такой подход позволил получить больший объем информации, чем лабораторные исследования простого гомогената ткани печени, например, представленные в разделе 3.2. Это связано не просто с увеличением количества показателей в 2 раза, но и с качественными характеристиками полученных данных. В частности, это хорошо прослеживается при анализе изменений концентрации глутатиона, которая в цельном гомогенате была снижена в ишемической фазе, но возрастала почти до контрольного уровня после восстановления кровотока в поврежденной паренхиме органа. Анализ изменений данного метаболита в цитозоле позволил выявить, что его концентрация продолжает снижаться и в реперфузионной фазе, более того прогрессирование длительности как ишемии, так и реперфузии является неблагоприятным фактором для окислительного гомеостаза. Такая лабораторная картина лучше согласуется с представлениями о лавинообразном нарастании свободнорадикальных нарушений на фоне притока крови в постишемическую ткань и реоксигенации [174]. Вторым интересным замечанием

является увеличение амплитудности изменений концентрации глутатиона с увеличением длительности ишемии, что в значительной степени может быть обусловлено разницей в исходном функциональном состоянии лабораторных животных. Поэтому планирование эксперимента, включающего моделирование тяжелого патологического состояния в декомпенсированной форме, следует проводить с учетом ранжирования животных по показателям физического развития, стрессоустойчивости, адаптации к повреждающим факторам разной интенсивности воздействия.

Другим наблюдением было превалирование изменений в цитозольной фракции над изменениями в суспензии митохондрий, выделенных из ткани печени крыс после ИРП. Это особенно заметно на примере глутатиона, концентрация которого в митохондриях совсем не изменялась на фоне ишемии и реперфузии, а также в митохондриальной суспензии в меньшей степени проявлялось увеличение уровня диеновых конъюгатов и общей антиоксидантной активности. Мы предполагаем, что наиболее вероятным объяснением такого эффекта преимущественного реагирования цитозоля на окислительный стресс является большая емкость этого компартмента, который играет роль буфера в накоплении продуктов свободнорадикальных повреждений, а также меньший защитный потенциал антиоксидантной системы элементов цитозоля, сосредоточенный в основном в матриксе митохондрий, как месте с наибольшей интенсивностью окислительных процессов. Это может быть свидетельством целесообразности метаболической поддержке, ориентированной на цитозольную антиоксидантную систему, помимо общепринятого ориентира на разработку митохондриально-направленных антиоксидантных средств [261]. Здесь перспективной может быть разработка и использование комбинированных инфузионных лекарственных препаратов, таких как реамберин, цитофлавин и ремаксол, которые способны не только обеспечить нормализацию энергетического обмена, снижение уровня генерации АФК, но и удаление избыточно накапливающихся субстратов эндогенной интоксикации, в том числе продуктов оксидативных повреждений биомолекул в цитозоле клеток.

Увеличение антиоксидантной активности как в цитозоле, так и в меньшей степени в митохондриальной суспензии на фоне ишемии-реперфузии, может быть связано с высвобождением и накоплением большого количества продуктов измененного метаболизма с восстановительной активностью, которые в модельной тест-системе продемонстрировали железо-восстанавливающую способность. Печень исключительно активный метаболический орган, обеспечивающий обмен веществ во всем целостном организме, антиоксидантный потенциал этого органа очень высок, а прекращение кровоснабжения сопровождается также исключением оттока и удаления токсинов и других нормальных метаболитов. Известно, что в норме антиоксидантная активность крови обеспечивается в значительной степени такими метаболитами как мочевая кислота, билирубин и др., которые не могут по восстановительной активности сравниться с глутатионом, токоферолом, аскорбиновой кислотой, однако ввиду высокой концентрации оказывают существенное влияние [43, 81, 179]. Накопление подобных соединений в ткани печени может быть ответственно за наблюдаемый эффект, который может кроме того носить адаптационный характер, сдерживающий свободнорадикальные процессы при восстановлении кровотока и реперфузии.

Для активности ферментов антиоксидантной защиты митохондриальных суспензий были характерны более динамичные и выраженные изменения в сравнении с показателями неферментного звена. В отличие от неферментного звена прооксидантно-антиоксидантной системы были зарегистрированы более существенные изменения в митохондриальной суспензии, которые также развивались быстрее, чем в цитозоле и определялись уже в ишемическом периоде. Это соответствует представлениям о первичной интенсификации свободнорадикальных процессов в митохондриях с формированием адаптивного ответа, заключающегося в увеличении активности ферментов антиоксидантной защиты. Выраженная реакция цитозольных ферментов системы глутатиона свидетельствует о ключевой роли этого трипептида в регуляции клеточного редокс гомеостаза именно в цитозоле. При этом отмечаются разнонаправленные

изменения ферментативной активности в митохондриях и цитозоле при переходе к реперфузионной фазе патологического процесса. В митохондриальной фракции активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы продолжала увеличиваться, тогда, как в цитозоле наблюдалось снижение, достигающее контрольного уровня. Нарушение баланса ферментов антиоксидантной защиты на фоне прогрессирования окислительного стресса и накопления продуктов оксидативных модификаций следует рассматривать как неблагоприятный фактор, потенциальную мишень для фармакологической коррекции и информативный диагностический маркер.

Оценка функционального состояния митохондрий включала также определение микровязкости мембран и способности генерировать мембранный потенциал. Второй лабораторный маркер можно рассматривать как интегральную характеристику состояния митохондрий, так как он определяет ключевые жизненные функции как самих органелл, так и клеток. От уровня мембранного потенциала зависит генерация АТФ, транспорт веществ в матрикс, контроль качества митохондрий и другие события клеточной сигнализации и регуляции апоптоза [155]. Анализ полученных данных показал, что уровень мембранного потенциала митохондриальной суспензии, выделенной из ткани печени, в большей степени снижается после ишемии, а реперфузионный период сопровождается постепенным восстановлением данного параметра. На этапе планирования эксперимента с учетом известного эффекта усиления повреждения ткани в реперфузионной фазе ожидалось получить противоположные результаты. Однако оказалось, что при восстановлении кровотока на фоне усиления повреждения печени функциональная активность митохондрий возрастала. С другой стороны, такие изменения мембранного потенциала и метаболической активности митохондрий сопровождаются интенсификацией свободнорадикальных процессов, увеличением продукции АФК и окислительных повреждений. Только на фоне 25 минутной полной сосудистой изоляции печени не наблюдалось статистически значимого роста способности генерации мембранного потенциала митохондриями, что может быть связано с развитием необратимых изменений структуры органелл еще в

ишемическом периоде. Это подтверждается исключительно низким значением анализируемого показателя в митохондриальной суспензии животных после 25 минутной васкулярной эксклюзии, достигающим в ряде случаев нулевых значений. В данном случае энергетическая система клеток практически полностью теряла способность к восстановлению на фоне реперфузии.

Анализ структурных изменений митохондрий после ишемии-реперфузии печени также показал наличие ключевых изменений уже в ишемической фазе. Были представлены изменения микровязкости мембран только после 25 минутного периода васкулярной эксклюзии, которая аналогично способности генерировать мембранный потенциал митохондриями снижалась на 26 % при выключении кровотока с сохранением таких же значений после 30 минутной реперфузии. Выявленные изменения подтверждают наличие как функциональных, так и структурных изменений митохондрий при ИРП печени.

Таким образом, основным результатом данного раздела было установление факта более выраженного окислительного повреждения цитозольных компонентов, несмотря на первичный дефект, локализованный в митохондриях, а также структурно-функциональные нарушения митохондриальных мембран, пик которых наблюдается в ишемической фазе и при переходе к стадии реперфузии приводит к дисфункции, сопровождающейся увеличением метаболической активности органелл и интенсификации свободнорадикальных повреждений.

3.6.5 Анализ изменений микроэлементного гомеостаза в условии моделирования ишемии-реперфузии печени

Оценка изменений микроэлементного гомеостаза также позволила получить ценную информацию о развитии повреждения печени при ишемии-реперфузии. Анализ изменений содержания некоторых элементов в плазме крови позволил сделать вывод о возможности использования их в качестве маркера цитолиза

гепатоцитов в ранние сроки повреждения печени. Показано, что уровень ионов магния и цинка возрастает в течение 30 минут после восстановления кровотока. Ценность данных маркеров электролитного обмена заключается в простоте их определения с использованием колориметрических методов на автоматических биохимических анализаторах. Между тем это неспецифичные для гепатоцитов маркеры, которые, однако, сигнализируют о возможном выбросе из поврежденной ткани других элементов, для которых печень служит депо, таких как железо и медь. Определение сывороточной концентрации ионов железа не позволило выявить каких-либо особенностей в течение 3 часов реперфузионной фазы патологического процесса. Это вероятно связано с активным связыванием ионов железа в крови трансферрином и другими белками, что делает недоступным регистрацию роста содержания свободного железа в крови. Тем не менее о росте содержания связанного железа в крови после ИРП печени свидетельствует увеличение концентрации ферритина, пик роста которой достигает к 60 минуте после восстановления кровотока и поддерживается в течение как минимум 180 минут.

Использование метода ИСП-ОЭС позволило расширить спектр определяемых микроэлементов и снять ограничения, связанные с определением только свободных ионизированных форм электролитов в крови. Таким образом, определение ряда микроэлементов в плазме крови позволило подтвердить выявленные ранее закономерности изменения содержания магния и цинка. Кальций представляет собой более стабильную константу, жестко удерживаемую в пределах заданных значений в крови за счет гормональных сигналов паратгормона, кальцитонина и в некоторой степени кальцитриола, поэтому его изменения в динамике ИРП были минимальны. Определение общего содержания железа в плазме крови позволило определить его резкое нарастание после моделирования сосудистой изоляции печени, что отражает выброс больших запасов микроэлемента из поврежденной паренхимы и является значительным фактором, способным индуцировать свободнорадикальные процессы на системном уровне. Это также актуализирует анализ возможностей хелатотерапии

в кондиционировании ИРП печени. Существенного выброса меди в кровь не зарегистрировано, что вероятно обусловлено относительно небольшими запасами этого элемента в печени, составляющими по оценкам около 1/10 от запасов железа [67].

Изменения микроэлементного обмена в эритроцитарной взвеси были минимальными, что обусловлено первичным фактором в виде повреждения печени и выброса из паренхимы элементов в кровь. Это обуславливало изменения сыворотки или плазмы крови, но на форменные элементы оказывало минимальное влияние. Выявленные изменения в эритроцитах могли бы быть объяснены нарушением механизмов трансмембранного переноса электролитов. Выявленные изменения уровня кальция в эритроцитах сложно объяснить, так как этот элемент играет важную роль во внутриклеточной сигнализации и имеет большее значение его свободная концентрация в цитозоле, а не общая, в том числе связанная и забуференная [50].

Изменения микроэлементов в ткани печени в ответ на ИРП печени, которое носит острый характер, могут быть в некоторой степени объяснены вымыванием части элементов из поврежденной паренхимы. Так происходит с железом, частично магнием и кальцием. Между тем изменения лабильны и наблюдается быстрое восстановление нормального баланса микроэлементов. Практически не наблюдается разницы между интактными и постишемическими долями печени, что свидетельствует о возможности перераспределения ролей в структуре печени и участием сохранных участков паренхимы в быстром восстановлении поврежденных структур.

Представленные в данной главе результаты можно резюмировать несколькими основными положениями:

- 1) в первые 3 часа восстановления кровотока после ишемии наблюдается постепенная нормализация микроциркуляции и высвобождение аминотрансфераз и ЛДГ из поврежденных гепатоцитов в кровь с постепенным нарастанием их активности;

2) определение изменений активности GST и концентрации лактата в плазме крови в течение 5 минут после восстановления кровотока позволяют оценить выраженность повреждения ткани факторами ишемии, тогда как изменения активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в большей степени определяются процессами, происходящими в реперфузионную фазу;

3) цитоллиз гепатоцитов может быть в значительной степени обусловлен нарушениями прооксидантно-антиоксидантного баланса, а уравнение регрессии может описать изменения активности АЛТ влиянием 2 показателей – тиобарбитурового числа и антирадикальной активности плазмы крови;

4) несмотря на ограниченность патологического процесса паренхимой органа в ишемической фазе, на системном уровне уже в этот период наблюдаются выраженные проявления окислительного стресса компенсаторного характера;

5) в условии ИРП печени наблюдается эффект снижения активности пируватдегидрогеназы при восстановлении кровотока после поддержания ее на уровне, близком нормальному, в ишемической фазе;

6) для экспериментального моделирования ИРП печени предпочтительнее выглядит модель частичной сосудистой изоляции органа, позволяющая воспроизводить разные по объему повреждения, соответствующие разным клиническим ситуациям, и проводить оценку эффективности гепатопротекторной терапии;

7) в условии моделирования ИРП в цитозольной фракции изменения окислительного гомеостаза превалируют над изменениями в суспензии митохондрий;

8) изменения микроэлементного гомеостаза при развитии ИРП печени характеризуется выбросом из поврежденной паренхимы таких элементов как магний, цинк, железо, кремний с возрастанием их концентрации в плазме крови.

ГЛАВА 4.**МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС**

Особенности биохимических нарушений, проанализированные в предыдущих главах, в том числе в литературном обзоре и собственных исследованиях, обусловили направленный поиск перспективных стратегий метаболической терапии ишемически-реперфузионного повреждений печени в эксперименте. На наш взгляд к таким стратегиям можно отнести антиоксидантную терапию, в том числе комбинированное использование антиоксидантов в составе инфузионных препаратов, использование хелаторов ионов металлов с переменной валентностью. Отдельного внимания заслуживает апробация эффективности прооксидантного preconditionирования, теоретически способного за счет индукции сигнальных путей ишемического preconditionирования, обеспечить защиту органа. Дополнительной стратегией защиты печени при ее васкулярной эксклюзии может быть модификация активности пируватдегидрогеназного комплекса с целью нормализации использования глюкозы после восстановления кровотока и минимизации генерации свободных радикалов в дыхательной цепи в ишемической фазе патологического процесса.

4.1 Оценка эффективности фармакологического preconditionирования ишемии-реперфузии печени с использованием антиоксидантов

Для оценки эффективности метаболических гепатопротекторов на основе антиоксидантных средств был выбран Ремаксол (НТТФ Полисан, Россия) в качестве препарата для сравнения, схему использования и эффективность

которого мы попытались модифицировать введением антиоксидантов прямого механизма действия (липоевая кислота, аскорбиновая кислота, глутатион, альфа-токоферол). Схема экспериментального исследования описана в разделе 2.1.5.1 главы «Материалы и методы». Анализ цитопротекторной активности антиоксидантов был основан на определении классических маркеров цитолиза гепатоцитов – АЛТ, АСТ и ЛДГ (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Влияние антиоксидантного preconditionирования в условиях ишемии-реперфузии печени на выраженность цитолитического синдрома (Ме (Q₁/Q₃))

Группа (антиоксидант)	Показатели		
	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЛДГ, ед/л
1 контроль	27,8 (18,0/32,5)*	30,4 (25,5/34,2)*	120,2 (94,2/155,0)*
2 Физ	893,8 (822,5/959,0)	970 (910,1/1132,0)	1846,2 (1637,3/2112,5)
3 Р	645,0 (588,5/696,5)*	684,2 (576,3/754,2)*	1562,6 (1305,2/1721,0)
4 С	884,2 (756,3/949,8)	947,8 (868,3/981,0)	1838,4 (1532,2/2018,6)
5 ЛК	647,8 (575,4/701,2)*	671,2 (612,5/750,4)*	1555,4 (1299,5/1695,7)*
6 Е	900,2 (784,5/955,4)	954,4 (890,3/1012,8)	1868,8 (1608,4/2053,2)
7 Р+С	632,8 (557,8/674,5)*	636,6 (578,4/701,3)*	1382,2 (1087,4/1513,3)*
8 Р+ЛК	423,4 (367,0/460,2)*	523 (483,1/564,6)*	908 (833,6/978,5)*
9 Р+Е	639,2 (598,2/685,2)*	637,6 (594,3/685,3)*	1446,8 (1245,5/1650,1)*
10 Р+С+ЛК	228,6 (176,5/302,4)*	338,8 (273,2/412,8)*	656,8 (603,8/693,0)*
11 Р+С+ЛК+Е	384,8 (337,8/451,9)*	518,4 (447,4/558,4)*	887,2 (827,4/965,9)*

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы. Сокращения: К – контрольная группа, Физ – группа животных, которым вводили физиологический раствор, Р – ремаксол, С – аскорбиновая кислота, ЛК – липоевая кислота, Е – токоферола ацетат.

В результате проведенных исследований было установлено, что в условиях острого эксперимента – моделировании частичной сосудистой изоляции печени крыс, ремаксол показал защитное действие, проявляющееся в сниженных значениях активности вышеперечисленных ферментов в плазме крови. В сравнении с группой животных, которым вводили физиологический раствор на фоне моделирования ишемии-реперфузии, в плазме крови 3 группы животных активность аминотрансфераз была снижена на 27–29 %, активность ЛДГ – на 15 %.

Сравнительно небольшое снижение уровня маркеров цитолитического синдрома на фоне введения ремаксола является неудовлетворительным результатом, который, однако, оставляет перспективы для совершенствования препарата.

Определение эффективности комбинированного использования антиоксидантов показал возможность усиления ремаксола за счет дополнительного введения: 1) липоевой кислоты; 2) липоевой кислоты и аскорбиновой кислоты; 3) липоевой кислоты, аскорбиновой кислоты и альфа-токоферола. Необходимо отметить, что самостоятельное введение липоевой кислоты обеспечивало защитное действие, сопоставимое с эффектом снижения цитолиза гепатоцитов в результате использования ремаксола. Введение аскорбиновой кислоты или альфа-токоферола не обеспечивало статистически значимого снижения выраженности цитолитического синдрома по данным изменений активности аминотрансфераз и ЛДГ. Таким образом можно судить о потенцировании эффектов используемых антиоксидантных препаратов при их совместном применении. Так на фоне введения ремаксола вместе с липоевой кислотой были достигнуты значения активности аминотрансфераз в плазме крови, сниженные на 46–53 % относительно группы сравнения. Активность ЛДГ в этих условиях была снижена в 2,0 раза относительно 2 группы (таблица 4.1). Аналогичные результаты были получены при сравнении значений показателей группы животных, которым перед моделированием ишемически-реперфузионного повреждения печени вводили ремаксол, липоевую кислоту, аскорбиновую кислоту и альфа-токоферол. Вероятно, дальнейшее расширение спектра антиоксидантов не имеет значения. Лучшие же результаты были продемонстрированы на экспериментальной модели в которой для коррекции повреждения печени использовали комбинацию ремаксола с липоевой и аскорбиновой кислотами. В этом случае активность трансаминаз в плазме крови составляла только 26–35 % от уровня значений соответствующих маркеров группы сравнения, а активность ЛДГ была снижена в 2,8 раза.

Анализ влияния используемых гепатопротекторов в условиях васкулярной эксклюзии печени на антиоксидантную активность плазмы крови показал

значительный рост железо-восстанавливающей способности биожидкости (рисунок 4.1). Такой эффект, с учетом механизма действия и химических свойств используемых средств, не был неожиданным. Однако интересно отметить, что комбинированная антиоксидантная терапия характеризовалась увеличенным значением анализируемого лабораторного показателя на 38–63 % с максимальными значениями (на уровне контрольной группы) на фоне сочетания 3 и более препаратов. При этом монотерапия сопровождалась поддержанием железо-восстанавливающей способности плазмы крови в пределах значений маркера, характерных для группы сравнения.

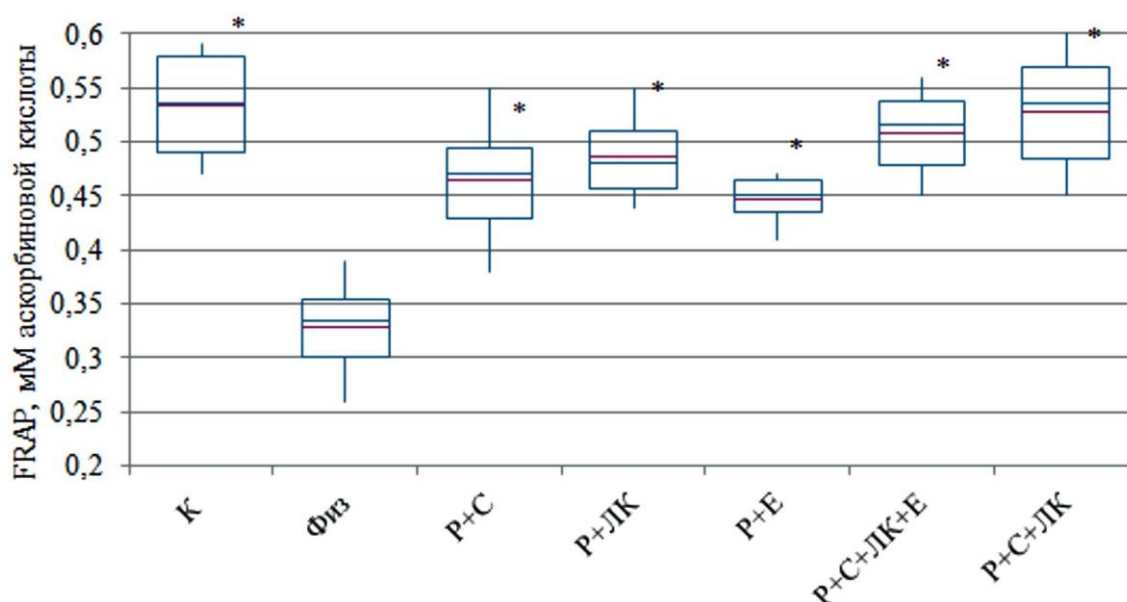


Рисунок 4.1 – Влияние комбинированной антиоксидантной терапии на железо-восстанавливающую способность плазмы крови крыс после ишемии-реперфузии печени (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы (Физ). Сокращения: К – контрольная группа; Физ – группа животных, которым вводили физиологический раствор; Р – ремаксол; С – аскорбиновая кислота; ЛК – липоевая кислота; Е – токоферола ацетат

Аналогичные эффекты были выявлены при анализе антиоксидантной активности в тест-системе с поглощением катионного радикала ABTS. В группе сравнения и группах животных, получавших монотерапию, уровень антирадикальной активности плазмы крови был снижен в среднем на 36 % относительно значения соответствующего параметра контрольной группы. На

фоне проведения комбинированного антиоксидантного preconditionирования анализируемый лабораторный показатель был снижен только на 8–20 % относительно показателя 1 группы. Максимальные значения общей антиоксидантной наблюдались в условии введения 3-4 препаратов одновременно.

Концентрация восстановленного глутатиона в эритроцитарной взвеси в условии моделирования ИРП печени без коррекции была снижена на 21 %. Использование ремаксола в качестве гепатопротектора не оказывало влияния на системное содержание анализируемого метаболита. Однако введение прямых антиоксидантов самостоятельно или совместно с ремаксолом обеспечивало поддержание концентрации глутатиона на более высоком уровне, соответствующем контрольной группе лабораторных животных. Максимальные средние значения анализируемого маркера функционального состояния антиоксидантной системы были определены в крови крыс, которым вводили сразу несколько антиоксидантов – ремаксол + аскорбиновая кислота + липоевая кислота или тот же набор, дополненный еще альфа-токоферола ацетатом (рисунок 4.2).

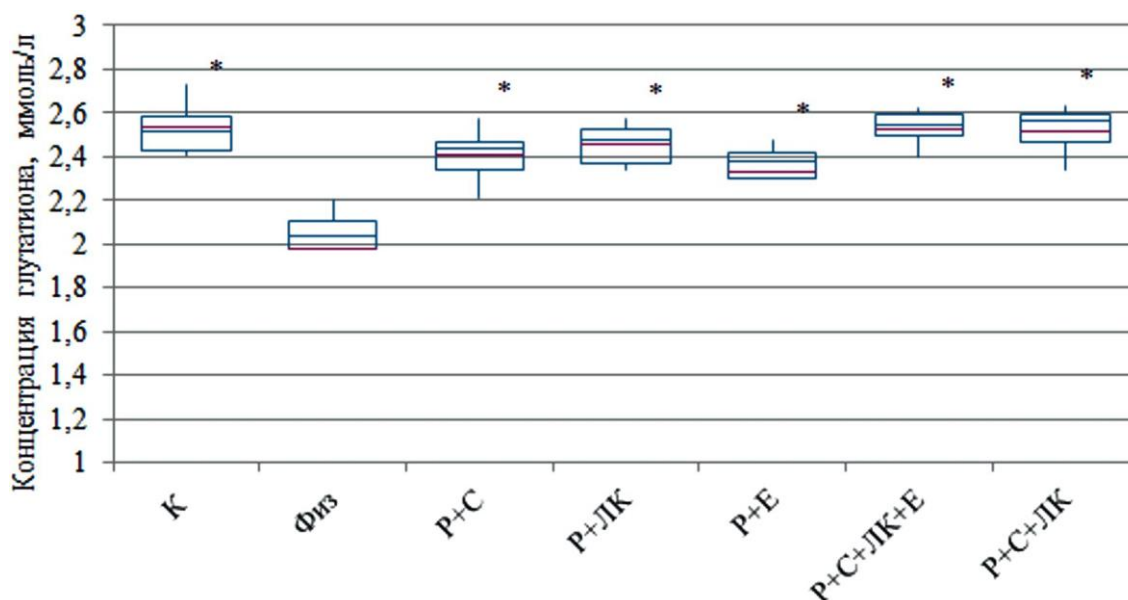


Рисунок 4.2 – Влияние комбинированной антиоксидантной терапии на концентрацию глутатиона в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени (Me (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы (Физ). Сокращения: К – контрольная группа; Физ – группа животных, которым вводили физиологический раствор; Р – ремаксол; С – аскорбиновая кислота; ЛК – липоевая кислота; Е – токоферола ацетат

В плазме крови был определен суммарный уровень SH-групп, принадлежавших низкомолекулярным тиолсодержащим соединениям и белкам. Ожидаемо данный показатель, обычно хорошо коррелирующий с общей антиоксидантной активностью, был снижен на фоне развития ИРП печени на 37 %. Монотерапия антиоксидантными препаратами, за исключением липоевой кислоты, не оказывала существенного влияния на данный лабораторный маркер. В условии введения липоевой кислоты или комбинации ремаксола с витамином Е или С наблюдались увеличенные значения уровня тиоловых групп в плазме крови – на 13–19 % относительно группы сравнения. Сочетание ремаксола с липоевой кислотой обеспечивало еще более высокий уровень плазменного содержания SH-групп, который был увеличен на 29 % относительно группы сравнения. Максимальные значения показателя содержания тиоловых групп в плазме крови в условии моделирования ИРП печени были получены на фоне комбинированного preconditionирования с использованием ремаксола и 2 (аскорбиновая и липоевая кислоты) или 3 (витамины С и Е, липоевая кислота) витаминов-антиоксидантов. В условиях такого preconditionирования уровень SH-групп поддерживался в пределах значений, характерных для контрольной группы животных.

Анализ накопления продуктов липопероксидации в эритроцитарной взвеси по данным ТБК-реактивных продуктов также продемонстрировал эффективность стратегии комбинированной антиоксидантной терапии (рисунок 4.3). Так в условии моделирования ИРП печени без проведения метаболической коррекции содержание ТБК-реактивных продуктов было увеличено в эритроцитах в 4,4 раза. Монотерапия с использованием ремаксола или одного из витаминов-антиоксидантов сопровождалась менее выраженным нарастанием концентрации продуктов оксидативных модификаций биомолекул, которая достигала значений, превышающих контрольные в 3,4–3,8 раза. Введение аскорбиновой кислоты или альфа-токоферола совместно с ремаксолом сопровождалось увеличенным уровнем анализируемого лабораторного показателя в 2,9 раза. В условии комбинации ремаксола с липоевой кислотой были достигнуты наиболее низкие значения концентрации ТБК-реактивных продуктов, которые превышали контрольные цифры только в 1,6–1,9 раза.

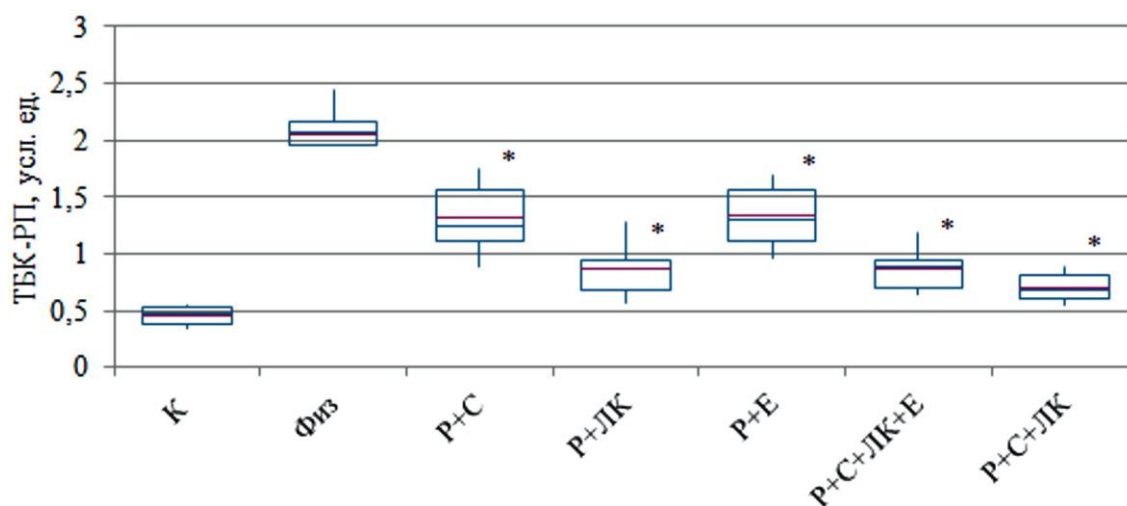


Рисунок 4.3 – Влияние комбинированной антиоксидантной терапии на концентрацию продуктов липопероксидации в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы (Физ). Сокращения: К – контрольная группа; Физ – группа животных, которым вводили физиологический раствор; Р – ремаксол; С – аскорбиновая кислота; ЛК – липоевая кислота; Е – токоферола ацетат

Отдельно был выполнен анализ влияния preconditionирования на состояние окислительного гомеостаза в ткани печени крыс (таблица 4.2). Было проанализировано preconditionирование с использованием аскорбиновой и липоевой кислот, которое, как было указано выше, продемонстрировало лучшие эффекты на системном уровне – в крови. В результате проведенных исследований было установлено, что концентрация восстановленного глутатиона на фоне частичного ИРП печени снижена в ишемизированной доле на 47 % в сравнении с интактными (неишемизированными) долями органа. В условии антиоксидантного preconditionирования концентрация восстановленного глутатиона в интактной доле несколько ниже, чем в группе сравнения, однако не наблюдается такого выраженного дисбаланса между поврежденными и неповрежденными участками печени. В данном случае содержание анализируемого метаболита в ишемизированной доле печени ниже, чем в группе сравнения только на 17 %. Менее выраженный дисбаланс в условии применения антиоксидантных средств был отмечен и при анализе содержания окисленной формы глутатиона в гомогенате печени. В группе сравнения концентрация окисленного глутатиона в ишемизированной доле в 5,1 раза была выше, чем в интактной. Аналогичное соотношение для опытной группы составило 1,9 раз.

Таблица 4.2 – Влияние антиоксидантного preconditionирования на баланс прооксидантно-антиоксидантной системы печени в условиях ишемии-реперфузии (Me (Q₁/Q₃))

Исследуемые показатели	Экспериментальная модель: 40мин частичная ишемия + 180мин реперфузия			
	Используемые антиоксиданты (введение за сутки до и непосредственно перед экспериментом):			
	Физиологический раствор 2 мл (группа сравнения)		Ремаксол 2 мл + 20 мг аскорбиновой кислоты + 20 мг липоевой кислоты	
	Доли печени			
	интактная	ишемизированная	интактная	ишемизированная
GSH, мкмоль/мг белка	2,13 (1,94/2,32)	1,12^ (0,88/1,34)	1,89 (1,75/2,18)	1,56*^ (1,29/1,80)
GSSG, мкмоль/мг белка	0,10 (0,08/0,14)	0,51^ (0,42/0,60)	0,20* (0,16/0,23)	0,38*^ (0,32/0,43)
ТБК-ПП, усл. ед.	3,09 (2,88/3,40)	3,35 (3,05/3,54)	2,04* (1,91/2,32)	1,88* (1,70/2,03)
AOA-FRAP, ммоль/мг белка	0,56 (0,50/0,61)	0,60 (0,54/0,65)	0,67 (0,58/0,74)	0,65 (0,59/0,70)
AOA-ABTS, ммоль/мг белка	0,63 (0,57/0,70)	1,35^ (1,18/1,50)	0,75* (0,70/0,79)	1,34^ (1,23/1,48)
8-OHdG, нг/г белка	12,8 (10,8/14,5)	18,9^ (17,7/20,3)	8,9* (8,3/10,0)	12,5*^ (11,7/13,5)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением показателя группы сравнения, [^] – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при внутригрупповом сравнении показателей интактной и ишемизированной долей.

Анализ железо-восстанавливающей способности в гомогенате печени не продемонстрировал каких-либо различий между группами и участками паренхимы печени (таблица 4.2). Однако определение общей антиоксидантной активности в ABTS-методе продемонстрировало тенденцию к росту данного параметра в условиях ИРП печени именно в ишемизированных долях органа. В группе сравнения соотношение антирадикальной активности в поврежденной и интактной долях составило 2,1, а в опытной группе – 1,8.

Определение маркеров свободнорадикальных повреждений биомолекул в гомогенате печени показало значительное преимущество антиоксидантного preconditionирования (таблица 4.2). Так не было выявлено разницы между

содержанием ТБК-реактивных продуктов в интактных и ишемизированных долях обеих групп, однако общее значение данного лабораторного показателя в опытной группе было ниже – на 34 % в интактной доле и на 44 % в постишемическом участке органа относительно значений соответствующих показателей животных группы сравнения. Анализ изменений концентрации маркера повреждений нуклеотидов – 8-OHdG показал наличие схожей тенденции, но дополнительно были установлены различия между уровнями данного показателя в отдельных долях печени. В условии использования модифицированного путем введения аскорбиновой и липоевой кислот ремаксоло было определено сниженное содержание 8-OHdG в интактной доле – на 30 %, в постишемической доле – на 34 % относительно группы сравнения. Сравнение соотношения анализируемого показателя в ишемизированной и интактной долях показало увеличенный его уровень в условии поврежденной паренхимы органа на 40–48 %.

4.2 Влияние модификации активности пируватдегидрогеназы на развитие ишемически-реперфузионного повреждения печени

Для оценки возможности прекондиционирования ИРП печени путем модификации активности пируватдегидрогеназы были использованы такие средства как ДХА (активатор), липоевая кислота и кокарбоксилаза (коферменты ПДК), а также наиболее рациональные их сочетания. Эффективность защиты паренхимы печени от повреждающих факторов сосудистой изоляции оценивали по выбросу аминотрансфераз – ферментов-маркеров цитолиза гепатоцитов в системном кровотоке.

В результате проведенных исследований было показано защитное действие ДХА натрия, которое сопровождалось сниженными относительно группы сравнения значениями активности АЛТ и АСТ в плазме крови в 2,0–2,1 раза. Липоевая кислота или кокарбоксилаза в условии эксперимента самостоятельно не

оказывали цитопротективного действия. Комбинации ДХА с коферментами ПДК сопровождалась частичным нивелированием защитного действия активатора пируватдегидрогеназы. Так при условии сочетания ДХА и липоевой кислоты активность аминотрансфераз в плазме крови была ниже чем в группе сравнения всего на 16–23 %. Совместное введение активатора ПДГ и кокарбоксилазы сопровождалось более низкими значениями активности маркеров цитолитического синдрома – на 31–36 % ниже аналогичных показателей в группе сравнения (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Влияние метаболических цитопротекторов на выраженность цитолитического синдрома при экспериментальном моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени (Me (Q₁/Q₃))

Группы	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л
1 (контроль)	38,9 (35,3/40,3)*	37,4 (34,3/39,5)*
2 (сравнения)	669,0 (640,5/775,7)	718,0 (698,1/729,3)
3 (ДХА)	338,5 (321,1/374,4)*	348,4 (336,3/357,8)*
4 (ЛК)	635,0 (583,4/675,4)	655,7 (602,5/712,2)
5 (КК)	674,3 (637,5/734,8)	689,3 (627,8/737,4)
6 (ДХА+ЛК)	564,4 (496,7/635,0)*	553,2 (501,4/602,0)*
7 (ДХА+КК)	464,7 (389,3/515,6)*	457,3 (395,5/488,6)*

Примечания: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы. Сокращения: ДХА – дихлорацетат натрия, ЛК – липоевая кислота, КК – кокарбоксилаза.

Оценка прооксидантно-антиоксидантного баланса у крыс изученных групп показала выраженное влияние липоевой кислоты, которое выражалось в поддержании в крови более высокого уровня антиоксидантной активности и концентрации глутатиона – на 69 % и 11 % соответственно выше значений показателей группы сравнения. Накопление ТБК-реактивных продуктов напротив было снижено на 19 % также относительно 2-й группы лабораторных животных. Влияние ДХА заключалось в снижении содержания продуктов липопероксидации на 28 % относительно группы сравнения, при этом прямой поддержки антиоксидантной системы зафиксировано не было. Кокарбоксилаза каких-либо

статистически значимых эффектов на анализируемые маркеры не оказывала. Сочетание ДХА с липоевой кислотой или кокарбоксилазой характеризовалось получением усредненных данных, представленных при анализе монотерапии (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Влияние метаболических цитопротекторов на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при экспериментальном моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени (Ме (Q₁/Q₃))

Группы	ОАОА-FRAP, мМ вит С	ТБК-РП, усл. ед.	Глутатион, мкмоль/мл
1 (контроль)	0,44 (0,39/0,47)*	0,44 (0,38/0,48)*	2,46 (2,42/2,51)*
2 (сравнения)	0,32 (0,27/0,34)	1,04 (0,90/1,09)	2,02 (1,87/2,08)
3 (ДХА)	0,35 (0,30/0,37)	0,75 (0,66/0,84)*	2,14 (2,04/2,25)
4 (ЛК)	0,54 (0,49/0,58)*	0,84 (0,67/0,88)*	2,24 (2,11/2,30)*
5 (КК)	0,31 (0,28/0,34)	1,08 (0,96/1,13)	1,98 (1,86/2,07)
6 (ДХА+ЛК)	0,47 (0,42/0,53)*	0,84 (0,77/0,90)*	2,20 (2,08/2,27)*
7 (ДХА+КК)	0,33 (0,28/0,36)	0,82 (0,74/0,86)*	2,05 (1,93/2,14)

Примечания: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы. Сокращения: ДХА – дихлорацетат натрия, ЛК – липоевая кислота, КК – кокарбоксилаза.

С учетом данных, представленных в разделе 4.1 и разделе 4.2 выше отдельный интерес представляет анализ возможности модификации ремаксоло за счет регуляторов ПДК (таблица 4.4). Анализ выраженности цитолитического синдрома в этих условиях показал, что введение ДХА не способно дополнительно усилить гепатопротекторное действие ремаксоло. Ведение ремаксоло совместно с ДХА натрия и аскорбиновой кислотой теряет свою протективную эффективность. Комбинированная терапия с использованием ДХА натрия и кофакторов ПДК (липоевая кислота, тиаминдифосфат) также не обладает защитным действием на модели ИРП печени, несмотря на эффективность отдельного введения липоевой кислоты или ДХА натрия.

В плазме крови лабораторных животных этих же 6 групп был проведен анализ изменений концентрации лактата. Было установлено, что в условии моделирования ИРП печени после введения физиологического раствора крысам

Таблица 4.5 – Влияние комбинированного энерготропного preconditionирования на выраженность цитолитического синдрома при экспериментальном моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени (Me (Q₁/Q₃))

Исследуемые группы	Исследуемые показатели		
	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЛДГ, ед/л
1 (контроль)	27,8 (18,0/32,5)*	30,4 (25,5/34,2)*	120,2 (94,2/155,0)*
2 (физ р-р)	893,8 (822,5/959,0)	970 (910,1/1132,0)	1846,2 (1637,3/2112,5)
3 (ремаксол)	645,0 (588,5/696,5)*	684,2 (576,3/754,2)*	1562,6 (1305,2/1721,0)
4 (ремаксол+ДХА)	668 (605/708)*	692 (624/740)*	1554 (1490/1635)*
5 (ремаксол+ДХА+аск к-та)	1035 (916/1085)*	1150 (1005/1241)*	2234 (2056/2360)*
6 (пируват+ЛК+ТДФ+ДХА)	934 (865/981)*	1041 (925/1088)*	1915 (1765/1988)*

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы.

группы сравнения уровень молочной кислоты крови увеличивается относительно контроля в 2,3 раза, достигая величин 4,6 (4,1/5,0) ммоль/л. В условии preconditionирования ремаксолом наблюдаются аналогичные изменения содержания лактата в плазме крови. Введение активатора ПДК – ДХА натрия в любой из комбинаций обеспечивало поддержание низкого уровня молочной кислоты в крови, соответствующего значению контрольного показателя (2,0 (1,9/2,2) ммоль/л).

4.3 Исследование возможности прооксидантного кондиционирования

Для оценки принципиальной возможности использования прооксидантных факторов (окислителей) для защиты печени от ИРП в экспериментальных моделях было протестировано влияние трет-бутил гидропероксида, пероксида водорода и аскорбиновой кислоты на развитие цитолитического синдрома. Дизайн исследования описан в разделе 2.1.5.3. главы «Материалы и методы».

Анализ внутрибрюшинного введения трет-бутил-гидропероксида перед моделированием частичного ИРП печени (40 минут сосудистой изоляции и 180

минут реперфузии) показал возможность снижения проявлений цитолиза гепатоцитов при использовании 1 мл 0,5 % раствора (таблица 4.6). В этом случае удавалось получить значения активности аминотрансфераз в плазме крови, сниженные в 2,6–3,5 раз относительно группы сравнения, крысам которой вводили физиологический раствор вместо окислителя. Активность ЛДГ в этих же условиях была снижена в 4,5 раза.

Таблица 4.6 – Влияние preconditionирования гидропероксидом трет-бутила на цитолиз гепатоцитов в условии ишемически-реперфузионного повреждения печени (Me (Q₁/Q₃))

Группы	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЛДГ, ед/л
1 (контроль)	35,5 (30,5/39,8)*	35,4 (31,3/39,8)*	158,5 (133,3/167,3)*
2 (сравнения)	357,5 (320,5/399,4)	401,7 (350,4/447,7)	1430,0 (1248,5/1620,6)
3 (ГПТБ 0,1 %)	395,0 (366,0/444,0)	340,0 (299,5/362,0)	1354,0 (1172,0/1554,7)
4 (ГПТБ 0,5 %)	101,0 (91,3/122,8)*	155,5 (141,7/175,0)*	315,2 (279,4/344,5)*
5 (ГПТБ 1 %)	455,0 (375,4/496,3)	377,0 (353,0/396,0)	1567,4 (1281,4/1791,2)
6 (АК)	289,5 (266,5/303,8)*	233,0 (206,5/259,0)*	989,8 (901,4/1068,0)*
7 (ГПТБ 0,5 % + АК)	400,0 (361,3/440,0)	305,1 (273,4/350,5)	1342,4 (1134,0/1427,8)

Примечания: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы. Сокращения: ГПТБ – гидропероксид трет-бутила, АК – аскорбиновая кислота.

Введение 0,1 % раствор гидроперекиси трет-бутила не оказывало какого-то влияния на моделируемый патологический процесс и характеризовалось аналогичными группе сравнения значениями ферментов-маркеров цитолиза гепатоцитов (таблица 4.6). Увеличение дозировки в условии введения 0,5 % раствора окислителя сопровождалось, как и предполагалось в нашей гипотезе, снижением выраженности цитолиза гепатоцитов. Это проявлялось сниженными относительно группы сравнения значениями активности аминотрансфераз в 2,6–3,5 раза, ЛДГ – в 4,5 раза. Дальнейшее увеличение дозировки прооксиданта при введении в виде 1 % раствора характеризовалось негативными тенденциями к росту маркеров цитолиза гепатоцитов в ряде ситуаций, превышающему уровень группы сравнения. Вероятно, такие агрессивные соединения, фармакологические эффекты которых основаны на низкоинтенсивном стрессовом воздействии в

низких концентрациях, имеют очень узкий терапевтический диапазон. Для сравнения эффектов прооксидантного и антиоксидантного прекондиционирования использовали аскорбиновую кислоту, которая продемонстрировала небольшое цитопротективное действие в условии моделирования ИРП печени у крыс. Защитное действие аскорбиновой кислоты выражалось в сниженных значениях активности АЛТ и АСТ на 24–73 %, ЛДГ – на 45 % относительно соответствующих показателей животных группы сравнения. Менее выраженный эффект скорее всего определен неоптимальными условиями введения и подбора дозировки, однако, нашей целью было подтверждение возможности такого действия для последующего анализа совместного использования двух обсуждаемых противоположно направленных факторов (ГПТБ и витамин С). Для исключения химического антагонизма на этапе введения и распределения веществ в организме было реализовано временное разделение введения 0,5 % раствора ГПТБ и раствора аскорбиновой кислоты с концентрацией 10 мг/мл. В результате были получены данные о полном нивелировании защитного действия прооксидантного или антиоксидантного прекондиционирования ИРП печени, что косвенно подтверждает заявленные механизмы действия обоих факторов, в особенности ГПТБ.

Использование для прооксидантного прекондиционирования пероксида водорода не оправдало надежд, связанных с оценкой возможности использования менее токсичного препарата, который имел бы потенциал внедрения в клиническую практику. Использовали 1 %, 2 % и 3 % растворы перекиси водорода, которые вводили внутрибрюшинно за 3 часа или за сутки до моделирования ИРП печени. Ни в одном из анализируемых случаев не удалось добиться статистически значимо более низкого уровня ферментов-маркеров цитолитического синдрома, чем в группе сравнения, животным которой вводили физиологический раствор.

С учетом основной направленности метаболического действия изученных факторов (ГПТБ и аскорбиновая кислота) представлен анализ изменений общей антиоксидантной активности плазмы крови (рисунок 4.4). В условии

моделирования ИРП печени крыс закономерно наблюдалось снижение железо-восстанавливающей способности плазмы крови, предварительное введение прооксидантного фактора способствовало еще более выраженному прогрессирующему снижению рассматриваемого показателя с увеличением дозировки ГПТБ. В условии прекондиционирования 0,1 % раствором ГПТБ антиоксидантная активность плазмы крови после эксперимента была снижена на 20 % относительно контроля. Увеличение концентрации раствора ГПТБ до 0,5 % сопровождалось сниженным значением железо-восстанавливающей способности на 23 % относительно группы сравнения. В условии введения 1 % раствора прооксиданта анализируемый лабораторный показатель был снижен на 28 % относительно группы сравнения. Введение аскорбиновой кислоты ожидаемо обеспечивало поддержание высокого уровня антиоксидантной активности плазмы крови, которая после моделирования ИРП даже превышала контрольные значения на 34 %. Комбинированное прекондиционирование характеризовалось значением железо-восстанавливающей активности плазмы крови в пределах контрольного уровня после выполнения эксперимента.

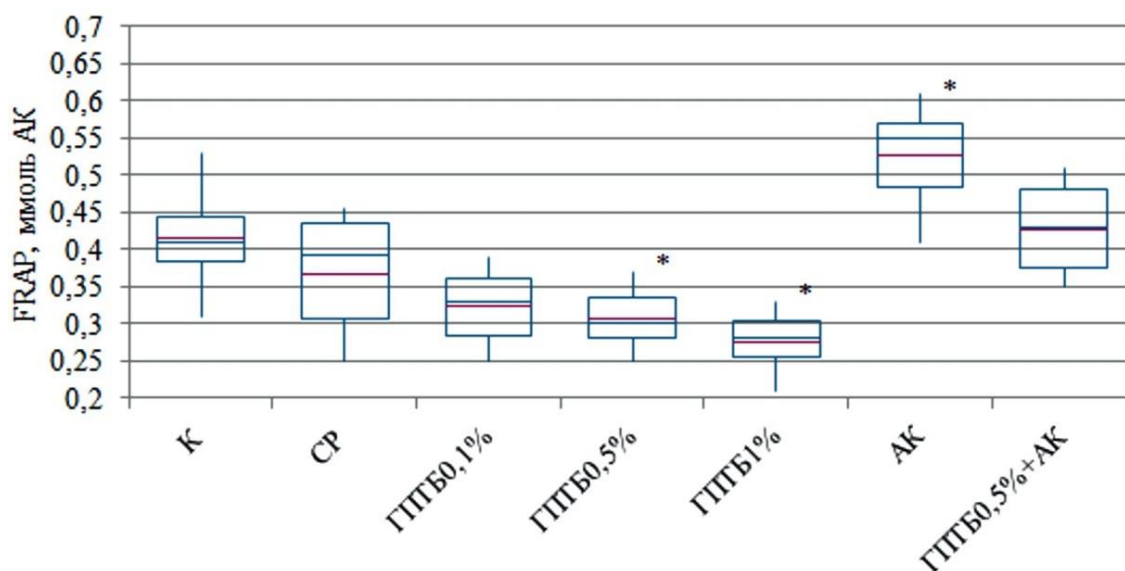


Рисунок 4.4 – Влияние прооксидантного прекондиционирования на изменения общей антиоксидантной активности плазмы крови в условии экспериментального моделирования ишемии-реперфузии печени (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия от показателя группы сравнения (CP). Сокращения: ГПТБ – гидропероксид трет-бутила; АК – аскорбиновая кислота

Важной характеристикой метаболических систем лабораторных животных в условии моделирования ИРП печени и выполнения приемов про- и антиоксидантного прекондиционирования является образование и накопление продуктов липопероксидации (рисунок 4.5). Определение содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси животных экспериментальных групп показало практически полностью противоположные изменения антиоксидантной активности результаты. В условии моделирования ИРП без коррекции или при условии введения 0,1 % раствора ГПТБ наблюдался рост концентрации на 69–87 % относительно контрольной группы. Введение окислителя в этих условиях не способствовало дальнейшей интенсификации свободнорадикальных процессов.

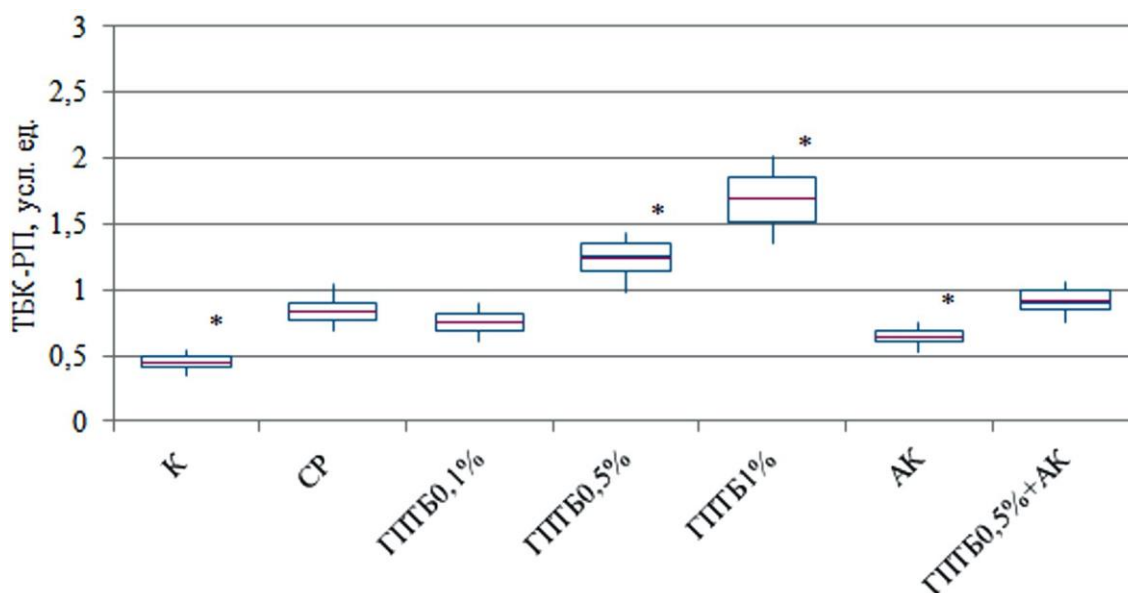


Рисунок 4.5 – Влияние прооксидантного прекондиционирования на изменения интенсивности накопления продуктов липопероксидации в крови в условии экспериментального моделирования ишемии-реперфузии печени (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия от показателя группы сравнения (СР). Сокращения: ГПТБ – гидропероксид трет-бутила; АК – аскорбиновая кислота

Увеличение концентрации вводимого раствора ГПТБ до 0,5 % характеризовалось значительным ростом уровня продуктов липопероксидации в крови – в 2,8 раза выше контрольного значения, полученного у ложнооперированных животных. Аналогичный показатель в крови крыс, которым

вводили 1 % раствор ГПТБ, был увеличен в 3,8 раза в сравнении с контрольной группой. Использование аскорбиновой кислоты способствовало некоторому сдерживанию образования продуктов перекисного окисления липидов, концентрация которых в крови была увеличена только на 42 % относительно контроля. Комбинированное введение ГПТБ и аскорбиновой кислоты характеризовалось нивелированием эффектов друг друга и поддержанием уровня ТБК-реактивных продуктов эритроцитарной взвеси в пределах значений, характерных для животных группы сравнения.

4.4 Исследование возможности хелатотерапии ишемически-реперфузионного повреждения печени

Исследование возможностей хелатотерапии также было связано с потенциальными антиоксидантными эффектами соединений, способных связывать ионы металлов с переменной валентностью и ингибировать индуцированные ими свободнорадикальные процессы. Схема исследования описана в разделе 2.1.5.4 главы «Материалы и методы». Цитопротективную активность препаратов оценивали по способности снижать выраженность цитолитического синдрома после моделирования ИРП печени (таблица 4.7). В результате исследований было установлено, что введение 1 мл 0,2 % раствора неселективного хелатора ЭДТА сопровождается сниженными относительно группы сравнения значениями активности аминотрансфераз на 34–47 %, ЛДГ – на 29 %. Дальнейшее увеличение концентрации ЭДТА не приводит к росту цитопротективной активности препарата, сказывается способность связывать физиологически необходимые ионы кальция и магния. Введение 0,8 % и более концентрированного раствора ЭДТА быстро приводит к летальному исходу.

Селективный хелатор ионов железа – дефероксамин был способен обеспечить еще более высокий уровень защиты печени и соответственно низкий

уровень выброса клеточных ферментов в плазму крови после моделирования ИРП (таблица 4.7). В условии прекондиционирования дефероксамином активность АЛТ была снижена в 2,1 раза, АСТ – в 2,6 раза, ЛДГ – в 2,3 раза относительно соответствующих значений показателей крыс группы сравнения. В этих же условиях был проведен анализ изменений окислительного гомеостаза в крови, который подтвердил выраженное антиоксидантное действие селективной хелатотерапии (таблица 4.8).

Таблица 4.7 – Влияние хелатотерапии на выраженность цитолитического синдрома при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс (Ме (Q₁/Q₃))

Группы	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЛДГ, ед/л
1 (физ р-р)	739 (562/1258)	841,5 (532/1589)	1521 (1011/3367)
2 (ЭДТА 0,2 %)	486 (390/558)*	445 (367/501)*	1074 (854/1125)*
3 (ЭДТА 0,4 %)	591 (476/712)	740 (548/795)	1319 (938/1527)
4 (дефероксамин)	344 (255/404)*	318 (260/378)*	655 (494/802)*

Примечание: * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия при сравнении с данными 1-й группы.

Таблица 4.8 – Влияние хелатотерапии на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс (Ме (Q₁/Q₃))

Группы	ОАОА-FRAP, мМ вит С	ТБК-РП, усл. ед.	Глутатион, мкмоль/мл	Каталаза, моль/(л*мин)
1 (физ р-р)	0,37 (0,30/0,49)	0,98 (0,88/1,07)	2,07 (1,87/2,11)	23,6 (14,1/24,1)
2 (ЭДТА 0,2 %)	0,31 (0,26/0,34)	0,70* (0,63/0,80)	1,88 (1,69/2,02)	26,6* (22,8/28,2)
3 (ЭДТА 0,4 %)	0,28* (0,25/0,32)	0,78 (0,70/0,91)	1,95 (1,87/2,06)	21,4 (18,3/23,7)
4 (дефероксамин)	0,40 (0,36/0,44)	0,55* (0,49/0,60)	2,18* (2,09/2,30)	27,0* (24,5/30,1)

Примечание: * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия при сравнении с данными 1-й группы.

Оценка изменений общей антиоксидантной активности показала практически полное отсутствие влияния хелатотерапии, что объяснимо

косвенным механизмом влияния препаратов на окислительный метаболизм в условиях низкой их восстановительной способности (таблица 4.8). Тем не менее ингибирование свободнорадикальных процессов в условиях введения хелаторов подтверждалось более низкой концентрацией ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси животных. Относительно группы сравнения, крысам которой вводили физиологический раствор, на фоне введения 0,2 % раствора ЭДТА уровень продуктов липопероксидации в крови был снижен на 29 %, а в условиях введения дефероксамина – на 44 %. В крови этих же групп лабораторных животных (которым вводили 0,2 % раствор ЭДТА или дефероксамин) поддерживалась более высокая активность каталазы – на 13–14 % выше показателя группы сравнения. В условиях прекондиционирования дефероксамином также обеспечивалось поддержание более высокой концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитарной взвеси.

4.5 Обсуждение

Основной задачей исследования было совершенствование методов фармакологического прекондиционирования ИРП печени в эксперименте. В качестве одного из перспективных направлений такой коррекции рассматривают энерготропную терапию, основанную на использовании антиоксидантов, субстратов, коферментов и регуляторов энергетического обмена. Комбинированное использование инфузионных препаратов на основе таких веществ имеет перспективу использования в клинической практике, что дополнительно актуализирует необходимость проведения поисковых работ. В качестве примера, который был в том числе принят нами за стандарт, можно рассмотреть Ремаксол (НТТФ Полисан, Россия). Этот препарат сравнительно давно зарегистрирован и демонстрирует неплохую активность в качестве гепатопротекторного средства [3]. Тем не менее потенциал модификации данного

препарата не исчерпан, поэтому нами были попытки комбинировать его применение с рядом антиоксидантов прямого действия.

В результате оценки цитопротективной активности комбинированного энерготропного прекондиционирования ИРП печени было подтверждено синергетическое действие компонентов ремаксоло с 1) липоевой кислотой; 2) липоевой и аскорбиновой кислотами; 3) α -токоферолом, липоевой и аскорбиновой кислотами. В крови животных этих групп были определены наиболее низкие значения активности ферментов-маркеров цитолиза гепатоцитов (АЛТ, АСТ и ЛДГ). Данные получены в сравнении с самостоятельным использованием (монотерапия) одного из компонентов комбинированной схемы кондиционирования. Таким образом, ключевая гипотеза о более высокой эффективности использования ремаксоло с антиоксидантами прямого механизма действия была подтверждена. Интересным наблюдением является увеличение эффективности защиты печени при совместном использовании липоевой и аскорбиновой кислот, при отсутствии дополнительного усиления витамином Е. Предполагалось, что сочетание гидрофильного и липофильного антиоксидантов будет иметь наиболее выраженное действие, кроме того, жирорастворимые вещества обычно активнее накапливаются в печени. Тем не менее считается, что тиоктовая кислота также обладает липотропными свойствами и является эффективным препаратом для лечения печеночной комы и гепатита [231]. Давно известно, что введение липоевой кислоты в условия экспериментального недостатка витаминов Е или С способно значительно облегчать состояние животных, что свидетельствует о возможности частичной замены этих витаминов [1]. Механизмом синергетического механизма липоевой кислоты с другими используемыми компонентами вероятнее всего является мощная восстановительная способность SH-групп, способных не только самостоятельно нейтрализовать радикалы, но и регенерировать другие компоненты системы антиоксидантной защиты, такие как витамин С. Усиление цитопротективного эффекта при комбинации витамина С и тиоктовой кислоты в настоящем исследовании впервые описано в условиях экспериментального моделирования

острого повреждения печени. Однако ранее эффективность такой схемы терапии было описано для ряда других ситуаций. Показано, что добавление α -липоевой кислоты усиливает индукцию биосинтеза глутатиона в клетках кожи при введении цистеина, аскорбиновой кислоты и пиридоксина [171]. Введение α -липоевой кислоты и витамина С способны эффективно снизить гепатотоксичность метотрексата [77]. Гепатопротекторные свойства сочетанного использования силимарина, α -липоевой кислоты и витамина С были изучены на модели ацетоминофенового поражения печени [98]. Усиленный эффект комбинированного введения препаратов также был отмечен авторами, которые использовали антиоксидантную терапию для восстановления нормальной функции гепатоцитов [55, 229].

Различные авторы отмечают, что комбинированная антиоксидантная терапия приводит к нормализации окислительного гомеостаза – снижению уровня продуктов окислительных модификаций и восстановлению нормального функционального состояния системы антиоксидантной защиты. Аналогичные по направлению результаты были получены и нами при исследовании фармакологического preconditionирования ИРП печени с использованием витамина С, аскорбиновой кислоты и ремаксолола. При этом обращает внимание сравнительная легкость поддержания высокого уровня общей антиоксидантной активности плазмы крови в условии применения практически любого из антиоксидантов, в том числе в виде монотерапии, что, однако, плохо соответствует выявленной цитопротективной активности. Это указывает на то, что самого по себе антиоксидантного действия недостаточно для защиты печени от повреждающих факторов ишемии-реперфузии. Аналогичным образом отмечено влияние антиоксидантов на концентрацию глутатиона в эритроцитах, однако анализ концентрации ТБК-реактивных продуктов в крови позволил установить преимущественное влияние комбинированного preconditionирования, включающего использование липоевой кислоты. Такие данные указывают на способность SH-содержащего антиоксиданта оказывать более глубокое влияние на окислительный метаболизм, проявляющееся не только в увеличении восстановительной активности плазмы крови, но и в реальном

ингибировании свободнорадикальных процессов на системном уровне. В исследованиях [36] показано, что использование антиоксидантов (α -липоевая кислота, витамины С и Е) обладает противовоспалительным действием, опосредованным через экспрессию IL-15, который в свою очередь стимулирует митохондриальный биогенез, окисление жиров и поглощение глюкозы. Имеются данные, позволяющие предполагать, что именно α -липоевая кислота в наших комплексных схемах терапии ответственна за противовоспалительное действие [134]. Показано, что данный тиолсодержащий препарат способен усиливать эффект нестероидных противовоспалительных препаратов, а также снижать вероятность развития неблагоприятных осложнений, связанных с повреждениями желудка [31].

Анализ изменений окислительного метаболизма в паренхиме печени в условии энерготропного прекондиционирования и экспериментального моделирования ИРП показал наличие специфического эффекта, заключающегося не в снижении интенсивности окислительного стресса в ишемизированной доли органа, а скорее в выравнивании последствий патологического процесса в интактной и поврежденной долях. Так для группы сравнения (физиологический раствор в качестве средства для кондиционирования) соотношение восстановленного глутатиона между интактной и ишемизированной долями составляло 1,9. Для опытной группы животных, которым вводили ремаксол, витамин С и липоевую кислоту, аналогичный коэффициент составлял 1,2. Такая же тенденция характерна для окисленной формы глутатиона. Концентрация молекул-маркеров окислительных повреждений биомолекул была снижена в опытной группе в обеих долях примерно в равной степени относительно значений соответствующих показателей группы сравнения. Полученные данные подтверждают общепринятые представления о том, что ключевые изменения при ИРП происходят после восстановления кровотока, поэтому наблюдается активное вовлечение в патологический процесс интактных долей печени. Это обуславливает целесообразность не только прекондиционирования, но и возможность введения цитопротекторов на любой стадии развития синдрома ишемии-реперфузии, в том числе в условии посткондиционирования.

Таким образом, наиболее целесообразным при проведении энерготропного прекондиционирования ИРП печени является усиление ремаксола аскорбиновой кислотой с дополнительной поддержкой за счет липоевой кислоты. Мы считаем, что перспективным является также поиск других эффективных комбинаций средств, обеспечивающих нормализацию энергетического обмена.

Другой перспективной возможностью повышения эффективности фармакологического прекондиционирования ИРП является воздействие на пируватдегидрогеназный комплекс. Ввиду ключевого участия этого мультиферментного комплекса в регуляции перехода от анаэробных к аэробным процессам такие воздействия целесообразно также рассматривать как энерготропное прекондиционирование. В данном случае в эксперименте использовали активатор ПДК – ДХА натрия и коферменты ПДК – тиаминпирофосфат и липоевую кислоту, которая хорошо себя зарекомендовала ранее. Оценка цитопротективной активности препаратов-модификаторов ПДК показала наличие таковой только у ДХА натрия. Для монотерапии липоевой кислотой была характерна слабовыраженная способность снижения уровня цитолиза гепатоцитов в эксперименте с моделированием частичной ИРП печени. Комбинированная терапия с использованием ДХА натрия и липоевой кислоты не только не оказывала дополнительного защитного эффекта на печень, но и вовсе теряла свою цитопротективную активность. Поэтому дальнейшее внимание было обращено на анализ возможных механизмов такого антагонистического эффекта.

Мы выделили несколько основных гипотез, потенциально способных объяснить цитопротективную активность ДХА натрия в условиях ИРП печени:

- 1) снижение уровня лактатацидоза;
- 2) реактивация ПДК в реперфузионный период;
- 3) имитация ишемического прекондиционирования опосредованная интенсификацией образования активных форм кислорода в ишемический период.

1-я гипотеза о влиянии ДХА натрия на уровень лактатацидоза не прошла проверку, так как несмотря на низкую концентрацию молочной кислоты в условиях введения ДХА совместно с ремаксолом, аскорбиновой кислотой и кофакторами ПДК, уровень цитолиза гепатоцитов (таблица 4.5) был таким же

высоким, как в группе сравнения. Таким образом, уровень лактатацидоза не коррелировал со степенью повреждения печени после ишемии-реперфузии.

2-я гипотеза основана на эффекте снижения активности ПДК при переходе от ишемической фазы к реперфузионной, что описано в 3 главе. Этот эффект затрудняет переход к аэробным процессам при восстановлении кровотока и может быть причиной реперфузионных повреждений органа.

В результате определения активности пируватдегидрогеназы в условии preconditionирования ДХА натрия было установлено увеличение анализируемого параметра как в ишемическом, так и в реперфузионном периоде в равной степени (рисунок 4.6). Таким образом было показано, что ДХА натрия способен нивелировать эффект резкого парадоксального снижения активности ПДК при восстановлении кровотока после ИРП печени. Однако использование ДХА совместно с ремаксолом, аскорбиновой кислотой или кофакторами энергообмена также сопровождалось высоким уровнем функционального состояния ПДК. Этот факт не соответствовал наблюдаемому при этом высокому уровню выраженности цитолиза гепатоцитов и устранению защитного действия используемых метаболических цитопротекторов.

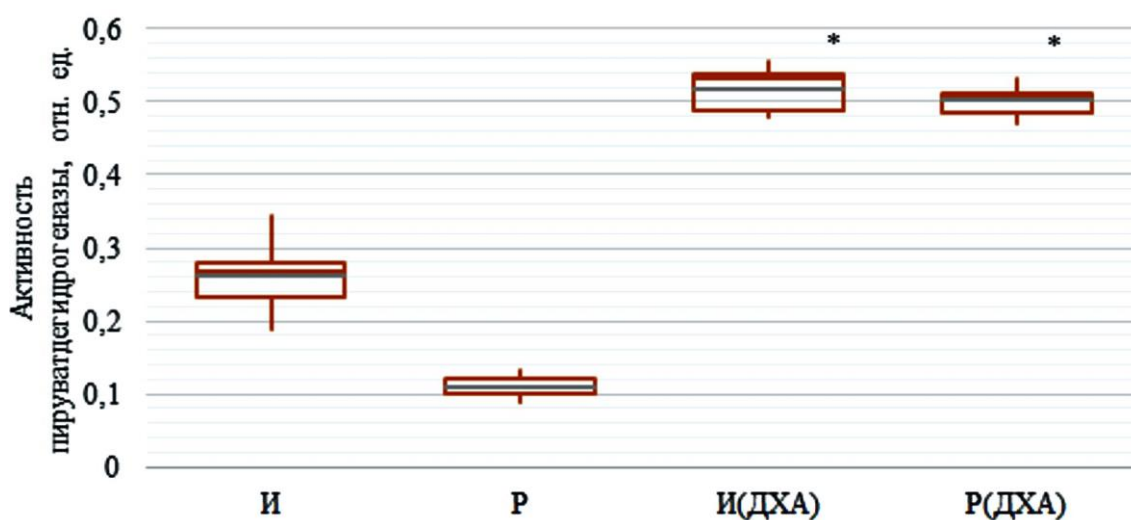


Рисунок 4.6 – Влияние дихлорацетата натрия на активность пируватдегидрогеназы в ишемический и реперфузионный периоды: * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия при сравнении со значением показателя группы сравнения (без дихлорацетата натрия).

Сокращения: И – ишемический период; Р – реперфузионный период; ДХА – в условии preconditionирования дихлорацетатом натрия

Последнюю гипотезу мы считаем наиболее состоятельной. На моделях злокачественных новообразований и опухолевых клетках показано, что введение ДХА способствует интенсификации свободнорадикальных процессов. Образующиеся при этом АФК убивают клетки, а ДХА соответственно рассматривается в качестве потенциального терапевтического агента. Основным механизмом генерации АФК в этих условиях является инверсия опухолевого метаболизма, адаптированного для анаэробных условий, с активацией аэробных процессов. Высокая активность ПДК обеспечивает поставку НАДН в дыхательную цепь. Гипервосстановленность компонентов цепи переноса электронов в условиях их ингибирования и считается основной причиной генерации свободных радикалов, индуцированной ДХА. При моделировании ИРП и введении ДХА натрия условия во многом воспроизводят вышеописанную последовательность событий, что может свидетельствовать о прооксидантном действии активатора ПДК. Мягкое (низкоинтенсивное) прооксидантное действие ДХА в период, предшествующий ишемии печени, может вызывать окислительный стресс, адаптирующий систему антиоксидантной защиты к последующему более интенсивному повреждающему действию ИРП.

В качестве фактов, подтверждающих вышеописанную гипотезу можно привести эффекты нивелирования защитного действия ДХА при сочетании его с антиоксидантами (аскорбиновой и липоевой кислотами). Дополнительно нами была проведена серия экспериментов, доказывающая прооксидантное действие ДХА натрия.

В суспензии гепатоцитов, выделенных из интактной печени, в серии экспериментов ($n = 10$) при условии инкубирования с дихлорацетатом натрия была определена статистически значимо увеличенная на 13 % флуоресценция зонда H_2DCF (рисунок 4.7). H_2DCF является известным редокс-зависимым флуоресцентным зондом, интенсивность свечения которого прямо пропорциональна уровню генерации АФК в клетках, что в нашем случае непосредственно указывает на способность ДХА натрия индуцировать свободнорадикальные процессы.

Дополнительно был проведен эксперимент с лабораторными животными, которым моделировали ИРП печени путем выполнения 40-минутной частичной сосудистой изоляции и 180-минутного выжидания реперфузионного периода в условии прекондиционирования ДХА натрия и без (вводили физиологический раствор внутривенно).

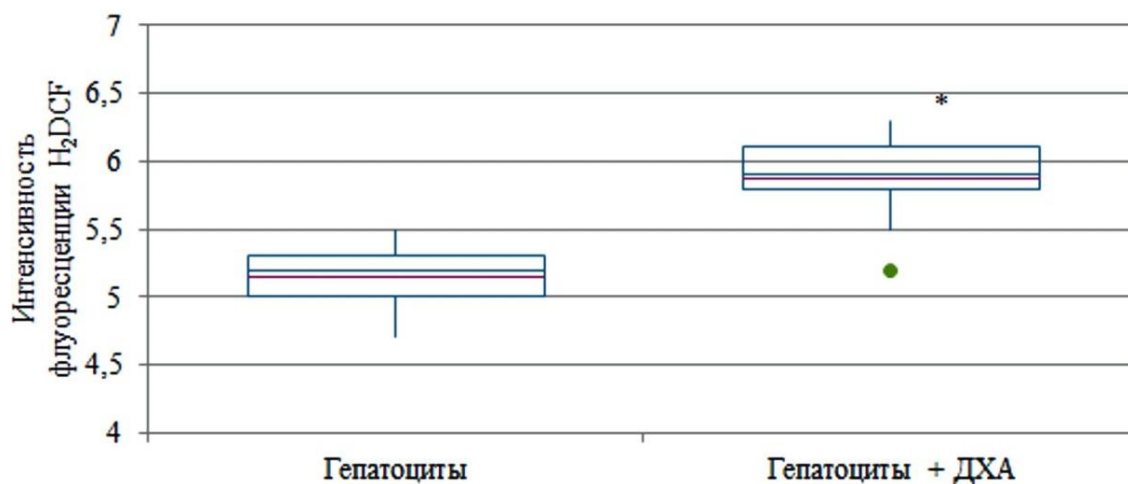


Рисунок 4.7 – Интенсивность флуоресценции 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата в суспензии гепатоцитов при инкубации с дихлорацетатом натрия: * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия при сравнении с гепатоцитами без дихлорацетата натрия

В результате проведенных исследований было установлено, что в условии предварительного введения ДХА натрия в плазме крови, полученной сразу после 40 минут ишемии печени, антиоксидантная активность снижена на 28 % относительно группы животных, которым вводили физиологический раствор. При этом в дальнейшем, при переходе к стадии реперфузии прогрессирующего снижения анализируемого маркера окислительного гомеостаза не происходило. После 180-минутного реперфузионного периода уровень железо-восстанавливающей способности поддерживался на том же уровне, что и в группе сравнения. В крови животных группы, которым вводили физиологический раствор, антиоксидантная активность плазмы крови наоборот снижалась в реперфузионной фазе на 17 % относительно значения, характерного для выхода из стадии васкулярной эксклюзии (рисунок 4.8).

В качестве маркера окислительных повреждений ДНК рассматривали 8-OHdG, концентрация которого в гомогенате печени имела отчетливую тенденцию к росту при моделировании ИРП печени (рисунок 4.9). В условии

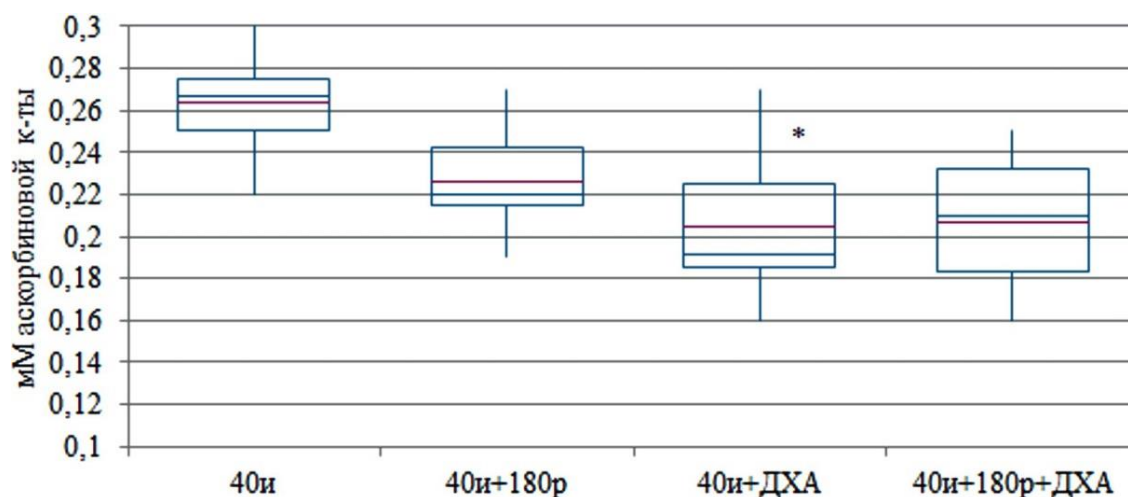


Рисунок 4.8 – Влияние дихлорацетата натрия на железо-восстанавливающую способность плазмы крови после ишемии и реперфузии печени: * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия при сравнении со значением показателя группы сравнения (без дихлорацетата натрия). Сокращения: 40и – ишемический период 40 минут; 180р – реперфузионный период 180 минут; ДХА – в условии preconditionирования дихлорацетатом натрия

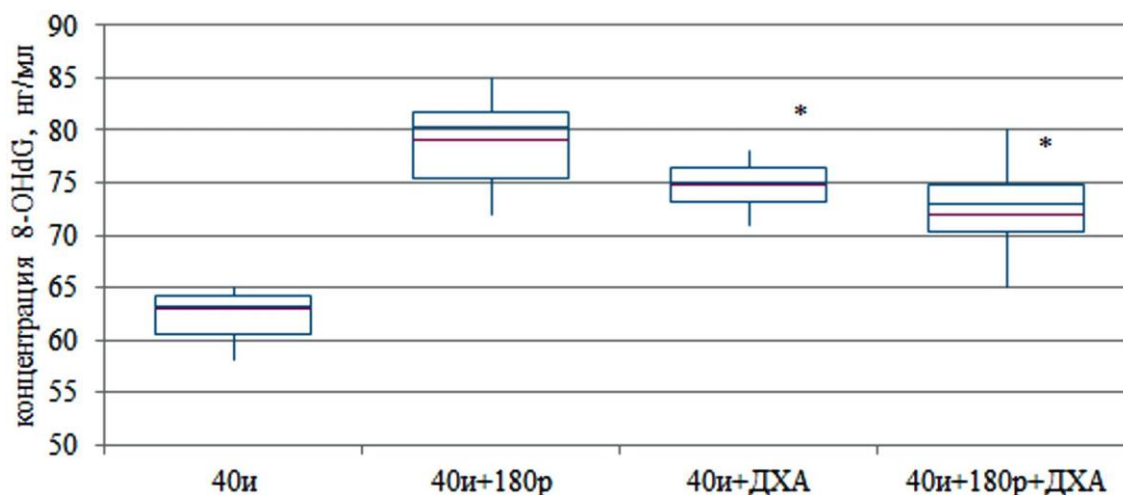


Рисунок 4.9 – Влияние дихлорацетата натрия на образование 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в гомогенате печени после ишемии и реперфузии (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия при сравнении со значением показателя группы сравнения (без дихлорацетата натрия). Сокращения: И – ишемический период; Р – реперфузионный период; ДХА – в условии preconditionирования дихлорацетатом натрия

preconditionирования ДХА натрия резкий рост концентрации 8-OHdG наблюдался уже в ишемическом периоде, в котором уровень данного маркера был на 19 % выше в сравнении со значением аналогичного показателя животных группы сравнения. Однако уже спустя 180 минут после восстановления кровотока наблюдалась тенденция к снижению уровня 8-OHdG в ткани печени в условии

прекондиционирования с использованием ДХА натрия, тогда как в группе сравнения наоборот наблюдался рост активности свободнорадикальных повреждений нуклеиновых кислот. Таким образом после реперфузии в опытной группе уровень концентрации 8-OHdG был снижен на 10 % относительно группы сравнения в той же экспериментальной фазе.

Представленные данные демонстрируют, что при условии введения ДХА натрия до моделирования ИРП печени низкоинтенсивный окислительный стресс наблюдается на местном и системном уровне уже в ишемической фазе. Однако этот эффект имеет адаптивные последствия для системы неспецифической резистентности организма, что проявляется в повышении защитного потенциала антиоксидантной системы и снижении интенсивности свободнорадикальных процессов в фазе реперфузии. Мы считаем, что такой эффект ДХА натрия наиболее вероятно приводит к реализации его защитного действия, проявляющегося в снижении выраженности цитолиза гепатоцитов после моделирования ИРП печени в эксперименте. С учетом предполагаемых эффектов ДХА натрия, связанных с индукцией окислительного стресса, было предложено апробировать в эксперименте прооксидантное preconditionирование с использованием окислителей прямого действия (ГПТБ и перекись водорода).

В результате проведенных исследований было показано, что защита печени от повреждающего действия ИРП возможна с использованием эффекта прооксидантного preconditionирования. Было показано, что для этих целей в эксперименте может использоваться 0,5 % раствор ГПТБ, который вводили в объеме 1 мл внутрибрюшинно за сутки до моделирования частичной сосудистой изоляции печени. Следует отметить, что были попытки вводить данное вещество за 3 часа до эксперимента, но они не завершились успехом. Таким образом, индукция адаптивного потенциала системы антиоксидантной защиты вероятно требует долгосрочных механизмов и связана с регуляцией экспрессии генов. Однако данные предположения требуют отдельного подробного изучения. Дополнительно следует отметить, что введение ГПТБ в более низкой и более высокой концентрациях не имело защитного эффекта. Вероятно, что введение 0,1 % раствора было недостаточным стимулом для запуска сигнальных

механизмов прооксидантного preconditionирования. Использование 1 % раствора ГПТБ вероятно было чрезмерным и сопровождалось реализацией токсических эффектов окислителя, который относится к гепатотоксикантам.

Доказательством, подтверждающим эффекты прооксидантного preconditionирования ИРП печени, является нивелирование любого защитного действия при комбинированном, но разделенном во времени, использовании ГПТБ и аскорбиновой кислоты. Аналогичные эффекты были описаны выше при анализе эффективности ДХА натрия, который комбинировали с липоевой и/или аскорбиновой кислотами.

Использование для прооксидантного preconditionирования пероксида водорода не оправдало надежд, связанных с оценкой возможности использования менее токсичного препарата, который имел бы потенциал внедрения в клиническую практику. ГПТБ несмотря на продемонстрированную эффективность ввиду токсичности не имеет перспектив внедрения в реальную практику поэтому имеет перспективу поиск менее опасных окислителей. Неудачи, связанные с использованием перекиси водорода можно обосновать несколькими факторами. Во-первых, возможны ошибки в дозировании и режиме введения. При этом использование более высокой концентрации пероксида водорода ограничено потенциальной возможностью химического ожога брюшины. Во-вторых, перекись водорода быстро разрушается в крови каталазой эритроцитов, не достигая печени. Конечно, при определенном подборе дозировки возможно добиться существенного влияния на антиоксидантную систему крови, способную обеспечить частичную защиту от повреждающих факторов реперфузионной стадии, однако, на наш взгляд это потребует длительной подготовки организма с неоднократным введением раствора пероксида водорода. В настоящем исследовании мы были нацелены на анализ возможностей коррекции острых повреждений печени, поэтому длительные схемы терапии не прорабатывали.

С учетом выявленных особенностей изменений микроэлементного гомеостаза на фоне ИРП печени у крыс было предложено провести оценку эффективности использования хелаторов. В некотором смысле препараты данной группы можно также рассматривать в качестве энерготропных, способных за счет связывания ионов металлов с переменной валентностью ингибировать свободнорадикальные

процессы – проявлять косвенную антиоксидантную активность. Проведенные исследования подтвердили возможность профилактики ИРП путем прекондиционирования с использованием неселективных и селективных хелаторов ионов металлов. Оценка влияния хелаторов на показатели цитолиза гепатоцитов и окислительный гомеостаз в условиях ИРП печени показала несомненные преимущества селективных хелаторов ионов железа. Ионы этого металла с переменной валентностью вносят основной вклад в металл-зависимую генерацию свободных радикалов в реакции Фентона, а также активнее всего высвобождаются в межклеточный матрикс паренхимы печени при разрушении гепатоцитов и в системный кровоток.

Результаты собственных исследований, представленные в данной главе, можно резюмировать несколькими положениями:

1) перспективы модификации состава ремаксоло или схемы его использования с целью повышения гепатопротекторной эффективности связаны с дополнительным введением антиоксидантов прямого механизма действия (аскорбиновая и липоевая кислоты);

2) активация ПДК при использовании ДХА натрия способствует поддержанию высокой активности пируватдегидрогеназы и в ишемической и в реперфузионной фазах ИРП печени, что обеспечивает переход к аэробным процессам после восстановления кровотока;

3) цитопротекторное действие ДХА натрия при ИРП печени связано с эффектом индукции низкоинтенсивного окислительного стресса и имитации АФК-опосредованных сигнальных путей защитного действия ишемического прекондиционирования;

4) прекондиционирование ИРП печени в эксперименте можно моделировать путем введения факторов прооксидантной направленности действия, таких как ГПТБ;

5) дополнительной возможностью совершенствования комбинированных энерготропных препаратов является включение селективных хелаторов ионов металлов с переменной валентностью, таких как дефероксамин, связывающих ионы железа и проявляющих косвенную антиоксидантную активность.

ГЛАВА 5.**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ
МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ
ПЕЧЕНИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

В клинико-экспериментальной практике распространены повреждения печени различного этиопатогенеза. Ввиду высокой метаболической активности и барьерной обезвреживающей функции печень оказывается очень чувствительной к действию разных повреждающих факторов. Распространены вирусные, токсические, в том числе алкогольные и лекарственные, лучевые, метаболические, такие как стеатогепатит, ишемические и другие повреждения паренхимы печени. В наркологической практике повреждения печени и их коррекция занимают одно из ведущих направлений медикаментозной терапии, что связано с токсическим влиянием психоактивных веществ разных групп, таких как алкоголь, опиаты и опиоиды, каннабиноиды, психостимуляторы. Интересной особенностью токсических повреждений печени является то, что ведущим патобиохимическим звеном является окислительный стресс, вследствие интенсификации генерации свободных радикалов в микросомальной цепи окисления при ее перегрузке ксенобиотиками. Общие механизмы повреждения клеток паренхимы при ишемии-реперфузии и интоксикации ксенобиотиками позволяют оценить эффективность разрабатываемых способов метаболической коррекции у больных с токсическими формами гепатита.

**5.1 Особенности патобиохимических нарушений и эффективность
метаболической гепатопротекции у больных с синдромом
зависимости от психоактивных веществ**

Проанализированы данные больных с синдромом зависимости от различных видов психоактивных веществ: опиоиды, психостимуляторы и

алкоголь. В крови больных на разных этапах и на фоне различных схем метаболической терапии выполняли определение ряда классических биохимических лабораторных показателей и оценку маркеров окислительного гомеостаза. Для метаболической коррекции использовали комплексный инфузионный гепатопротектор на основе янтарной кислоты и кофакторов энергетического обмена – ремаксол (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»)) и комбинацию ремаксоло с липоевой и аскорбиновой кислотами. Дизайн исследования описан в разделе 2.3 главы «Материалы и методы».

Для оценки выраженности повреждения печеночной паренхимы у исследуемых категорий больных был определен ряд стандартных лабораторных показателей – активность АЛТ, АСТ, ГГТ, концентрация общего билирубина и сывороточного альбумина. В результате проведенных исследований было установлено наличие цитолитического синдрома по данным изменения активности печеночных аминотрансфераз в сыворотке крови, которые на фоне зависимости от опиоидов и психостимуляторов были увеличены в 2,0–3,0 раза, а на фоне алкогольной зависимости – в 5,0–7,0 раз (рисунок 5.1., 5.2).

Оценка активности АЛТ показала увеличенные ее значения в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от опиоидов в 2,8 раза, психостимуляторов – в 1,8–2,0 раза, алкоголя – в 5,3–5,6 раз относительно контрольной группы практически здоровых испытуемых лиц (рисунок 5.1). Данные результаты получены на этапе поступления больных в стационар перед проведения дезинтоксикационно-стабилизационного курса лечения. В динамике лечения наблюдалась тенденция к снижению активности анализируемого фермента крови. Активность АЛТ в сыворотке крови больных с синдромом алкогольной зависимости снижалась на фоне стандартной терапии без использования антиоксидантов на 40 % относительно исходного значения показателя. Дополнительное использование ремаксоло сопровождалось еще более выраженным снижением интенсивности цитолиза гепатоцитов – АЛТ снижалась после лечения в 2,2 раза относительно исходного значения показателя. На фоне комбинированного использования ремаксоло совместно с прямыми

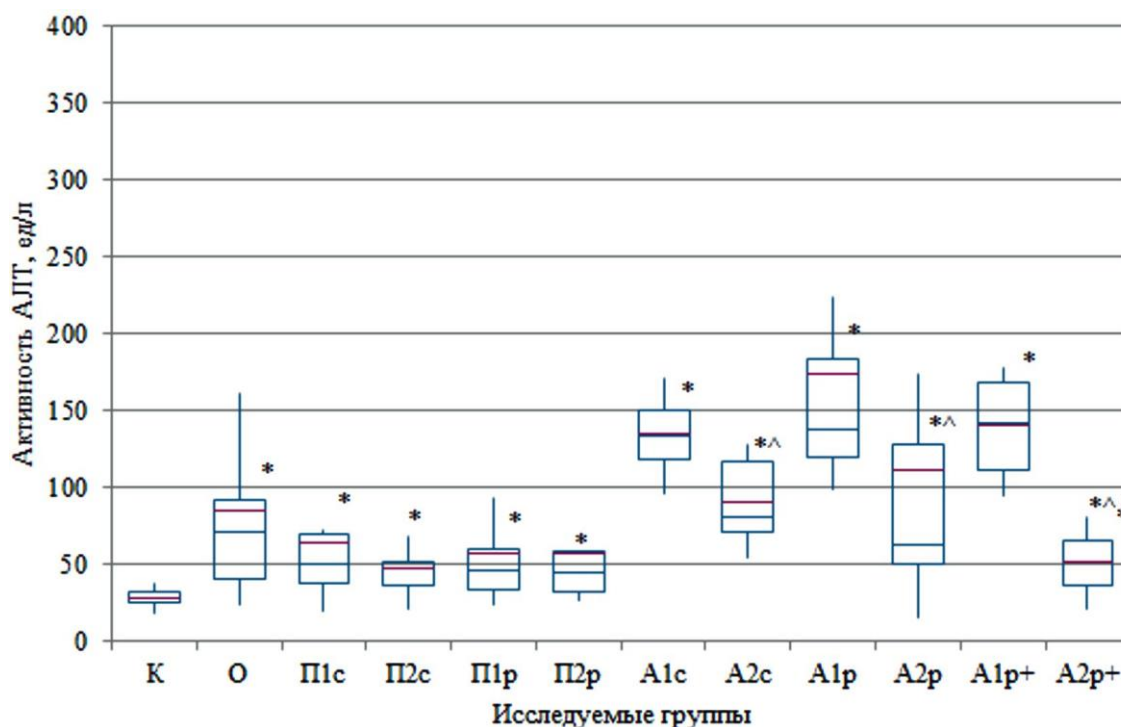


Рисунок 5.1 – Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Me (Q_1/Q_3)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения: «К» – контрольная группа; «О» – больные с синдромом зависимости от опиоидов; «П» – больные с синдромом зависимости от психостимуляторов; «А» – больные с синдромом зависимости от алкоголя; «с» – стандартная терапия; «р» – ремаксол; «р+» – ремаксол с аскорбиновой и липоевой кислотами; «1» – данные полученные на этапе поступления больных в стационар; «2» – данные полученные перед выпиской больных из стационара

антиоксидантами – липоевой и аскорбиновой кислотами активность АЛТ снижалась наиболее значительно – в 2,7 раза. Тем не менее следует отметить, что ни в одной из вышеописанных подгрупп больных уровень маркера цитолиза не достигал контрольных цифр. В сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психостимуляторов после 18–20 дней лечения статистически значимого изменения уровня активности АЛТ не было определено ни в одной из изученных подгрупп, в том числе в подгруппе больных, дополнительно получавших ремаксол.

Активность АСТ изменялась аналогично АЛТ с некоторыми особенностями (рисунок 5.2). Основной особенностью было статистически значимое снижение

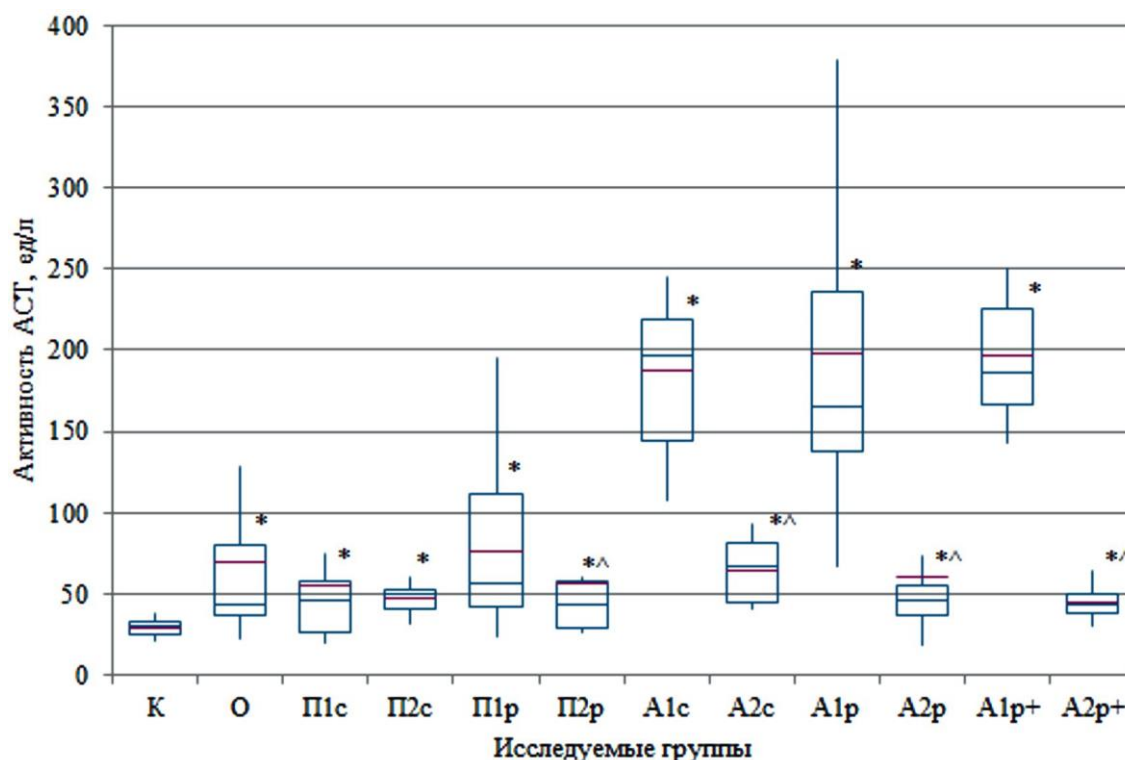


Рисунок 5.2 – Активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Ме (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

активности АСТ в подгруппе больных с синдромом зависимости от психостимуляторов, получавших в ходе терапии ремаксол. В сыворотке крови больных этой подгруппы активность анализируемого маркера цитолитического синдрома после лечения была на 23 % ниже исходного значения, полученного при поступлении больных в стационар. В случае больных с алкогольным гепатитом активность АСТ также после лечения снижалась в 2,9–4,3 раза, в большей степени в условии комплексного лечения с использованием ремаксола, витамина С и липоевой кислоты. При этом значения данного показателя оставались выше контрольного уровня. На фоне стандартной терапии активность АСТ оставалась увеличенной относительно контроля в 2,2 раза, на фоне терапии с включением ремаксола – на 54 %, в условии комплексной метаболической коррекции – на 44 %. Таким образом и в этом случае высокая эффективность метаболической гепатопротекции не вызывает сомнений.

Концентрация сывороточного альбумина в крови больных изученных групп как до, так и после лечения находилась в межквартильном интервале 38,5–47,7 г/л, что практически полностью совпадало с межквартильным интервалом аналогичного показателя контрольной группы, составлявшем 38,8–45,0 г/л (рисунок 5.3). Несмотря на некоторые колебания показателя до и после лечения, особенно в группе больных с синдромом зависимости от психостимуляторов, каких-либо статистически значимых изменений содержания данного белка в сыворотке крови больных выявлено не было.

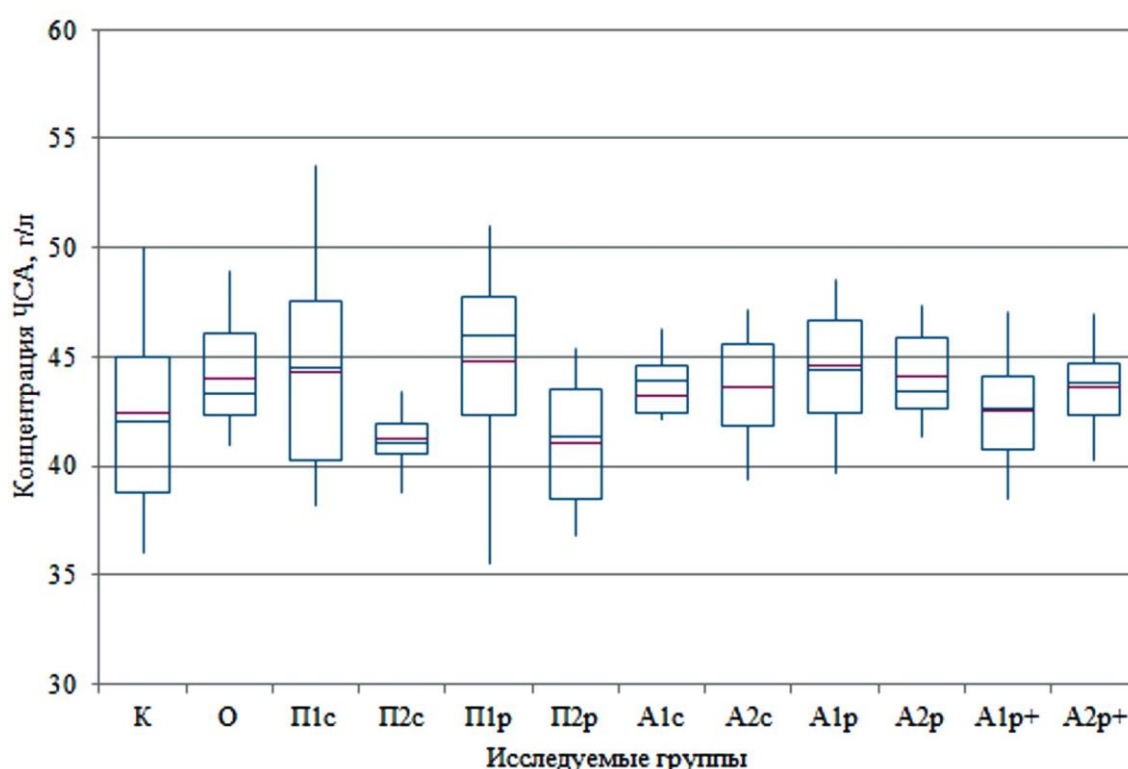


Рисунок 5.3 – Концентрация сывороточного альбумина в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения.

Обозначения – см. рисунок 5.1

Активность ГГТ в определенной степени можно также отнести к маркерам цитолитического синдрома, обладающим некоторой специфичностью к алкогольным поражениям печени. Это проявлялось в нашем исследовании тем,

что у больных с синдромом зависимости от опиоидов и психостимуляторов уровень активности ГГТ статистически значимо не отличался от значения аналогичного показателя контрольной групп, в том числе не было выявлено различий между значениями показателя до и после терапии (рисунок 5.4).

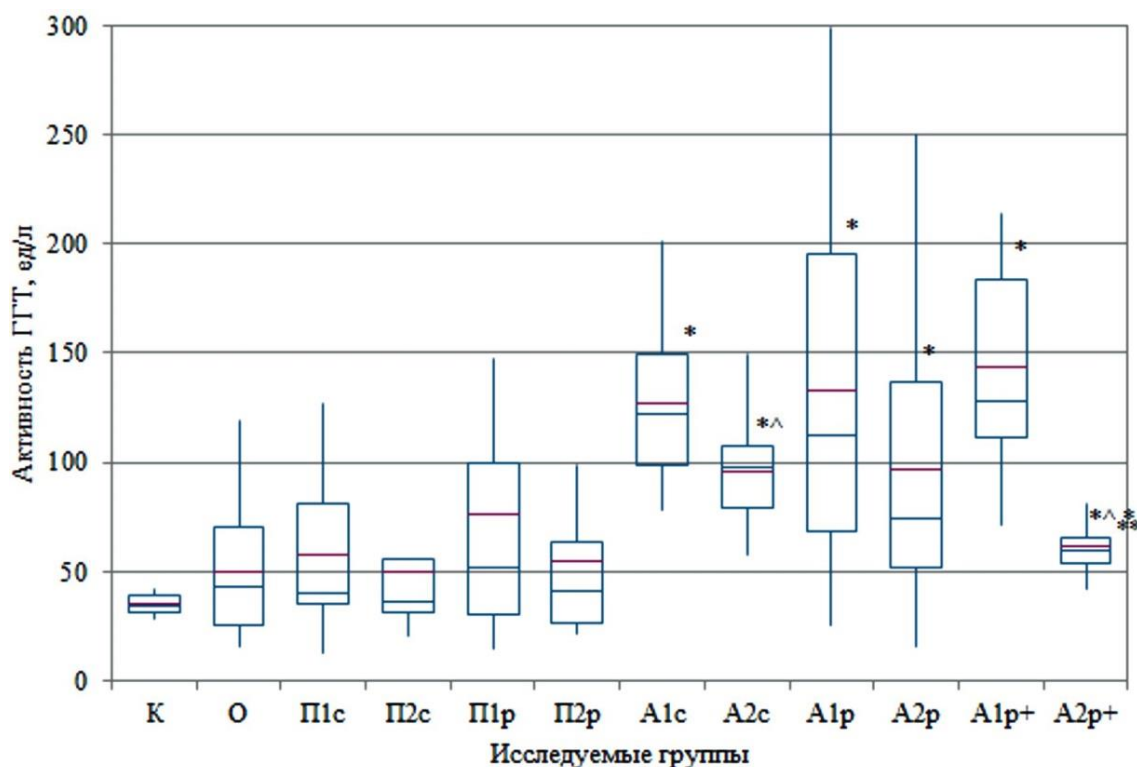


Рисунок 5.4 – Активность гаммаглутамилтрансферазы в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Me (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; *^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

При этом наблюдаемые значения характеризовались высокой вариабельностью, особенно в сравнении с относительно гомогенной контрольной группой, что может характеризовать тенденцию к увеличению. Для больных с алкогольным гепатитом были характерны увеличенные значения активности ГГТ в 3,3–3,8 раза, что соответствовало тенденциям изменения активности аминотрансфераз. В процессе проведения терапии активность ГГТ статистически значимо снижалась относительно исходно полученных данных на момент поступления больных в стационар. Так на фоне стандартного 3-х недельного

курса дезинтоксикационно-стабилизационного лечения активность ГГТ снижалась на 20 %, на фоне терапии, дополненной ремаксолом – на 43 %, а при условии использования ремаксола, витамина С и липоевой кислоты – в 2,1 раза.

Концентрация общего билирубина в сыворотке крови больных изученных групп имела тенденцию к увеличению на фоне алкогольного гепатита, тогда как в случае синдром зависимости от опиоидов или психостимуляторов оставалась в пределах контрольных цифр (рисунок 5.5).

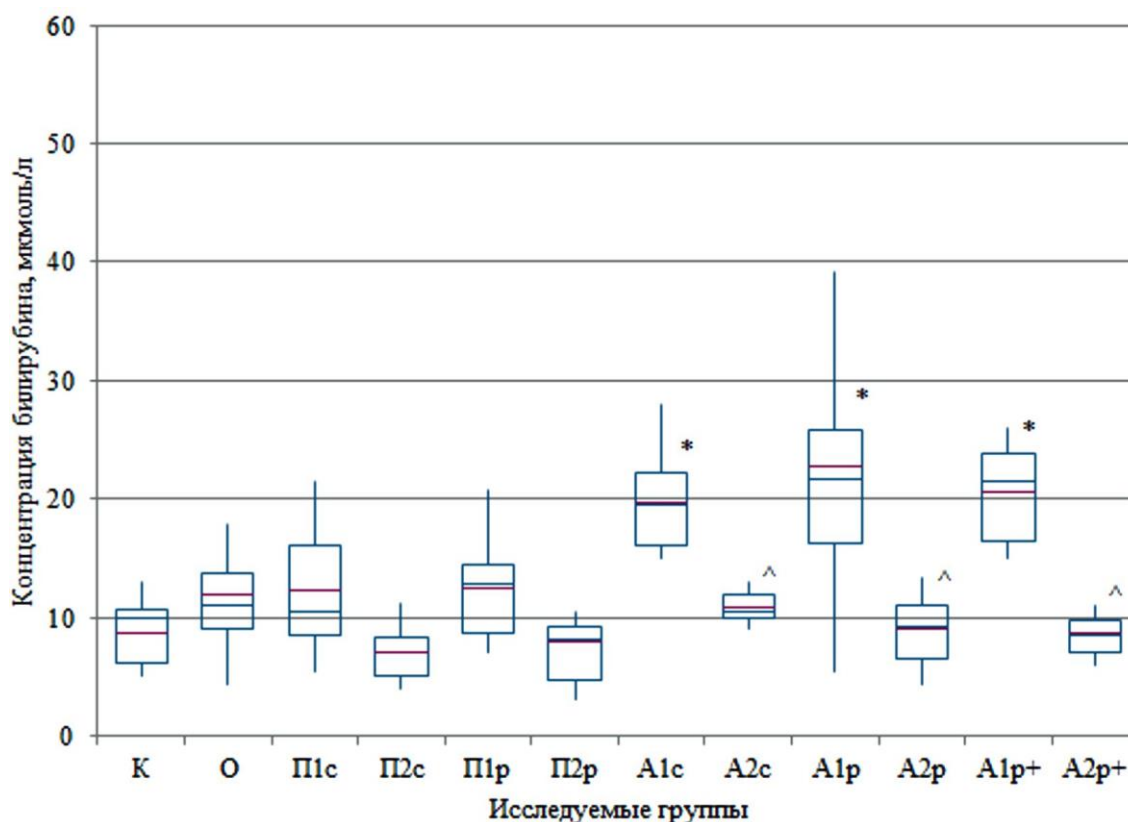


Рисунок 5.5 – Концентрация общего билирубина в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Ме (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

Для больных с синдромом алкогольной зависимости было характерно увеличение содержания анализируемого метаболита в крови в 2,0–2,2 раза. После проведения лечения концентрация общего билирубина снижалась в одинаковой степени вне зависимости от схемы лечения и достигала контрольного уровня.

Интересно, что в случае с синдромом зависимости от психостимуляторов, несмотря на исходно не отличающиеся от контрольных цифр значения концентрации продукта распада гема, после лечения его концентрация также статистически значимо снижалась.

Для характеристики окислительного гомеостаза использовали сокращенный перечень лабораторных маркеров, наиболее объективно отражающих состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса. Одной из таких характеристик является общая антиоксидантная активность, которую определяли железо-восстанавливающим способом. В результате проведенных исследований было установлено сниженное значение данного показателя в плазме крови больных всех изученных групп как до, так и после лечения (рисунок 5.6).

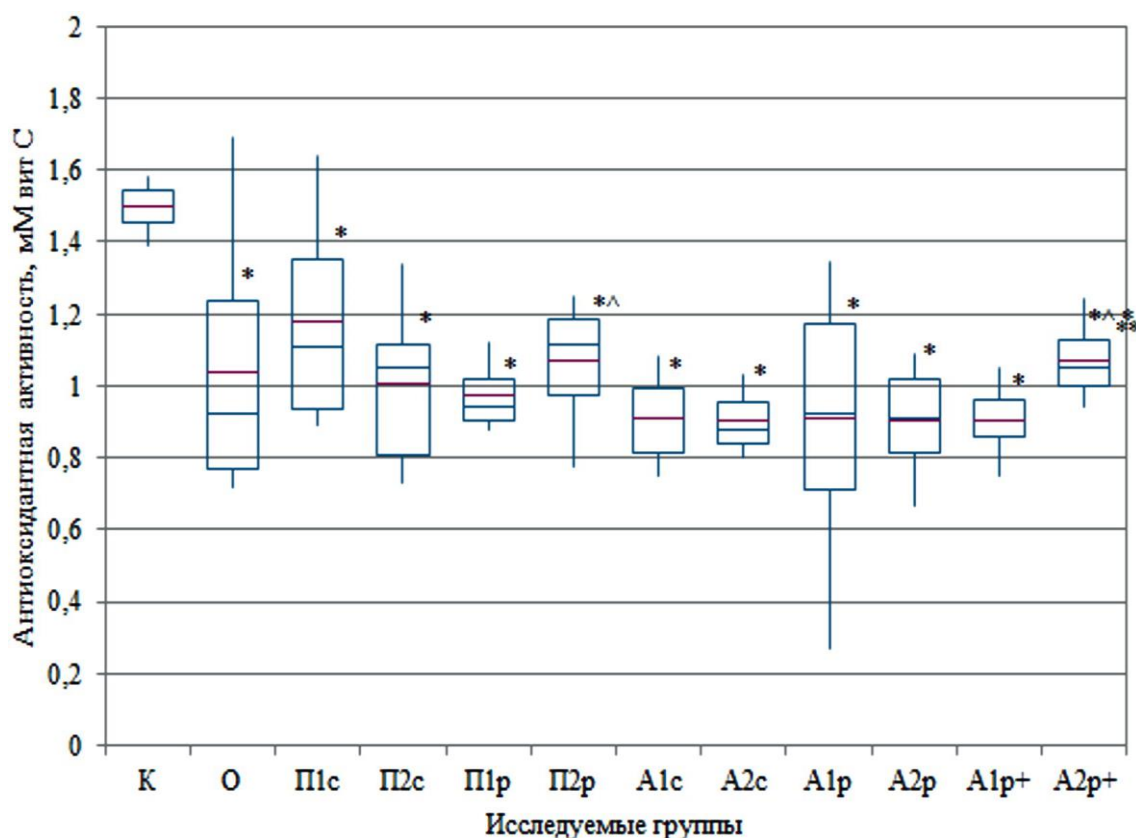


Рисунок 5.6 – Общая антиоксидантная активность в плазме крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Ме (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

Исходное значение общей антиоксидантной активности плазмы крови больных разных групп на этапе поступления в стационар составляло 26–40 %. Проведение стандартного курса терапии без включения антиоксидантов ни в одной из анализируемых подгрупп не позволило добиться статистически значимого увеличения рассматриваемого лабораторного показателя. Использование ремаксолола в подгруппе больных с синдромом зависимости от психостимуляторов позволило увеличить железо-восстанавливающую активность плазмы крови на 19 %, однако было недостаточным для решения аналогичной задачи в подгруппе больных с хронической алкогольной интоксикацией. Антиоксидантная активность плазмы крови больных алкогольным гепатитом увеличивалась на 17 % при совместном использовании ремаксолола с аскорбиновой и липоевой кислотами. При этом даже в условиях статистически значимого увеличения рассматриваемого лабораторного маркера при использовании метаболической гепатопротекторной терапии, его значения оставались на значительно более низком уровне в сравнении с контрольными цифрами. Наиболее высокие значения антиоксидантной активности, полученные в подгруппе больных с синдромом зависимости от психостимуляторов после курса лечения, дополненного ремаксололом, а также в подгруппе больных с синдромом алкогольной зависимости после комплексной антиоксидантной терапии, оставались сниженными на 25–30 % относительно контроля.

В качестве количественной характеристики интенсивности окислительного стресса или оксидативных модификаций биомолекул был рассмотрен показатель тиобарбитурового числа, коррелирующий с концентрацией малонового диальдегида.

Уровень тиобарбитурового числа был противоположно общей антиоксидантной активности увеличен во всех группах больных относительно контроля (рисунок 5.7). Наиболее высокие значения были определены в подгруппах больных с синдромом зависимости от опиоидов или психостимуляторов. В первом случае значение показателя превышало контрольные цифры в 2,7 раза, во втором – в 3,3–3,4 раза. В эритроцитарной взвеси больных с синдромом алкогольной

зависимости концентрация ТБК-реактивных продуктов была увеличена в меньшей степени – в 1,7–1,9 раза. Проведение терапии оказывало более заметное влияние на тиобарбитуровое число, чем на уровень антиоксидантной активности. Так на фоне стандартного курса терапии больных с синдромом зависимости от психостимуляторов концентрация ТБК-реактивных продуктов в крови снижалась на 37 %, а при условии включения в схему терапии ремаксола – на 47 %. В крови больных алкогольным гепатитом исходные значения тиобарбитурового числа были не так значительно увеличены, соответственно менее наглядным было влияние метаболической коррекции. Только в подгруппе больных, получавших ремаксол, витамин С и липоевую кислоту содержание продуктов окислительных модификаций биомолекул после терапии статистически значимо снижалось на 10 % относительно исходного значения показателя.

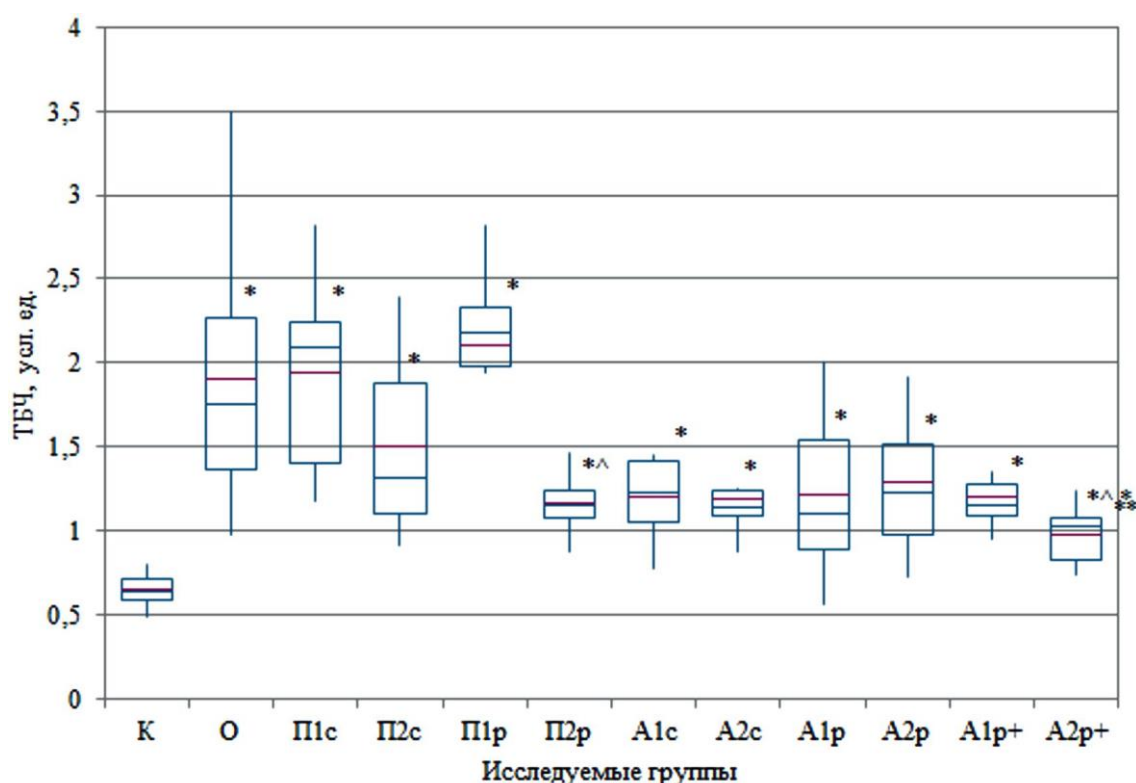


Рисунок 5.7 – Уровень тиобарбитурового числа в эритроцитах больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Ме (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

Для характеристики ферментного звена антиоксидантной системы была определена активность каталазы эритроцитов (рисунок 5.8).

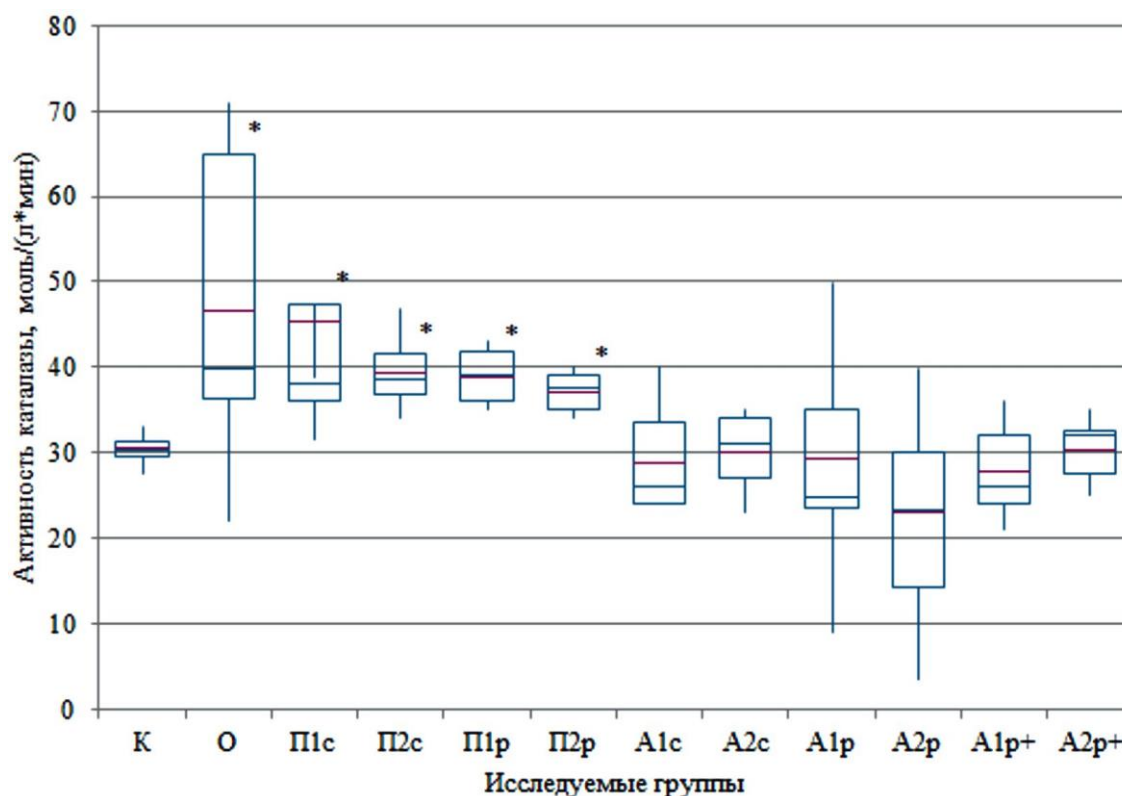


Рисунок 5.8 – Активность каталазы в эритроцитах больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Ме (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

При этом было установлено разное реагирование данного фермента на интоксикацию и зависимость от разных психоактивных веществ относительно значения активности энзима в контрольной группе практически здоровых испытуемых лиц. Так для больных с синдромом зависимости от опиоидов или психостимуляторов была характерна тенденция к увеличению каталазной активности, тогда как для больных с синдромом зависимости от алкоголя была характерна обратная тенденция к снижению анализируемого маркера. В крови больных с синдромом зависимости от опиоидов или психостимуляторов активность анализируемого фермента была увеличена на 25–33 % без каких-либо

особенностей после проведения терапии. В крови больных алкогольным гепатитом на этапе, предшествовавшем началу терапевтических мероприятий, наблюдались сниженные на 14–19 % медианные значения ферментативной активности. В условии терапии, в том числе дополненной метаболитическими гепатопротекторами, не наблюдалось значительных изменений активности фермента, которая статистически значимо не отличалась от контрольного уровня.

Концентрация глутатиона в эритроцитарной взвеси больных разных групп также отличалась от контрольного значения соответствующего показателя и претерпевала изменения в процессе терапии. Исходное значение анализируемого показателя в крови больных с синдромом зависимости от опиоидов или психостимуляторов было снижено на 19–24 % без статистически значимых изменений после проведения дезинтоксикационно-стабилизационного курса лечения (рисунок 5.9).

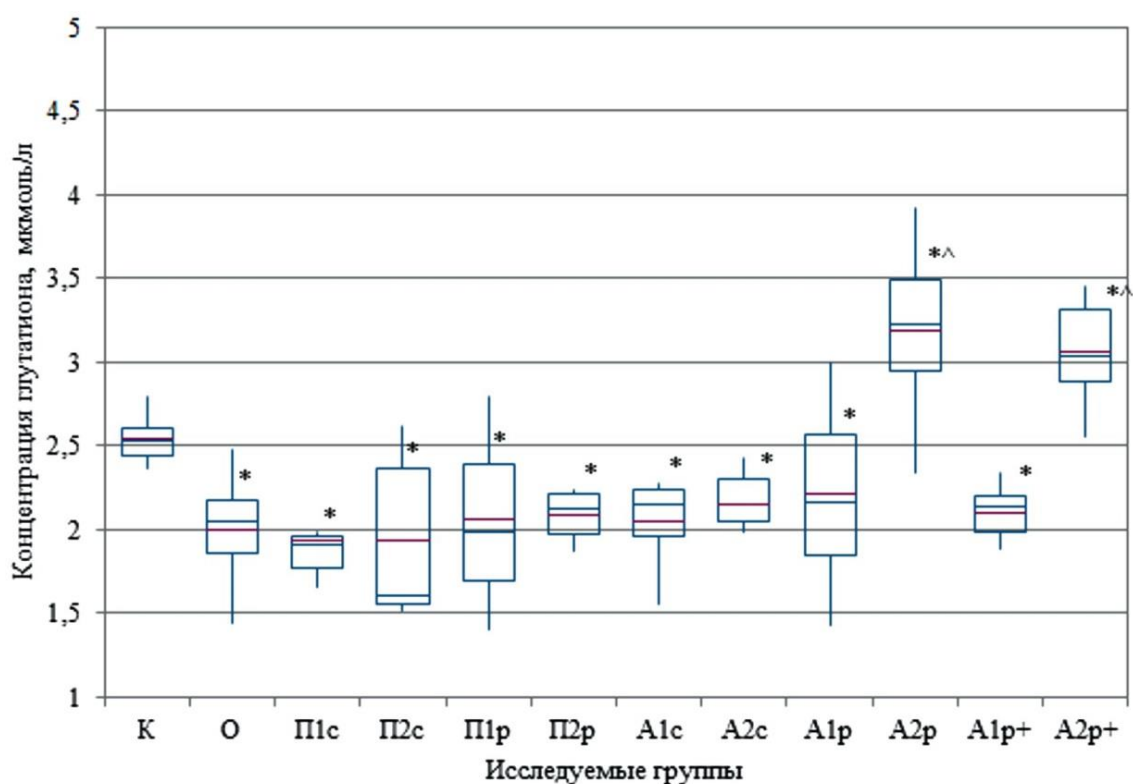


Рисунок 5.9 – Концентрация глутатиона в эритроцитах больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболитической терапии (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

В крови больных с синдромом алкогольной зависимости концентрация глутатиона была снижена на 15 % на этапе поступления в стационар. Стандартный курс лечения алкогольного гепатита не способствовал статистически значимому росту концентрации анализируемого регулятора клеточного редокс гомеостаза. Однако антиоксидантная терапия в составе самостоятельного использования ремаксола или аналогичного препарата янтарной кислоты и кофакторов энергообмена, дополненного витамином С и липоевой кислотой способствовала росту концентрации восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси на 42–50 %. В этих случаях концентрация рассматриваемого метаболита даже превышала контрольные значения соответствующего маркера на 21–28 %.

Аналогичным глутатиону регулятором редокс гомеостаза в плазме крови являются белковые тиоловые (сульфгидрильные) группы, общее содержание которых снижалось во всех изученных группах больных (рисунок 5.10). В группах больных с синдромом зависимости от опиоидов или психостимуляторов этот показатель был на 18–24 % ниже контрольного значения соответствующего лабораторного показателя плазмы крови. Для больных с алкогольной зависимостью было характерно значение рассматриваемого показателя, сниженное на 27–31 % относительно контроля. Проведение терапевтических мероприятий больным с синдромом зависимости от психостимуляторов способствовало небольшому, но статистически значимому росту количества тиоловых групп в плазме крови на 10–11 %. В плазме крови больных алкогольным гепатитом на фоне стандартного курса терапии или дополненного ремаксолом комплексного курса лечения статистически значимых изменений уровня тиоловых групп выявлено не было. Однако на фоне использования ремаксола совместно с аскорбиновой и липоевой кислотами содержание белковых SH-групп в плазме крови увеличивалось на 19 % относительно исходного значения соответствующего показателя. Тем не менее значение показателя и в этом случае оставалось существенно ниже контрольного уровня.

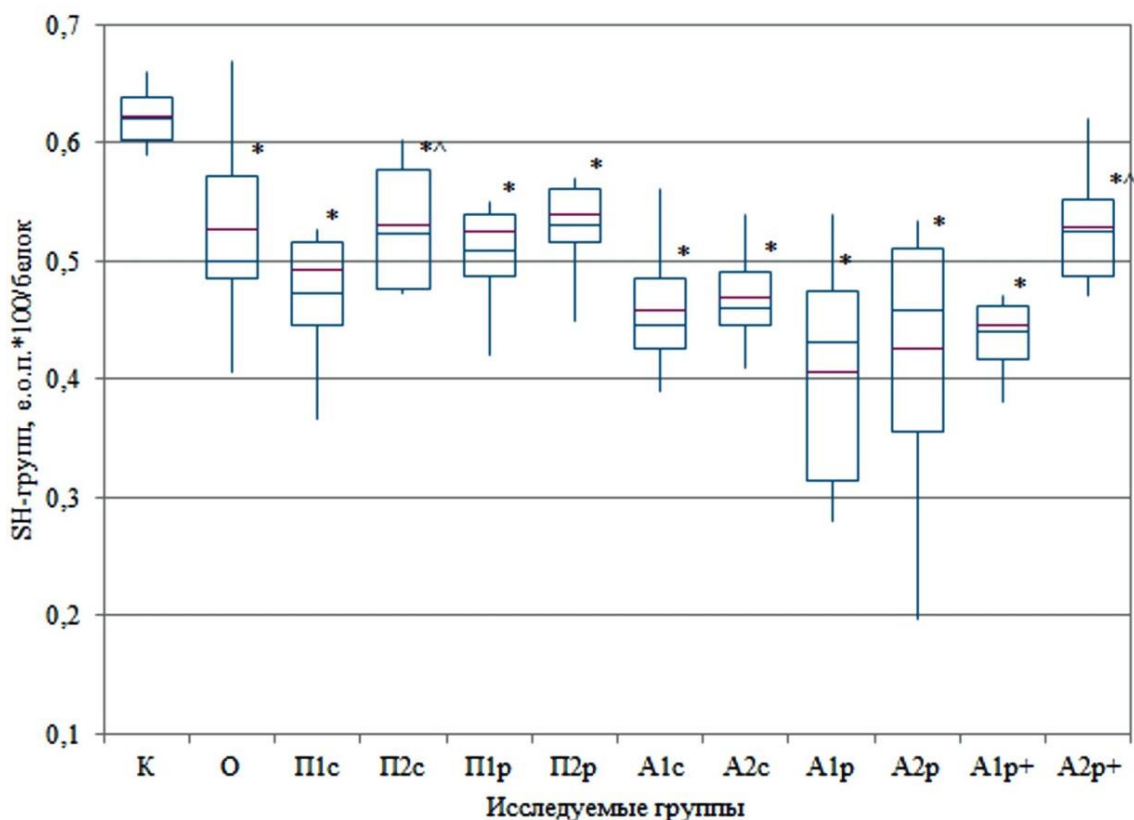


Рисунок 5.10 – Общее содержание тиоловых групп в плазме крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Ме (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1

Большее количество информации с более высокой диагностической ценностью позволяет получить детальный анализ отдельных фракций тиоловых групп, распределение которых представлено в таблице 5.1. В результате проведенных исследований было установлено, что развитие заболеваний, связанных с формированием химических аддикций и токсическим повреждением печени, ассоциировано не только со снижением общего количества тиоловых групп в плазме крови, но и перераспределением фракций в сторону относительного преобладания легкодоступных или поверхностных SH-групп белков. Так уровень легкодоступных тиоловых групп был увеличен на 55–68 %, а труднодоступных – снижен в 2,7–3,4 раза в плазме крови больных с синдромом зависимости от опиоидов или психостимуляторов. Для больных с алкогольным повреждением печени был характерен менее выраженный дисбаланс,

Таблица 5.1 – Показатели состояния тиоловых групп в плазме крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Me (Q₁/Q₃))

Группы	Исследуемые показатели		
	SH _л , е.о.п.*100/белок	SH _т , е.о.п.*100/белок	SH _л / SH _т , отн. ед.
К	0,22 (0,20/0,23)	0,41 (0,38/0,43)	0,54 (0,51/0,55)
О	0,37 (0,33/0,40)*	0,15 (0,11/0,20)*	2,24 (1,71/4,09)*
П1с	0,36 (0,34/0,41)*	0,12 (0,06/0,14)*	2,79 (2,18/9,31)*
П2с	0,29 (0,26/0,30)*^	0,28 (0,25/0,29)*^	0,95 (0,83/1,28)*^
П1р	0,34 (0,32/0,42)*	0,15 (0,08/0,22)*	2,69 (1,37/5,62)*
П2р	0,28 (0,26/0,30)*^	0,26 (0,26/0,28)*^	1,05 (0,98/1,16)*^
A1с	0,28 (0,25/0,31)*	0,15 (0,11/0,24)*	1,95 (1,03/2,94)*
A2с	0,23 (0,20/0,25)^	0,22 (0,20/0,39)*^	1,15 (1,04/1,34)*^
A1р	0,28 (0,21/0,37)*	0,14 (0,09/0,19)*	1,67 (0,91/4,26)*
A2р	0,24 (0,20/0,43)^	0,22 (0,16/0,28)*^	1,24 (1,00/3,22)*
A1р+	0,32 (0,30/0,35)*	0,13 (0,12/0,15)*	2,54 (2,27/3,01)*
A2р+	0,26 (0,22/0,28)^	0,28 (0,24/0,30)*^	0,93 (0,78/1,24)*^

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем контрольной группы; ^ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем на этапе поступления больных в стационар; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении показателей подгруппы «А» после лечения. Обозначения – см. рисунок 5.1.

сопровождаясь превышением легкодоступной фракции SH-групп на 27–45 % и сниженным в 2,7–3,2 раза количеством труднодоступной фракции относительно значений соответствующих показателей пациентов контрольной группы. В процессе терапии наблюдалась выраженная позитивная динамика нормализации баланса легко- и труднодоступных фракций тиоловых групп белков плазмы крови. Нагляднее за этим процессом можно проследить по коэффициенту соотношения SH-групп, составлявшему в среднем 2,69–2,79 единиц у больных с синдромом зависимости от психостимуляторов до лечения и снижавшемуся после терапии до уровня 0,95–1,05 единиц. В этом случае не было выявлено разницы в эффективности схемы стандартной или метаболической терапии. Для больных с синдромом алкогольной зависимости было определено значение коэффициента соотношения тиоловых групп 1,67–2,54 единиц, который после лечения снижался

до значений 0,93–1,24 единиц. Наиболее значительное снижение коэффициента в 2,7 раза в основном за счет прироста труднодоступных SH-групп в 2,2 раза было определено в подгруппе больных, получавших комплексную антиоксидантную терапию, включающую ремаксол, аскорбиновую и липоевую кислоты.

Таким образом краткий обзор, полученных в этом разделе данных, позволяет заключить, что у больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ развивается токсическое повреждение печени и метаболический стресс, проявляющийся дисбалансом прооксидантно-антиоксидантной системы. Проведение терапии по стандартной схеме, предполагающей коррекцию острых психических нарушений, а также терапии, дополненной использованием ремаксола, в большинстве случаев не позволяет добиться оптимального снижения цитолитического синдрома и контроля окислительного стресса. Усиление антиоксидантной терапии дополнительным введением аскорбиновой и липоевой кислоты вместе с ремаксолом позволило максимально улучшить показатели контроля цитолиза и прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса.

5.2 Эффективность комбинированной метаболической коррекции повреждений печени при алкогольном гепатите с использованием серосодержащих гепатопротекторов

Отдельное внимание было уделено анализу серосодержащих гепатопротекторов. В предыдущем разделе уже проанализирована возможность усиления эффективности ремаксола путем дополнительного введения аскорбиновой и липоевой кислоты. Полученные данные оказались недостаточно убедительными, что может быть связано со сравнительно слабой выраженностью поражения печени у больных с синдромом зависимости от алкоголя. В этих условиях исключение употребления психоактивных веществ бывает достаточным для нормализации метаболических нарушений. Поэтому была набрана группа

пациентов с установленным диагнозом «алкогольный гепатит», а в качестве одного из критериев включения была обозначена активность АЛТ не менее 150 ед/л. В качестве терапии больные 2 подгруппы получали адеметионин, 3 подгруппы – липоевую кислоту, 4 подгруппы липоевую кислоту вместе с адеметионином. Длительность наблюдения составила 15–18 дней. Дизайн исследования описан в разделе 2.3 главы «Материалы и методы».

Оценка влияния серосодержащих гепатопротекторов основывалась на изменении уровня маркеров цитолиза гепатоцитов. Динамика изменений активности АЛТ в сыворотке крови больных алкогольным гепатитом наглядно продемонстрировал эффективность выбранных терапевтических стратегий (рисунок 5.11).

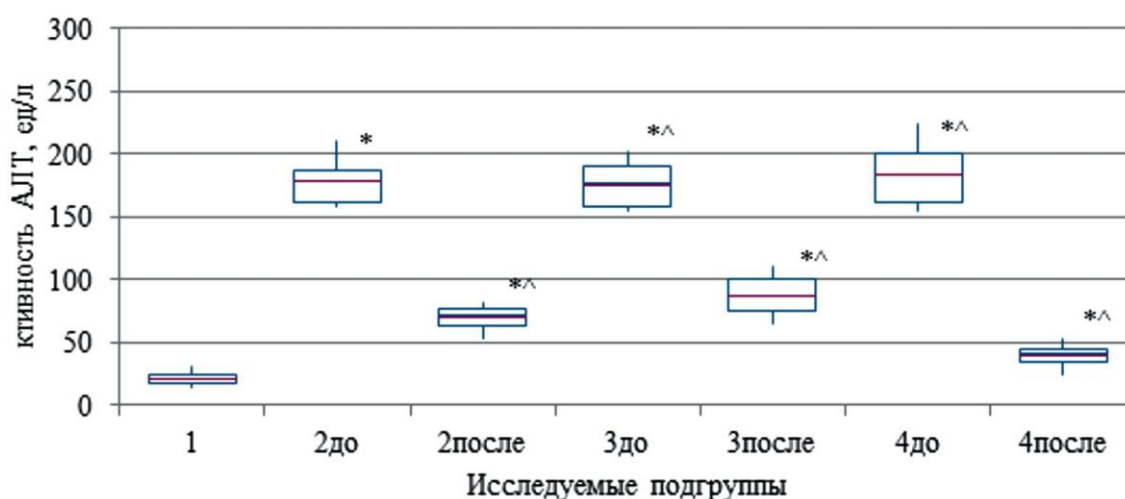


Рисунок 5.11 – Изменение активности АЛТ в сыворотке крови больных алкогольным гепатитом на фоне комбинированной терапии серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q_1/Q_3)):

* – статистически значимые различия при сравнении с показателем группы № 1;

^ – статистически значимые различия от исходного значения показателя.

Обозначения: 1, 2, 3, 4 – номера подгрупп больных

На фоне применения адеметионина активность АЛТ за время лечения снижалась в 2,5 раза, в условии получения больными липоевой кислоты – в 2,0 раза. Сочетанная терапия характеризовалась наиболее низкими значениями активности АЛТ после терапии, сниженными в 4,4 раза. Анализ исходных данных пациентов 2–4 групп показал отсутствие статистически значимых межгрупповых различий активности АЛТ ($p = 0,665$ по критерию Краскела-Уоллиса), что

характеризует гомогенность анализируемых выборок. Анализ данных больных 2–4 групп после лечения продемонстрировал наличие статистически значимых различий, а попарные сравнения подтвердили, что уровень рассматриваемого лабораторного показателя пациентов 4 группы находится на наиболее низком уровне, значимо различающемся от данных 2 и 3 групп.

Аналогичные данные получены и при анализе изменений активности ГГТ, которую обычно рассматривают как один из непрямых маркеров употребления алкоголя. На исходном этапе для больных 2–4 групп было характерно увеличенное значение активности ГГТ в сыворотке крови в 6,8–7,2 раза без межгрупповых различий. В условии проведения лечения активность ГГТ снижалась в 1,5–1,6 раза во 2 и 3 группах, для 4 группы было определено снижение активности рассматриваемого фермента после лечения в 2,7 раза. Также как для активности АЛТ было подтверждено статистически значимо более низкое значение активности ГГТ в сыворотке крови больных 4 группы после лечения в сравнении со значениями показателей больных 2–3 группы на аналогичной стадии наблюдения (рисунок 5.12).

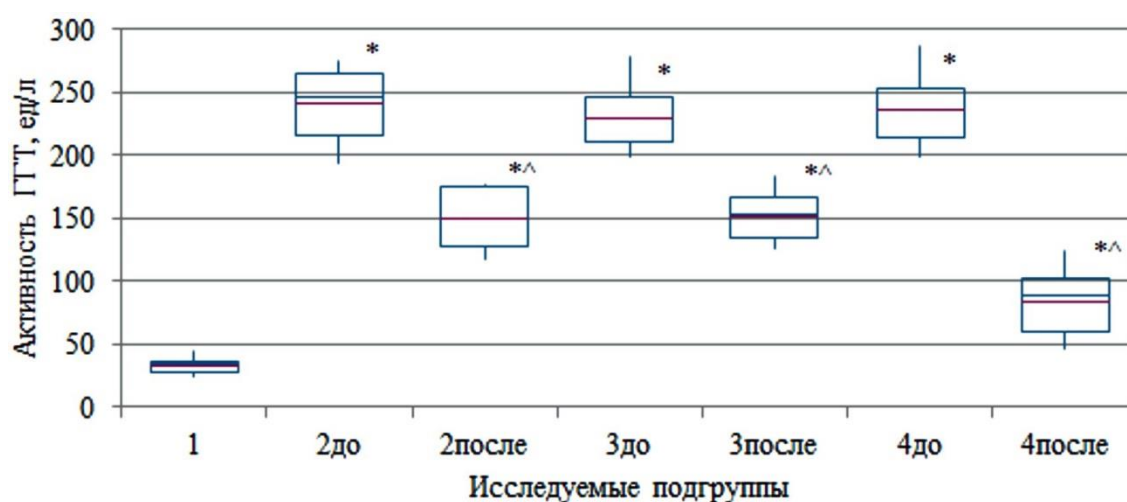


Рисунок 5.12 – Изменение активности ГГТ в сыворотке крови больных алкогольным гепатитом на фоне комбинированной терапии серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q₁/Q₃)):

* – статистически значимые различия при сравнении с показателем группы № 1;

^ – статистически значимые различия от исходного значения показателя.

Обозначения: 1, 2, 3, 4 – номера подгрупп больных

Определение характеристики баланса про-/антиоксиданты включало оценку общей антиоксидантной активности и концентрации ТБК-реактивных продуктов в крови (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Показатели состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Me (Q₁/Q₃))

Исследуемые группы	Исследуемые показатели			
	Этап наблюдения	ОАОА (FRAP-метод), мМ витамина С	ОАОА (АБТС-метод), мМ витамина С	ТБК-реактивные продукты, усл. ед.
1 (здоровые добровольцы, n = 15)		0,55 (0,52/0,60)	0,60 (0,55/0,64)	0,38 (0,33/0,42)
2 (Адеметионин) n = 10	до лечения	0,41* (0,35/0,45)	0,48* (0,43/0,51)	0,71* (0,63/0,80)
	после лечения	0,46* (0,37/0,49)	0,58^ (0,54/0,63)	0,56*^ (0,50/0,64)
3 (ЛК) n = 10	до лечения	0,39* (0,34/0,44)	0,45* (0,41/0,50)	0,74* (0,67/0,80)
	после лечения	0,63^ (0,56/0,68)	0,74^ (0,67/0,78)	0,53*^ (0,48/0,58)
4 (Адеметионин+ЛК) n = 10	до лечения	0,39* (0,34/0,44)	0,46* (0,43/0,51)	0,72* (0,68/0,79)
	после лечения	0,62^ (0,57/0,69)	0,70^ (0,64/0,75)	0,46*^ (0,41/0,50)

Примечания: * – статистически значимые различия при сравнении с показателем 1 группы; ^ – статистически значимые различия от исходного значения показателя.

В результате было установлено, что введение липоевой кислоты в виде монотерапии или совместно с адеметионином обеспечивает поддержание более высокого уровня антиоксидантной активности. Железо-восстанавливающая способность плазмы крови больных 3 и 4 групп после лечения увеличивалась на 59–62 %. Введение адеметионина не влияло на данный лабораторный показатель, однако способствовало статистически значимому росту уровня антирадикальной активности плазмы крови, которая увеличивалась на 21 % после лечения. Использование липоевой кислоты при этом обеспечивало более высокий уровень

и антирадикальной активности, который был увеличен в плазме крови больных 3 и 4 групп на 52–64 % после курса терапии. Во всех трех группах больных было определено снижение концентрации продуктов липопероксидации в эритроцитарной взвеси на 21–36 %. Статистический анализ данных 3-х основных групп пациентов, проходивших лечение по разным схемам, не позволил выявить каких-либо особенностей влияния комбинированной терапии на состояние окислительного гомеостаза.

Проведение лабораторных исследований окислительного гомеостаза было дополнено анализом изменений концентрации глутатиона в эритроцитарной взвеси и уровня SH-групп в плазме крови (таблица 5.3). В результате было показано, что на фоне метаболической терапии наблюдается увеличение исходно сниженных концентрации глутатиона в эритроцитарной взвеси и содержания тиоловых групп в плазме крови до уровня показателя контрольной группы. Следует отметить, что основное влияние оказывало введение липоевой кислоты, которая сама имеет 2 SH-группы в своем составе. При этом какого-либо преимущества комбинированная терапия с использованием серосодержащих гепатопротекторов влияния на состояние тиолового гомеостаза не имела.

Таблица 5.3 – Показатели состояния тиолового звена антиоксидантной системы крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии (Ме (Q₁/Q₃))

Исследуемые группы	Исследуемые показатели		
	Этап наблюдения	Глутатион, мкмоль/л	SH-группы, 100*е.о.п./г белка
1 (здоровые добровольцы, n = 15)		2,56 (2,43/2,70)	0,57 (0,54/0,61)
2 (Адеметионин) n = 10	до лечения	2,12 (1,95/2,20)*	0,44 (0,41/0,46)*
	после лечения	2,38 (2,21/2,47)*^	0,47 (0,44/0,50)*
3 (ЛК) n = 10	до лечения	2,08 (1,90/2,16)*	0,44 (0,41/0,47)*
	после лечения	2,44 (2,35/2,53)^	0,52 (0,49/0,53)*^
4 (Адеметионин+ЛК) n = 10	до лечения	2,08 (1,94/2,18)*	0,43 (0,41/0,46)*
	после лечения	2,60 (2,46/2,65)^	0,57 (0,53/0,59)^

Примечания: * – статистически значимые различия при сравнении с показателем 1 группы;
^ – статистически значимые различия от исходного значения показателя.

5.3 Обсуждение

Токсические повреждения печени у больных, злоупотребляющих психоактивные вещества, такие как алкоголь, психостимуляторы или опиоиды, были подтверждены определением классических маркеров цитолитического синдрома – АЛТ, АСТ, ЛДГ и ГГТ. В результате было установлено увеличение активности аминотрансфераз, но не ГГТ в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психостимуляторов или опиоидов в 2,0–3,0 раза, что вполне соответствует метаболическому профилю таких больных. В данной ситуации имеет место быть сравнительно низкоинтенсивное токсическое повреждение печени так как психоактивные вещества поступают в небольших дозировках, в которых оказывают сильное нейротропное действие. Дополнительным фактором повреждения печени у таких больных мог бы быть вирусный гепатит В или С, которые регистрировались у более 90 % больных выборки, но на момент обследования были в стадии ремиссии. Менее токсичный этиловый спирт для достижения наркотического эффекта поступает в больших дозировках, что отражается в более выраженном повреждении паренхимы печени, которое принято называть алкогольной болезнью печени. Среди общих маркеров печеночной патологии, которые считаются диагностическими критериями алкогольной болезни печени выделяют увеличение активности АСТ или ГГТ в 5 или более раз относительно нормы. В нашем исследовании была подобрана выборка, в которой активность АСТ превышала уровень значения аналогичного показателя контрольной группы в 5,5–6,5 раз, активность ГГТ – в 3,3–3,8 раза, что в совокупности с наличием «прямых» маркёров алкоголя в крови и моче позволяет набрать до 5 баллов по критериям диагностики алкогольной болезни печени. Такая лабораторная картина соответствует высокой степени вероятности наличия алкогольной болезни печени [Лазебник Л.Б. и соавт., 2020]. Легкая степень повреждения печени у больных с синдромом зависимости от психостимуляторов или опиоидов была также подтверждена отсутствием

статистически значимых изменений уровня человеческого сывороточного альбумина и общего билирубина в сыворотке крови. Для изменения данных показателей обычно требуется длительный срок развития и прогрессирования повреждений печени, характеризующегося декомпенсацией функции. При этом большие функциональные резервы печени позволяют эффективно компенсировать повреждения более 60–70 % гепатоцитов [13]. В соответствии с этим более высокая степень повреждения паренхимы печени была характерна для больных алкогольной болезнью печени в сыворотке крови которых было определено статистически значимое увеличение уровня общего билирубина – маркера состояния системы детоксикации.

Оценка эффективности проведения терапии, направленной на снижение выраженности повреждения печени у больных изученных категорий, показала недостаточную эффективность стандартного курса лечения, неспособного обеспечить снижение уровня маркеров цитолиза гепатоцитов в крови больных с синдромом зависимости от психостимуляторов и не обеспечивающего достаточного снижения аналогичных маркеров у больных с синдромом алкогольной зависимости. С учетом полученных данных стандартный курс лечения был дополнен введение энерготропного инфузионного гепатопротектора ремаксол, который показал ограниченную эффективность. Использование Ремаксол не оказало выраженного влияния на ситуацию с выраженностью цитолитического синдрома у больных, злоупотребляющих психостимуляторами, однако использование данного лекарственного препарата обеспечивало статистически значимо более низкий уровень маркеров цитолиза гепатоцитов в сравнение со значениями соответствующих показателей подгруппы после стандартной терапии. Ремаксол имеет комбинированный состав, включающий янтарную кислоту и коферменты энергетического обмена, тем не менее его состав не исключает возможности дальнейших модификаций, а результаты экспериментальных и клинических исследований подтверждают такую необходимость. Несмотря на то, что ремаксол позиционируется как средство антиоксидантной и антигипоксантажной направленности действия, прямых

антиоксидантов, обладающих восстановительной активностью и способных непосредственно нейтрализовать свободные радикалы, в его составе нет. Поэтому на наш взгляд перспективным направлением является добавление высокоактивных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота и липоевая кислота. Усиление таким образом ремаксоло в составе комплексной медикаментозной терапии больных с алкогольным поражением печени позволило снизить уровень маркеров цитолитического синдрома в еще большей степени, чем при стандартной терапии, дополненной только ремаксолом. Сохранение при этом уровня показателей, превышающих контрольные даже после метаболической терапии и сравнительно невысокая эффективность использования ремаксоло, могла быть обусловлена небольшим сроком наблюдения, составляющем 18–20 дней дезинтоксикационно-стабилизационного курса лечения. Обычно активность гепатопротекторных средств оценивается на более длительном промежутке времени, исчисляющимся несколькими месяцами. В нашем исследовании была проведена оценка эффективности метаболических препаратов на доклиническом этапе в остром эксперименте, поэтому и на клиническом этапе исследования был выбран сравнительно небольшой срок проведения терапии.

С учетом общей антиоксидантной направленности метаболической терапии, апробируемой в обсуждаемом клиническом исследовании, для полной оценки эффективности и анализа патофизиохимических механизмов было проведено определение параметров окислительного гомеостаза. Ключевыми среди таких параметров была общая антиоксидантная активность и тиобарбитуровое число, которые интегрально отражают состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса. В результате проведенных исследований ожидаемо были получены данные, подтверждающие развитие окислительного стресса у всех 3-х изученных категорий больных. Метаболический стресс в этих случаях имел декомпенсированный характер, так как проявлялся снижением антиоксидантного потенциала плазмы крови и увеличением образования продуктов свободнорадикальных повреждений биомолекул. Сниженный в равной степени уровень железо-восстанавливающей способности плазмы крови у больных разных

групп с разной выраженностью повреждения печеночной паренхимы свидетельствует о низком уровне специфичности данного показателя. Это в значительной степени интегральный показатель, уровень которого зависит от суммарного содержания в биологической жидкости веществ, обладающих восстановительной активностью: аскорбиновая кислота, полифенольные соединения, α -токоферол, тиолсодержащие соединения и др. В представленной работе были проанализированы изменения концентрации белковых тиоловых групп – эндогенных постоянных антиоксидантов в плазме крови. Концентрация витаминных антиоксидантов сильно зависит от режима питания и не сильно коррелирует с общей антиокислительной активностью, определенной натошак. Уровень тиоловых групп в плазме крови наоборот снижался аналогично общей антиоксидантной активности во всех группах на 18–24 %. Общим для данных 2-х лабораторных показателей было также сохранение низких значений даже после курса метаболической терапии. При этом наиболее активный рост железо-восстанавливающей способности плазмы крови был ассоциирован с наиболее значительным увеличением уровня SH-групп в крови больных с синдромом алкогольной зависимости после терапии, дополненной ремаксолом, аскорбиновой и липоевой кислотами. Коэффициенты корреляции между общей антиоксидантной активностью и содержанием тиоловых групп в плазме крови представлены в таблице 5.4. Как и ожидалось были получены коэффициенты, свидетельствующие о наличии сильной положительной связи между двумя анализируемыми маркерами.

Таблица 5.4 – Корреляционная взаимосвязь общей антиоксидантной активности и уровня тиоловых групп в плазме крови

Группы	Ранговые корреляции (попарное исключение)		
	R Пирсона	Гамма	p
К	0,72	0,67	0,01
О	0,88	0,71	< 0,001
П1	0,52	0,57	0,01
А1	0,74	0,53	< 0,001
Общая	0,75	0,57	< 0,001

Тиолсодержащие соединения в биожидкостях и клетках являются наиболее активными эндогенными антиоксидантами, что обусловлено наиболее низким редокс потенциалом SH-групп. В плазме крови низкомолекулярные тиолсодержащие соединения присутствуют в низких концентрациях, поэтому ключевую роль играют высокомолекулярный белки, в том числе человеческий сывороточный альбумин, в составе которого имеется 1 свободная SH-группа. Особенности окружения этой сульфгидрильной группы в пространственной структуре белка формирует разную доступность для реагентов, которые могут использоваться для ее определения. Особенно для такой крупной молекулы как 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота). С учетом некоторой гетерогенности альбуминовой фракции в плазме крови одновременно существуют относительно медленно- и быстро реагирующие SH-группы, которые можно также обозначить как легкодоступные и труднодоступные [16]. Легкодоступные тиоловые группы расположены на поверхности белковой глобулы или вблизи нее, труднодоступные SH-группы спрятаны внутрь или частично экранированы от окружения полипептидными цепями, аминокислотными остатками. Микрогетерогенность альбуминовой фракции белков плазмы крови связана с конформационными перестройками при окислении, гликировании, связывании с различными лигандами, которым могут относиться субстраты эндогенной интоксикации. Таким образом, перестройки конформации сывороточного альбумина могут наблюдаться при эндотоксикозе и окислительном стрессе и сопровождаются перераспределением разных фракций тиоловых групп [110, 223]. В настоящем исследовании также были получены данные, свидетельствующие не только об общем снижении уровня сульфгидрильных групп в плазме крови, но и о снижении доли труднодоступных SH-групп на фоне увеличения количества и доли легкодоступных тиоловых групп при развитии патологических процессов у больных всех 3-х категорий. Ожидаемое первостепенное реагирование поверхностных функциональных групп в данном случае себя не совсем оправдало. Однако вероятнее всего получаемый результат возникает вследствие конформационных перестроек при окислении быстро реагирующих

функциональных групп с последующим выходом на поверхность труднодоступных. Такая реакция системы тиолового гомеостаза плазмы крови может носить адаптационный характер, связанный с защитой высокочувствительных SH-групп от быстрого окисления и постепенным порционным высвобождением при расходе пула легкодоступных функциональных групп. Необходимость развития эндогенной системы защиты белковых тиоловых групп от окисления подтверждается использованием для этого низкомолекулярного тиолсодержащего трипептида глутатиона. Глутатион считается основным клеточным регулятором редокс гомеостаза, способным нейтрализовать радикалы и окислители за счет своей высокой восстановительной активности, конъюгировать с ксенобиотиками за счет своей высокой нуклеофильной активности. Эти реакции реализуются при участии ферментов – глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы. Но кроме того этот трипептид способен обратимо глутатионилировать белковые SH-группы за счет образования дисульфидных связей [143]. Считается, что это также механизм защиты их от окислительного стресса. Вероятно, дело в легкой обратимости окисления-восстановления самого глутатиона за счет работы НАДФН-зависимой глутатионредуктазы, в то время как восстановление окисленных белковых тиоловых групп является более сложной метаболической задачей. Другим предположением является то, что S-глутатионилирование играет важную роль в окислительно-восстановительном переключении белков, изменяя тем самым их функцию. Однако не совсем понятно о каких переключениях может идти речь применительно к человеческому сывороточному альбумину.

Оценка распределения фракций тиоловых групп позволила не только выявить наличие дисбаланса легко- и труднодоступных SH-групп, но и подтвердить эффективность антиоксидантной терапии, которая была не так заметна при анализе уровня общей антиоксидантной активности или общего содержания тиолсодержащих соединений в плазме крови. Анализ соотношения легко- и труднодоступных сульфгидрильных групп показал статистически значимое снижение данного коэффициента после терапии по любой из применяемых схем, в

том числе стандартной схемы без антиоксидантов. Это свидетельствует о высокой чувствительности рассматриваемого биохимического маркера к изменению состояния окислительного гомеостаза при проведении лечения, что позволяет рекомендовать его использование для лабораторного мониторинга и контроля эффективности терапии. Максимальной информативности можно достичь, совмещая определение более жесткого лабораторного критерия – суммарного содержания тиоловых групп или общей антиоксидантной активности с оценкой более лабильного показателя – соотношения фракций SH-групп. В таком случае можно наблюдать за частичной нормализацией окислительного гомеостаза на фоне стандартной терапии, нацеленной на коррекцию психического статуса пациентов, но можно также сделать объективный вывод о более высокой эффективности терапии, дополненной средствами антиоксидантной направленности. При этом в любом случае в течение 2-3 недель наблюдения исследуемые показатели не достигали нормальных значений, характерных для контрольной группы испытуемых лиц. Таким образом удастся дифференцировано подойти к оценке степени нарушений прооксидантно-антиоксидантного баланса у больных с токсическими повреждениями печени.

Дополнительным важным показателем тиолового звена антиоксидантной системы является концентрация восстановленной формы глутатиона, которая была определена в эритроцитарной взвеси испытуемых лиц. Глутатион – клеточный метаболит, поэтому для оценки его метаболизма имеет значение определение внутриклеточной концентрации. Содержание данного метаболита в эритроцитах было снижено относительно контроля во всех 3-х группах больных, что демонстрирует нарушения окислительного метаболизма не только в плазме, но и в клетках крови. Однако рассматриваемый метаболит в крови больных алкогольным гепатитом сравнительно легко восстанавливался до контрольных значений и даже выше на фоне антиоксидантной терапии с самостоятельным использованием ремаксола или при усилении его действия аскорбиновой и липоевой кислотами. Легкая обратимость нарушений метаболизма глутатиона в эритроцитах в сравнении дополнительно подтверждает необходимость защиты

тиоловых групп белков плазмы крови, которые восстанавливаются значительно медленнее – в течение нескольких недель.

В качестве компонента ферментного звена системы антиоксидантной защиты эритроцитов была определена активность каталазы, которой обычно очень много в данных форменных элементах крови. Анализ изменений данного показателя впервые продемонстрировал различия в окислительном профиле у пациентов разных групп. Здесь вероятно сказывается высокая вариабельность ферментных систем, активность которых может как легко увеличиваться, особенно в компенсаторной фазе окислительного стресса, так и снижаться на фоне декомпенсации. При этом изменения могут составлять более 100 % от исходного значения и достигать десятков раз. В настоящем исследовании были получены более скромные результаты, медианные значения которых были увеличены или снижены до 1,5 раз, однако для больных с синдромом зависимости от психостимуляторов или опиоидов были характерны увеличенные значения, тогда как для больных с синдромом алкогольной зависимости – наоборот сниженные. Различия могут быть связаны с особенностями генерации активных форм кислорода при интоксикации наркотиками и этиловым спиртом. Так как сама перекись водорода является положительным эффектором для каталазы, образование ее в микросомальной цепи окисления цитохромом P_{450} может индуцировать каталазную активность. В тоже время окисление этанола может быть реализовано в организме несколькими ферментными системами, основная из которых – алкогольдегидрогеназа, другая – микросомальная этанолюкисляющая система, которые локализованы в гепатоцитах. Однако третьим этанолюкисляющим ферментом является каталаза, активность которой при длительно употреблении алкоголя может также увеличиваться [28]. В нашем исследовании полученные данные могут указывать на декомпенсированный характер нарушения окислительного метаболизма у больных с синдромом алкогольной зависимости, что хорошо также подтверждается более высоким уровнем цитолиза гепатоцитов в сравнении с больными 2-х других групп. Плохой отклик на проведение терапии объясним хроническим характером заболевания и исходными значениями активности фермента вблизи контрольного уровня.

Наконец в качестве интегральной характеристики интенсивности свободнорадикальных процессов и окислительных повреждений биомолекул было рассмотрено тиобарбитуровое число или ТБК-реактивные продукты. Противоположно уровню общей антиоксидантной активности данный показатель имел тенденцию к росту, что дополняло классические представления о развитии окислительного стресса у изученных категорий больных. При анализе изменений концентрации ТБК-реактивных продуктов можно обратить внимание на более высокие значения у больных с синдромом зависимости от психостимуляторов или опиоидов, тогда как остальные изученные маркеры указывали на развитие более тяжелых метаболических нарушений у больных с синдромом алкогольной зависимости. Может быть несколько причин высокой интенсивности оксидативных модификаций биомолекул у данных категорий больных. Основная на наш взгляд – это индукция ферментных систем микросомального окисления, в том числе цитохрома P450, способного в побочной реакции генерировать АФК. Таким образом, развитие окислительного стресса может происходить разными механизмами при интоксикации и развитии синдрома зависимости в результате употребления наркотических веществ и этилового спирта. В первом случае первичным может быть интенсификация свободнорадикальных процессов, во втором – напряжение функционирования системы антиоксидантной защиты. В обоих случаях полученные данные свидетельствуют о развитии дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы. На примере снижения уровня ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси хорошо прослеживается эффективность метаболической терапии. В этом случае ремаксол демонстрирует лучшее снижение концентрации продуктов окислительных модификаций биомолекул в эритроцитах в сравнении со стандартной схемой терапии у больных, злоупотребляющих психостимуляторами. В крови больных аналогичный маркер окислительного стресса быстрее снижался при дополнении терапии ремаксолом, аскорбиновой кислотой и липоевой кислотой. Снижение маркеров метаболических нарушений или цитолитического синдрома после проведения терапевтических мероприятий легче отслеживалось на фоне значительного увеличения показателей, достигающего нескольких раз

относительно контроля. Это наглядно продемонстрировано на примерах изменения уровня активности аминотрансфераз в сыворотке крови, когда коррекция 5-7 кратного увеличения происходила сравнительно легко, тогда как у больных с синдромом зависимости о психостимуляторов 1,5–2,0 кратное увеличение маркеров цитолиза гепатоцитов не изменялось после терапии. Аналогичным образом, увеличенный на 70-90 % уровень тиобарбитурового числа после метаболической терапии с использованием антиоксидантов корректировался только на 10 %.

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать несколько промежуточных выводов. Во-первых, определены некоторые особенности развития окислительного стресса у больных с синдромом зависимости от разных психоактивных веществ. Установлено, что при формировании синдрома зависимости от психостимуляторов или опиоидов в развитии окислительного стресса первичное значение имеет интенсификация свободнорадикальных процессов, тогда как для больных с синдромом алкогольной зависимости первичное значение имеет напряжение функционального состояния и декомпенсация системы антиоксидантной защиты. Вторым выводом является подтверждение более высокой эффективности метаболической терапии с использованием ремаксола, аскорбиновой и липоевой кислот, позволяющей достичь не только нормализации нарушений окислительного гомеостаза, но и ускорить снижение выраженности цитолитического синдрома на 35–39 % относительно стандартного курса лечения в течение 18–20 суток.

Анализ особенностей влияния комбинированного использования серосодержащих гепатопротекторов также позволил сделать ряд важных наблюдений. Использование любого препарата по любой схеме, анализируемой в разделах 5.1 и 5.2, позволяло снизить выраженность цитолитического синдрома относительно исходного значения активности ферментных маркеров в сыворотке крови. Однако на самом деле это еще не свидетельствует о наличии истинного гепатопротекторного эффекта для подтверждения которого требовалось бы сравнение с плацебо. Тем не менее полученные данные позволили провести

сравнительное исследование эффективности снижения цитолиза гепатоцитов под действием той или иной схемы терапии. Так показано, что уровень активности АЛТ и ГГТ в сыворотке крови при сочетанном использовании адеметионина и липоевой кислоты статистически значимо ниже, чем уровень соответствующих маркеров в условии монотерапии. Такие результаты свидетельствуют о наличии синергетического эффекта при комбинированном использовании адеметионина и липоевой кислоты и являются обоснованием целесообразности применения этих гепатопротекторов в составе комплексного лечения больных алкогольным гепатитом.

Определение характера влияния серосодержащих препаратов на состояние окислительного гомеостаза показало, что большая часть изменений маркеров прооксидантно-антиоксидантного баланса обусловлена введением липоевой кислоты в составе моно- или комбинированной терапии. Адеметионин реализует свое защитное действие механизмом поддержки детоксикационной функции печени, независимым от повышения антиоксидантного потенциала способом. Более того прямой связи между антиоксидантной активностью вещества и гепатопротекторной эффективностью ни ранее, ни в настоящем исследовании не было установлено. Для обсуждения связи между антиоксидантной активностью и терапевтической эффективностью, заключающейся в снижении выраженности цитолиза гепатоцитов был проведен анализ корреляционных взаимосвязей между этими двумя параметрами (антиоксидантная активность и активность АЛТ в плазме / сыворотке крови). Активность АСТ, ЛДГ и ГГТ хорошо коррелируют с АЛТ при поражении печени, поэтому решено было остановиться только на одном лабораторном маркере цитолитического синдрома. При этом на этапе поступления больных алкогольным гепатитом была выявлена умеренная корреляция ($r = -0,3207$, $p = 0,0378$), что отражает взаимосвязь выраженности нарушений окислительного гомеостаза с тяжестью патологического процесса. Однако, после окончания курса дезинтоксикационно-стабилизационного лечения статистически значимой корреляции между рассматриваемыми показателями выявлено не было, что уже характеризует отсутствие влияния антиоксидантной активности напрямую на результат терапии.

Одним из механизмов синергетического действия адеметионина и липоевой кислоты может быть наличие разных молекулярных мишеней. Если адеметионин поддерживает детоксикационную функцию печени поставляя активную форму метионина – донора метильных групп, то липоевая кислота – кофермент пируватдегидрогеназного комплекса, обеспечивающего переход от анаэробных к аэробным энергетическими процессам, и мощный антиоксидант. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что альфа-липоевая кислота вызывает повышение уровня S-аденозилгомоцистеина и истощает уровень S-аденозилметионина [30]. Введение в этих условиях экзогенного адеметионина может быть дополнительным механизмом взаимного усиления эффектов двух препаратов.

Резюмируя данные, представленные и обсужденные в данной главе, можно сформулировать несколько промежуточных положений:

1) при формировании синдрома зависимости от психостимуляторов или опиоидов в развитии окислительного стресса первичное значение имеет интенсификация свободнорадикальных процессов, тогда как для больных с синдромом алкогольной зависимости первичное значение имеет напряжение функционального состояния и декомпенсация системы антиоксидантной защиты;

2) использование в клинических условиях при алкогольном повреждении печени ремаксолола совместно с аскорбиновой и липоевой кислотами позволяет добиться нормализации нарушений окислительного гомеостаза и ускорить снижение выраженности цитолитического синдрома на 35–39 % относительно стандартного курса лечения в течение 18–20 суток;

3) связь между антиоксидантной активностью крови и эффективностью гепатопротекторного действия не подтверждается ни в экспериментальных, ни в клинических исследованиях;

4) совместное использование адеметионина и липоевой кислоты у больных алкогольным гепатитом характеризуется синергетичностью действия и позволяет добиться лучшего результата снижения цитолиза гепатоцитов в сравнении с монотерапией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемически-реперфузионные повреждения являются одними из ключевых проблем критических состояний в реаниматологии [126], трансплантологии [122], хирургии, сопровождают нарушения кровообращения при сердечно-сосудистых заболеваниях, синдроме длительного сдавления и других клинических ситуациях [190]. Ведущая роль в патогенезе синдрома ишемии-реперфузии принадлежит интенсификации свободнорадикальных процессов. Многообразие источников АФК при ИРП печени является ее важной особенностью. Основными источниками считаются активированные клетки Купфера, нейтрофилы (НАДФН-оксидаза), цитохром P₄₅₀, ксантиноксидаза и электрон-транспортная цепь митохондрий [198, 201]. Однако целостная картина патофизиологии гипоксической патологии гепатобилиарной зоны до сих пор отсутствует, хотя подобные исследования необходимы для анализа компенсаторных возможностей систем регуляции гомеостаза, разработки диагностических технологий, поиска новых направлений метаболической коррекции ишемических и реперфузионных последствий сосудистой изоляции печени.

Для защиты от ИРП печени существует несколько стратегий, включая различные модификации метода ишемического кондиционирования [73, 191]. В настоящее время более перспективным считается разработка методов медикаментозной коррекции [173], основным недостатком которого является селективность действия препаратов на отдельные механизмы или сигнальные пути [184]. С учетом ключевой роли интенсификации свободнорадикальных процессов и эндогенной интоксикации значительный интерес представляет разработка и апробация эффективности инфузионных препаратов с комплексным составом на основе энерготропных средств.

Поэтому целью исследования было определение ключевых патофизиологических звеньев развития митохондриальной дисфункции при ишемически-реперфузионном повреждении печени и разработка способов

метаболической гепатопротекции с использованием энерготропных средств различной направленности действия.

Исследование фундаментальных особенностей ИРП печени позволило сделать несколько выводов об экспериментальных моделях. Сравнительный анализ различных вариантов васкулярной эксклюзии показал, что моделирование тотальной сосудистой изоляции печени продолжительностью около 20 минут не соответствует реальным клиническим ситуациям, хотя и может ограниченно использоваться для оценки гепатопротективной активности лекарственных препаратов. Преимуществом данной модели являются относительно сходные результаты с низкой степенью вариабельности. Предпочтительнее выглядит модель частичной сосудистой изоляции органа, позволяющая воспроизводить разные по объему повреждения, а также выполнять отдельный забор ишемизированных и интактных долей печени, с последующими сравнительными лабораторными исследованиями.

Для сравнения особенностей ишемии-реперфузии печени был проведен анализ динамики лабораторных показателей при одностороннем ИРП почки крыс. Общая направленность изменений окислительного гомеостаза совпадала — наблюдались тенденции к увеличению активности ферментов антиоксидантной системы в ишемической фазе. Однако выключение печени из системного кровотока сопровождалось более амплитудными изменениями с выраженной реакцией на восстановление кровотока, особенно в первые 5–10 минут. Системные изменения, определяемые в крови, при ИРП почки регистрируются на значительно более низком уровне, чем при повреждении печени, что во многом обусловлено объемом повреждаемой ткани и важной метаболической функцией гепатоцитов. Считается, что причиной полиорганных нарушений, особенно характерных для ИРП печени, является выброс в системный кровоток после ишемии отдаленных органов множества гуморальных медиаторов, в том числе цитокинов.

Для формирования картины динамики патобиохимических изменений на системном и органном уровнях у крыс был проведен анализ лабораторных

маркеров в крови и гомогенате печени в процессе ИРП печени. Анализ динамики маркеров острого повреждения печени в реперфузионном периоде показал, что определение изменений активности GST, как и концентрации лактата в плазме крови через 5 минут после восстановления кровотока позволяют оценить выраженность повреждения ткани факторами ишемии, тогда как изменения активности АЛТ (в 10,3 раза), АСТ (в 5,7 раза) и ЛДГ (в 10,0 раз) в большей степени определяются процессами, происходящими в реперфузионную фазу и достигают максимальной выраженности к 3 часам после восстановления кровотока. В течение 30 минут реперфузии регистрировали изменения микроэлементного гомеостаза, которые характеризовались выбросом из поврежденной паренхимы таких элементов как магний, цинк, железо, кремний с возрастанием их концентрации в плазме крови.

Анализ изменений окислительного гомеостаза показал развитие адаптивного усиления потенциала тиолового звена АОС крови в ишемический период. В ткани печени в первые 5–10 минут ишемии наоборот наблюдалось снижение активности ферментов системы глутатиона, что связано с ослаблением интенсивности окислительных процессов. Восстановление кровоснабжения печени сопровождалось еще более выраженными адаптивными изменениями системы глутатиона крови, а в ткани печени в реперфузионный период на фоне относительной гипероксии наблюдалось увеличение активности глутатионпероксидазы в 2–3 раза. Концентрация глутатиона в первые 10 минут реперфузии оставалась сниженной на 13–16 %, но затем восстанавливалась до контрольных значений, что отражает переход метаболических систем на адекватное поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса. Показано преобладание каталазной активности на системном и супероксиддисмутазной на органном уровне после восстановления кровотока. Кроме того, отмечалось увеличение активности исследуемых ферментов эритроцитарной взвеси и тенденция к прогрессирующему снижению активности этих же ферментов в ткани печени. Полученные данные указывают на необходимость метаболической поддержки АОС при ИРП печени.

Регрессионный анализ подтвердил, что цитолиз гепатоцитов может быть в значительной степени обусловлен нарушениями прооксидантно-антиоксидантного баланса, а уравнение регрессии может описать изменения уровня АЛТ влиянием 2 показателей – тиобарбитурового числа и антирадикальной активности плазмы крови:

$$\text{АЛТ (8 часов реперфузии)} = -321,1635 + 533,0977 * \text{ТБЧ} + 312,9255 * \text{АВТС}.$$

Важным замечанием является то, что несмотря на ограниченность патологического процесса паренхимой органа в ишемической фазе, еще до восстановления кровотока на системном уровне наблюдаются выраженные проявления окислительного стресса компенсаторного характера. Полученные имеют ценность для выбора моделей сосудистой изоляции печени в экспериментальной медицине, но могут быть также использованы для обоснования изменений показателей в клинической лабораторной диагностике заболеваний печени.

Другим важным аспектом, необходимым для разработки новых способов патогенетической терапии, является понимание локализации внутриклеточных событий при ИРП печени. Анализ изменений окислительного гомеостаза в цитозольной и митохондриальной фракциях позволил уточнить ряд деталей, недоступных анализу цельного гомогената ткани. Интересным наблюдением было превалирование изменений в цитозольной фракции над изменениями в суспензии митохондрий, выделенных из ткани печени крыс после ИРП. Это особенно заметно на примере глутатиона, концентрация которого в митохондриях совсем не изменялась на фоне ишемии и реперфузии, а также в митохондриальной суспензии в меньшей степени проявлялось увеличение уровня диеновых конъюгатов и общей антиоксидантной активности. Наиболее вероятным объяснением такого эффекта преимущественного реагирования цитозоля на окислительный стресс является большая емкость этого компартмента, который играет роль буфера в накоплении продуктов свободнорадикальных повреждений, а также меньший защитный потенциал антиоксидантной системы элементов цитозоля, сосредоточенный в основном в матриксе митохондрий. Это может быть

свидетельством целесообразности метаболической поддержки, ориентированной на цитозольную антиоксидантную систему, помимо общепринятого ориентира на разработку митохондриально-направленных средств. Здесь перспективной может быть разработка и использование комбинированных инфузионных лекарственных препаратов, таких как ремаксол, способных не только обеспечить нормализацию энергетического обмена, снижение уровня генерации АФК, но и удаление накапливающихся субстратов эндогенной интоксикации, в том числе продуктов оксидативных повреждений биомолекул в цитозоле клеток.

Для оценки митохондриальной дисфункции была определена способность митохондрий генерировать мембранный потенциал в условии развития ИРП печени. Полученные в исследовании данные отражают высокую лабильность функционального состояния митохондрий при ИРП печени. При этом основные негативные тенденции связаны с действием повреждающих факторов ишемического периода, в который мембранный потенциал неуклонно снижался практически до нулевых значений (10,1 (0/17,1) мВ) после 25-минутной сосудистой изоляции печени. В ранние сроки после восстановления кровотока рассматриваемый показатель имел тенденцию к восстановлению нормальных значений, наиболее отчетливо выраженную у крыс, подвергавшихся 10–15-минутной ишемии (до 102,6–154,7 мВ). Практически не изменялся (14,3 (8,3/21,2) мВ) мембранный потенциал митохондрий после 30 минут реперфузии при 20–25-минутной продолжительности предшествовавшего ишемического периода. В этот период важным представляется фармакологическая поддержка системы биоэнергетики клетки.

Одним из ключевых звеньев энергетического метаболизма является пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК). Впервые при моделировании васкулярной эксклюзии печени было установлено, что активность пируватдегидрогеназы (ПДГ) на 59 % выше в ишемический период, чем в реперфузионный. Полученные данные, ввиду развития метаболического блока энергоэффективного окисления глюкозы, являются основанием для поиска способов метаболической коррекции, нацеленной на регуляцию активности пируватдегидрогеназного комплекса.

Одной из стратегий метаболической профилактики ИРП печени является использование энерготропных средств. В результате оценки цитопротективной активности комбинированного энерготропного прекондиционирования ИРП печени было подтверждено синергетическое действие компонентов ремаксоло (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») с 1) липоевой кислотой; 2) липоевой и аскорбиновой кислотами; 3) α -токоферолом, липоевой и аскорбиновой кислотами. В крови животных этих групп были определены наиболее низкие значения активности ферментов-маркеров цитолиза гепатоцитов (АЛТ, АСТ и ЛДГ) в условии моделирования частичной сосудистой изоляции печени. Данные получены в сравнении с самостоятельным использованием одного из компонентов комбинированной схемы кондиционирования. Таким образом, ключевая гипотеза о более высокой эффективности использования ремаксоло с антиоксидантами прямого механизма действия была подтверждена.

Перспективной возможностью повышения эффективности фармакологического прекондиционирования ИРП является воздействие на ПДК. В эксперименте использовали активатор (ДХА натрия) и коферменты (тиаминпирофосфат и липоевая кислота) мультиферментного комплекса. Оценка цитопротективной активности препаратов-модификаторов ПДК показала наличие таковой только у ДХА натрия. Предварительное введение ДХА натрия способствовало росту активности ПДГ в 2–3 раза в условии ишемии или реперфузии, снижению уровня лактата, активности ЛДГ, АСТ и АЛТ в плазме крови. Было показано, что наиболее вероятным механизмом цитопротективного действия ДХА натрия является имитация ишемического прекондиционирования опосредованная интенсификацией образования активных форм кислорода в стадии васкулярной эксклюзии органа. Это подтверждалось антагонизмом с антиоксидантами и непосредственно прооксидантным действием препарата по данным усиления генерации АФК на 13 % в суспензии гепатоцитов в условии преинкубации с активатором ПДК и влиянием на антиоксидантную активность и накопление 8-OHdG в ткани печени в ишемическую фазу. Низкоинтенсивный окислительный стресс в этих условиях имеет адаптивные последствия для

системы неспецифической резистентности организма, что проявляется в повышении защитного потенциала антиоксидантной системы и снижении интенсивности свободнорадикальных процессов в фазе реперфузии. Дополнительно установлено, что защита печени от повреждающего действия ИРП возможна с использованием эффекта прооксидантного preconditionирования путем прямого введения окислителей (0,5 % раствор ГПТБ 1 мл внутривенно) в организм животного перед моделированием сосудистой изоляции печени.

Общие звенья патогенеза при ишемии-реперфузии и интоксикации ксенобиотиками позволяют оценить эффективность разрабатываемых способов метаболической коррекции у больных с токсическими формами гепатита. В результате была подтверждена более высокая эффективность комбинированной метаболической терапии с использованием ремаксола, аскорбиновой и липоевой кислот, позволяющей достичь не только нормализации нарушений окислительного гомеостаза, но и ускорить снижение выраженности цитолитического синдрома на 35–39 % относительно стандартного курса лечения в течение 18–20 суток. В клинических условиях установлено наличие синергетического эффекта при комбинированном использовании адеметионина и липоевой кислоты для лечения алкогольного гепатита. Одним из механизмов синергетического действия адеметионина и липоевой кислоты может быть наличие разных молекулярных мишеней. После окончания курса дезинтоксикационно-стабилизационного лечения статистически значимой корреляции между антиоксидантной активностью и маркерами цитолитического синдрома выявлено не было, что характеризует отсутствие влияния антиоксидантной активности напрямую на результат терапии.

Полученные данные расширили представления о патофизиологических механизмах развития ишемически-реперфузионного повреждения печени. Экспериментальные исследования позволили создать систему рекомендаций по обоснованному выбору модели сосудистой изоляции печени у лабораторных животных. Проведен скрининг эффективности энерготропных средств для коррекции цитолиза гепатоцитов, что позволило определить направления

разработки новых комбинированных метаболических гепатопротекторов. Впервые обозначена роль пируватдегидрогеназного комплекса в развитии ишемически-реперфузионного повреждения печени. Описаны механизмы цитопротективного действия дихлорацетата натрия, впервые доказана эффективность прооксидантного preconditionирования. На основании экспериментальных исследований разработан ряд подходов к диагностике окислительного стресса, которые апробированы в клинических условиях у больных с поражением печени. Выполнено биохимическое обоснование эффективности использования ремаксолола в составе комбинированной дезинтоксикационной терапии у больных наркологического профиля.

Выводы

1. В экспериментальной практике предпочтительнее модели частичной сосудистой изоляции печени, которые позволяют воспроизводить разные по объему повреждения, легко пролонгировать сосудистую изоляцию вплоть до необратимых изменений в паренхиме и развития полиорганных нарушений после восстановления кровотока. Методическим преимуществом частичной сосудистой изоляции печени является возможность отдельного взятия долей, постишемических и интактных, для более объективного сравнения.

2. Динамика изменений маркеров цитолитического синдрома позволяет дифференцированно судить о вкладе ишемии и реперфузии в развитие повреждения печени. Определение изменений активности глутатионтрансферазы и концентрации лактата в плазме крови в течение 5 минут после восстановления кровотока позволяют оценить выраженность повреждения ткани факторами ишемии, тогда как изменения активности аминотрансфераз и лактатдегидрогеназы определяются процессами, происходящими в реперфузионную фазу патологического процесса.

3. Уровень цитолиза гепатоцитов в условии экспериментального ишемически-реперфузионного повреждения печени может быть в значительной степени описан нарушениями прооксидантно-антиоксидантного баланса, а уравнение линейной регрессии демонстрирует, что изменения уровня аланинаминотрансферазы на 90–94 % обусловлены влиянием 2 факторов – ТБК-реактивными продуктами и антирадикальной активностью крови.

4. Установлено, что при моделировании васкулярной эксклюзии печени активность пируватдегидрогеназы на 59 % выше в ишемический период, чем в реперфузионный. Предварительное введение дихлорацетата натрия способствует поддержанию высокой активности пируватдегидрогеназы, превышающей в 1,7–1,8 раза контрольный уровень, и в ишемической и в реперфузионной фазах повреждения печени, что обеспечивает переход к аэробным процессам после восстановления кровотока.

5. В условии моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени в цитозольной фракции гомогената изменения окислительного гомеостаза превалируют над изменениями в суспензии митохондрий. Концентрация глутатиона в митохондриях не изменялась на фоне ишемии и реперфузии, минимальными были изменения концентрации диеновых конъюгатов и общей антиоксидантной активности. В цитозольной фракции увеличение антиоксидантной активности составляло 33–38 %, диеновых конъюгатов – 40 % в ишемической фазе и 2,2 раза после реперфузии. Концентрация глутатиона в цитозоле в условии ишемии была снижена на 28 %, после реперфузии – в 2,2 раза.

6. Изменения микроэлементного гомеостаза при развитии ишемии-реперфузии печени характеризуется выбросом из поврежденной паренхимы и увеличением концентрации в плазме крови магния на 64 %, цинка на 91 %, железа в 5,8 раз, кремния на 50 % через 15 минут после восстановления кровотока с возвращением нормальных значений спустя 3 часа. В этих условиях хелаторы ЭДТА (1 мл 0,2 %) и дефероксамин (50 мг/кг) продемонстрировали защитное действие, опосредованное ингибированием свободнорадикальных процессов. Действие селективного хелатора ионов железа характеризовалось сниженным значением активности аланинаминотрансферазы в 2,1 раза, аспаратаминотрансферазы – в 2,6 раза, лактатдегидрогеназы – в 2,3 раза после 40-минутной частичной сосудистой изоляции печени и 180-минутной реперфузии относительно группы крыс, которым вводили физиологический раствор.

7. Повышение гепатопротекторной активности комбинированного энерготропного препарата (ЛП-№ (002562)-(РГ-RU) от 19.06.2023), содержащего метионин, сукцинат и коферменты энергообмена, возможно за счет дополнительного введения антиоксидантов прямого механизма действия – витамина С и липоевой кислоты. В этом случае синергетическое действие в условии экспериментального моделирования ишемически-реперфузионного повреждения печени характеризовалось сниженными в 2,0–2,8 раза значениями активности аминотрансфераз в плазме крови относительно данных, полученных в условии монотерапии.

8. Цитопротективное действие дихлорацетата натрия при ишемии-реперфузии печени связано с эффектом индукции низкоинтенсивного окислительного стресса и имитации опосредованных активными формами кислорода сигнальных путей защитного действия ишемического preconditionирования. Это подтверждено антагонизмом с антиоксидантами, интенсификацией генерации активных форм кислорода на 13 % в суспензии гепатоцитов в условии преинкубации с дихлорацетатом натрия, подавлением антиоксидантной активности на 28 % и увеличением образования 8-ОН-дезоксигуанозина на 19 % при моделировании сосудистой изоляции печени, что опосредует адаптивные реакции системы антиоксидантной защиты после восстановления кровотока.

9. При подборе дозировки и схемы введения вещества прооксидантной направленности, такие как гидроперексид трет-бутила, способны индуцировать низкоинтенсивный окислительный стресс, оказывающий защитное действие в условии моделирования сосудистой изоляции печени.

10. Связь между антиоксидантной активностью и эффективностью гепатопротекторного действия не подтвердилась ни в экспериментальных, ни в клинических исследованиях. После окончания курса дезинтоксикационно-стабилизационного лечения больных с синдромом зависимости от алкоголя и психостимуляторов статистически значимой корреляции между антиоксидантной активностью и маркерами цитолиза гепатоцитов не было выявлено.

11. Апробация эффективности комбинированной энерготропной терапии с использованием ремаксолола, витамина С и липоевой кислоты в клинических условиях при алкогольном повреждении печени продемонстрировала возможность достижения нормализации нарушений окислительного гомеостаза и снижения выраженности цитолитического синдрома на 35–39 % относительно стандартного курса лечения и монотерапии в течение 18–20 суток.

Практические рекомендации

1. С целью объективизации сравнительного анализа патобиохимических процессов, протекающих в условиях ишемически-реперфузионного повреждения печени и минимизации влияния неоднородности лабораторных животных, целесообразно моделирование частичной сосудистой изоляции органа с пережатием интересующих сосудистых ножек и отдельным забором постишемических и интактных долей печени для лабораторных и гистологических исследований.

2. Пиковый рост активности глутатионтрансферазы и концентрации лактата в плазме крови в течение 5 минут реперфузии после моделирования ишемически-реперфузионного повреждения свидетельствует о возможности использования этих маркеров для оценки повреждения печени в ишемической фазе. Постепенное увеличение активности аминотрансфераз и лактатдегидрогеназы с достижением пика к 60–180 минутам позволяет дифференцировано оценить вклад реперфузионных повреждений в развитие патологического процесса.

3. В экспериментальных условиях для изучения защиты печени от ишемически-реперфузионного повреждения возможно выполнение приема прооксидантного preconditionирования путем внутрибрюшинного введения 1 мл 0,5 % раствора гидроперекиси трет-бутила или 1 мл 100 мг/100 г дихлорацетата натрия за 1 сутки и за 30 минут перед сосудистой изоляцией.

4. Для профилактики ишемически-реперфузионного повреждения печени возможно фармакологическое preconditionирование с использованием хелатором ионов металлов с переменной валентностью. Преимуществом перед ЭДТА ввиду более низкой токсичности и более высокой эффективности имеет селективный хелатор ионов железа – дефероксамин (50 мг/кг).

5. Пути повышения эффективности гепатопротекторных средств связаны с разработкой и использованием инфузионных комбинированных энерготропных

препаратов. Перспективным направлением является комбинированное использование препаратов на основе сукцината и метионина с хелаторами ионов металлов с переменной валентностью и антиоксидантами прямого механизма действия, такими как витамин С, α -липоевая кислота, α -токоферол.

6. Для лабораторного мониторинга синдрома зависимости от психостимуляторов или опиоидов первичное значение имеют маркеры свободнорадикальных повреждений биомолекул (ТБК-реактивные продукты, 8-ОН-дезоксигуанозин), а для синдрома алкогольной зависимости более информативны маркеры функционального состояния системы антиоксидантной защиты (общая антиоксидантная активность, глутатион, каталаза, тиоловые группы).

7. Для достижения лучших результатов купирования цитолитического синдрома в клинических условиях у больных алкогольным гепатитом целесообразно использованием ремаксол (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») 400 мл 1 раз в день в течение 10 дней со скоростью внутривенной инфузии 2–3 мл/мин совместно с введением витамина С (10 % раствор по 2 мл/сут) и липоевой кислоты (30 мг/мл 10 мл/сутки). Это обеспечивает нормализацию окислительного гомеостаза и ускорение снижения ферментов-маркеров цитолиза гепатоцитов на 35–39 % относительно монотерапии в течение 18–20 суток.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Представленные в работе данные детально описывают изменения окислительного гомеостаза, цитолиза гепатоцитов и дисбаланса микроэлементного гомеостаза в ранние сроки реперфузионного периода – до суток после восстановления кровотока в паренхиме печени. Существенный интерес представляет продолжение исследования с описанием изменений аналогичных патобиохимических звеньев в более поздние сроки, что связано с воспалительными изменениями, наблюдающимися спустя 6–48 часов после реперфузии и обусловленными рекрутированными нейтрофилами, цитокинами и компонентами системы комплемента. Фундаментальный и практический интерес представляет описание взаимосвязи патобиохимических изменений на системном и местном уровнях с развитием осложнений ишемически-реперфузионного повреждения печени, в том числе печеночной недостаточности и полиорганной дисфункции. Такие исследования имеют интерес, связанный с разработкой прогностических лабораторных маркеров. Анализ медикаментозных подходов к прекодиционированию реперфузионного синдрома позволил наметить ряд перспективных направлений поиска и разработки новых терапевтических средств, способных снизить последствия ишемических и токсических повреждений печени. Было впервые показано, что имеет существенный потенциал разработка цитопротективных средств, основанных на влиянии на функциональное состояние пируватдегидрогеназного комплекса, проведено обоснование использования хелаторов и прооксидантных факторов в качестве терапевтических средств. Тем не менее разработка безопасных и эффективных цитопротекторов вышеперечисленных групп является предметом перспективных исследований. Одним из многообещающих подходов для защиты печени от ишемически-реперфузионных и токсических повреждений является использование комбинированных энерготропных средств. Оптимизация состава и схем использования таких лекарственных препаратов с включением новых

компонентов — антиоксидантов прямого механизма действия, модификаторов пируватдегидрогеназного комплекса, прооксидантов, хелаторов и др. являются перспективным направлением биохимии и фармакологии. При этом сочетанное использование хорошо известных и разрешенных к самостоятельному применению лекарственных веществ и биологически активных добавок должны облегчить путь разработки и практического внедрения комбинированных препаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ	— аланинаминотрансфераза
АОА	— антиоксидантная активность
АОС	— антиоксидантная система
АСТ	— аспартатаминотрансфераза
АТФ	— аденозинтрифосфорная кислота
АФК	— активные формы кислорода
ВКМ	— внеклеточный матрикс
GST	— глутатионтрансфераза
ГПО	— глутатионпероксидаза
ГПТБ	— трет-бутил гидропероксид
ГР	— глутатионредуктаза
ДК	— диеновые конъюгаты
днкРНК	— длинные некодирующие рибонуклеиновые кислоты
ДХА	— дихлорацетат натрия
ЗК	— звездчатые клетки печени
ИДГ2	— митохондриальная НАДФ ⁺ -зависимая изоцитратдегидрогеназа 2
ИЛ	— интерлейкин
ИПК	— ишемическое preconditionирование
ИРП	— ишемически-реперфузионное повреждение
ИРС	— ишемически-реперфузионный синдром
ИФН-γ	— интерферон гамма
КАТ	— каталаза
КДГ	— ксантиндегидрогеназа
КК	— клетки Купфера
КО	— ксантиноксидаза
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа

МАО	— моноаминоксидаза
МАРК	— митоген-активируемые протеинкиназы
ММП	— матриксные металлопротеиназы
мтДНК	— митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота
НАЖБП	— неалкогольная жировая болезнь печени
ОС	— окислительный стресс
ПДГ	— пируватдегидрогеназа
ПДК	— пируватдегидрогеназный комплекс
ПДС	— печеночно-двенадцатиперстная связка
СОД	— супероксиддисмутаза
СЭК	— синусоидальные эндотелиальные клетки печени
ТБК	— тиобарбитуровая кислота
ТБЧ	— тиобарбитуровое число
ФНО-α	— фактор некроза опухоли-альфа
α-3,5-АМФ	— циклический-3,5-аденозинмонофосфат
ЦПЭ	— цепь переноса электронов, дыхательная цепь
АВTS	— метод оценки способности радикальной сорбции
АКТ	— киназы семейства протеинкиназ В
АМРК	— 5'-аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
ARE	— антиоксидант-респонсивный элемент
ASK1	— киназа, регулирующая сигнал к апоптозу, тип 1
АTG	— белки, связанные с аутофагией
bcl-2	— регулятор апоптоза
bcl-x	— антиапоптотический трансмембранный митохондриальный белокTS
Beclin-1	— белок клеточной системы аутофагии
DAMP	— дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны
Drp	— белки, связанные с динамином
eNOS	— эндотелиальная синтаза оксида азота

ERK	– внеклеточные сигнал-регулируемые киназы
FAM3A	– сигнальная молекула A, регулирующая метаболизм FAM3
Fis1	– митохондриальный белок деления 1
FRAP	– железо-восстанавливающая способность
GLUT	– глюкозный транспортер
GSH	– восстановленный глутатион
H₄БП	– тетрагидробиоптерин
HGF	– фактор роста гепатоцитов
HIF-1α	– фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа
HO-1	– гемоксигеназа
ICAM-1	– молекула клеточной адгезии
iNOS	– индуцибельная синтаза оксида азота
JNK	– c-Jun-N-терминальная киназа
Keap1	– Kelch-подобный ECH-ассоциированный протеин 1
KLF2	– транскрипционный фактор, участвующий в дифференцировке и регуляции функциональной активности моноцитов и Т-лимфоцитов, адипоцитов и клеток сосудистого эндотелия
LC3	– убиквитин-подобный белок, маркер аутофагии
Mff	– митохондриальный фактор деления
Mfn	– митофузины
MID	– митохондриальные динамические белки
MIP-2	– воспалительный белок макрофагов
miR	– микроРНК, малые некодирующие рибонуклеиновые кислоты
mPTP	– митохондриальная пора
mTOR	– механическая мишень рапамицина
NAC	– N-ацетилцистеин
NF-κB	– транскрипционный ядерный фактор «каппа-би», контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла
NGAL	– липокалин 2

NK-клетки	— естественные клетки-киллеры
NLRP3	— цитозольный белок, основной компонент одноимённого типа инфламмасом
NO	— оксид азота
NOS	— синтаза оксида азота
NOX	— НАДФН-оксидазы
Nrf2	— NF-E2-связанный фактор 2, редокс-чувствительный ядерный транскрипционный фактор эндогенного антиоксидантного ответа
OPA1	— митохондриальный динаминоподобный белок
p38	— митоген-активируемая протеинкиназа
Parkin	— цитозольная E3-убиквитинлигаза
PGC-1α	— коактиватор 1 альфа γ -рецептора-активатора пролиферации пероксисом
PI3K	— фосфоинозитид-3-киназа
PINK1	— PTEN-индуцированная киназа 1, митохондриальная серин/треонин-протеинкиназа
PPAR	— рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами
PRR	— рецепторы распознавания молекулярных паттернов
SIRT1	— сиртуин-1 НАД-зависимая деацетилаза
STAT-3/4	— сигнальные белки и активаторы транскрипции
TLR	— Toll-подобные рецепторы
ULK1	— киназа, активирующая аутофагию
VCAM-1	— васкулярная молекула клеточной адгезии
VDAC	— потенциалзависимый анионный канал
VEGF	— фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов, В. Е. Липоевая кислота и аспекты ее клинического применения / В. Е. Анисимов // Казанский медицинский журнал. – 1966. – Т. 47 (3) – С. 74–79.
2. Двустороннее нефропротективное влияние новокаиновой блокады в условиях моделирования односторонней ишемии-реперфузии почки в эксперименте / О. И. Кит, Е. М. Франциянц, С. Н. Димитриади [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2015. – Т. 3. – С. 12–17.
3. Ильченко, Л. Ю. Клинико-экономическая эффективность препарата Ремаксол в лечении алкогольного гепатита в реальной практике / Л. Ю. Ильченко, С. А. Парфенов, И. Е. Тумаев // Архивъ внутренней медицины. – 2024. – Т. 14. – № 1(75). – С. 23–29.
4. Индукция гипометаболизма у клеток прокариот ионами Ca^{2+} / А. Б. Маргулис, М. А. Данилова, П. В. Зеленихин, В. Я. Пономарев [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16. – № 13. – С. 145–147.
5. Карпищенко, А. И. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред. А. И. Карпищенко. – 3-е изд., перераб. и доп. – Т. 1. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 472.
6. Клинические рекомендации: алкогольная болезнь печени у взрослых / Л. Б. Лазебник, Е. В. Голованова, Е. Ю. Еремина [и др.] // Терапия. – 2020. – № 4(38). – С. 10–35.
7. 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. – Т. 2. – С. 88–91.
8. Лемза, С. В. Сравнительный анализ растительного средства "Нефрофит" и "Цитофлавина" при экспериментальной ишемии/реперфузии почек / С. В. Лемза, А. В. Федорова // Sciences of Europe. – 2016. – Т. 3–1(3). – С. 23–26.

9. Метаболические и структурные изменения в печени экспериментальных животных после коррекции повреждений, вызванных высокими дозами ацетаминофена / Г. В. Тимашева, Э. Ф. Репина, А. Б. Бакиров [и др.] // Медицина труда и экология человека. – 2022. – Т. 3(31). – С. 102–114.

10. Метгемоглобин, активность каталазы и супероксиддисмутазы в ядерных эритроцитах *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) в условиях экспериментальной гипоксии (in vitro) / А. А. Солдатов, А. Ю. Андреева, Т. А. Кухарева, Т. И. Андреев // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – № 3. – С. 534–542.

11. Мусатов, О. В. Динамика индикаторных ферментов сыворотки крови в зависимости от видов операций при разрыве почки в эксперименте / О. В. Мусатов, С. А. Зурнаджан, А. В. Коханов // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – Т. 1. – С. 16–19.

12. Не настало ли время слома митохондриальной парадигмы и установления митохондриальной номенклатуры? / Д. Б. Зоров, Л. Д. Зорова, Н. В. Андрианова [и др.] // Биохимия. – 2022. – Т. 87. – № 12. – С. 1868–1880.

13. Обширная резекция печени у ребенка при экстремально низком объеме будущего остатка / Д. Г. Ахаладзе, Г. С. Рабаев, Н. Н. Меркулов [и др.] // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2021. – Т. 20. – № 4. – С. 139–144.

14. Патент № 2629391 С Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ оценки резистентности организма к воздействию прооксидантных факторов: № 2017108048: заявл. 10.03.2017: опубл. 29.08.2017 / К. А. Попов, И. М. Быков, А. А. Басов [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. – Бюл. № 25. – 16 с.

15. Перекисное окисление липидов биомембран и его ферментативная регуляция при старении крыс / В. В. Лемешко, Ю. В. Никитченко, И. В. Свич, С. Е. Овсянников // Укр. биохим. журн. – 1987. – Т. 59. – № 2. – С. 50–57.

16. Перекисное окисление липидов и окисленность белков плазмы крови и мембран эритроцитов матери при абдоминальном родоразрешении с использованием программы ускоренного выздоровления / Д. Р. Меджидова,

Е. М. Шифман, А. У. Черкесова, Д. У. Черкесова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2020. – Т. 19. – № 3. – С. 57–62.

17. Рязанцева, Л. Т. Ферменты-антиоксиданты: структурно-функциональные свойства и роль в регулировании метаболических процессов / Л. Т. Рязанцева // Вестник Воронежского государственного технического университета. – 2011. – Т. 7. – № 2. – С. 126–129.

18. Сафранин О как флуоресцентный индикатор мембранного потенциала митохондрий: исследование на уровне суспензии и уровне отдельных митохондрий / И. В. Перевощикова, А. И. Сорочкина, Д. Б. Зоров, Ю. Н. Антоненко // Биохимия. – 2009. – Т. 74(6). – С. 814–824.

19. Субботина, А. В. Описательная статистика и проверка нормальности распределения количественных данных / А. В. Субботина, А. М. Гржибовский // Экология человека. – 2014. – № 2. – С. 51–57.

20. Унгурияну, Т. Н. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях / Т. Н. Унгурияну, А. М. Гржибовский // Экология человека. – 2011. – № 5. – С. 55–60.

21. Чещевик, В. Т. Мембранный потенциал митохондрий гепатоцитов крыс при токсическом поражении печени / В. Т. Чещевик // Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук. – 2010. – Т. 2. – С. 75–80.

22. 25-Hydroxycholesterol Mitigates Hepatic Ischemia Reperfusion Injury via Mediating Mitophagy / Q. Cao, J. Luo, Y. Xiong [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2021. – Vol. 96. – P. 107643.

23. Acidic Microenvironment Aggravates the Severity of Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury by Modulating M1-Polarization Through Regulating PPAR- γ Signal / W. Ding, Y. Duan, Z. Qu [et al.] // Front Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 697362.

24. Activation of iNKT Cells Facilitates Liver Repair After Hepatic Ischemia Reperfusion Injury Through Acceleration of Macrophage Polarization / T. Goto, Y. Ito, M. Satoh [et al.] // Front Immunol. – 2021. – Vol. 6 (12). – P. 754106.

25. Adam-Vizi, V. The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress / V. Adam-Vizi, L. Tretter // *Neurochem.* – 2013. – Vol. 62. – P. 757–763.
26. Addition of berberine to preservation solution in an animal model of ex vivo liver transplant preserves mitochondrial function and bioenergetics from the damage induced by ischemia/reperfusion / R. Martins, A. Pinto Rolo, J. Soeiro Teodoro [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19. – P. 284.
27. Aging Aggravates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Mice by Impairing Mitophagy with the Involvement of the EIF2 α -Parkin Pathway / Y. Li, D. Ruan, C. Jia [et al.] // *Aging.* – 2018. – Vol. 10. – P. 1902–1920.
28. Alcohol Metabolizing Enzymes, Microsomal Ethanol Oxidizing System, Cytochrome P450 2E1, Catalase, and Aldehyde Dehydrogenase in Alcohol-Associated Liver Disease / Y. Jiang, T. Zhang, P. Kusumanchi [et al.] // *Biomedicines.* – 2020. – V. 8(3). – P. 50.
29. 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 [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 14.
30. Alpha-lipoic acid induces elevated S-adenosylhomocysteine and depletes S-adenosylmethionine / S. P. Stabler, J. Sekhar, R. H. Allen [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2009. – V. 47 (8). – P. 1147–53.
31. Alpha-lipoic acid: A promising adjuvant for nonsteroidal anti-inflammatory drugs therapy with improved efficacy and gastroprotection / E. N. Barut, S. Engin, İ. Saygın [et al.] // *Drug Dev Res.* – 2021. – V. 82(6) – P. 844–851.
32. AMP-Activated Protein Kinase: An Attractive Therapeutic Target for Ischemia-Reperfusion Injury / R. Ding, W. Wu, Z. Sun, Z. Li // *Eur. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 888. – P. 173484.
33. AMPK: The key to ischemia-reperfusion injury / J. Cai, X. Chen, X. Liu [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2022. – Vol. 237 (11). – P. 4079–4096.
34. Annesley, S. J. Mitochondria in Health and Disease / S. J. Annesley, P. R. Fisher // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – P. 680.

35. Antioxidant capacity and hepatoprotective role of chitosan-stabilized selenium nanoparticles in concanavalin A-induced liver injury in mice / K. Bai, B. Hong, J. He, W. Huang // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12 (3). – P. 857–872.
36. Antioxidants Facilitate High-intensity Exercise IL-15 Expression in Skeletal Muscle / A. Pérez-López, M. Martin-Rincon, A. Santana [et al.] // *Int J Sports Med*. – 2019. – V. 40(1). – P. 16–22.
37. Augmenter of liver regeneration-mediated mitophagy protects against hepatic ischemia/reperfusion injury / W. N. Kong, W. Li, C. Bai [et al.] // *Am J Transplant*. – 2022. – Vol. 22 (1). – P. 130–143.
38. Autophagy in Ischemic Livers: A Critical Role of Sirtuin 1/Mitofusin 2 Axis in Autophagy Induction / S. K. Chun, K. Go, M. J. Yang [et al.] // *Toxicol. Res*. – 2016. – Vol. 32. – P. 35–46.
39. Bahar Halpern, K. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver / K. Bahar Halpern // *Nature*. – 2017. – Vol. 542. – P. 352–356.
40. Bakula, D. MitophAging: Mitophagy in Aging and Disease / D. Bakula, M. Scheibye-Knudsen // *Front. Cell Dev. Biol*. – 2020. – Vol. 8. – P. 239.
41. Ben-Moshe, S. Spatial Heterogeneity in the Mammalian Liver / S. Ben-Moshe, S. Itzkovitz // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. – 2019. – Vol. 16. – P. 395–410.
42. Beraprost sodium preconditioning prevents inflammation, apoptosis, and autophagy during hepatic ischemia-reperfusion injury in mice via the P38 and JNK pathways / J. Deng, J. Feng, T. Liu [et al.] // *Drug Des Devel Ther*. – 2018. – Vol. 12. – P. 4067–4082.
43. Bilirubin as a metabolic hormone: the physiological relevance of low levels / J. F. Creeden, D. M. Gordon, D. E. Stec, T. D. Hinds // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2021. – V. 320(2). – P. 191–207.
44. Bock, F. J. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death / F. J. Bock, S. W. G. Tait // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2020. – Vol. 21 (2). – P. 85–100.

45. Bruton tyrosine kinase inhibition attenuates liver damage in a mouse warm ischemia and reperfusion model / T. Palumbo, K. Nakamura, C. Lassman [et al.] // *Transplantation*. – 2017. – Vol. 101. – P. 322–331.
46. Bugger, H. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling / H. Bugger, K. Pfeil // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. – 2020. – Vol. 1866 (7). – P. 165768.
47. Cadenas, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection // *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. – 2018. – Vol. 1859 (9). – P. 940–950.
48. Cafestol preconditioning attenuates apoptosis and autophagy during hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting ERK/PPAR γ pathway / J. Ji, L. Wu, J. Feng [et al.] // *Int Immunopharmacol*. – 2020. – Vol. 84. – P. 106529.
49. Calabrese, G. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions / G. Calabrese, B. Morgan, J. Riemer // *Antioxid Redox Signal*. – 2017. – Vol. 27 (15). – P. 1162–1177.
50. Calcium in red blood cells-a perilous balance / A. Bogdanova, A. Makhro, J. Wang [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2013. – V. 14(5). – P. 9848–72.
51. Cellular and functional loss of liver endothelial cells correlates with poor hepatocyte regeneration in acute-on-chronic liver failure / S. Shubham, D. Kumar, S. Rooge [et al.] // *Hepatol Int*. – 2019. – Vol. 13 (6). – P. 777–787.
52. Chinopoulos, C. Succinate in ischemia: Where does it come from? / C. Chinopoulos // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2019. – Vol. 115. – P. 105580.
53. Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF- κ B Activation: A Review of the Molecular Mechanisms / J. Korbecki, D. Simińska, M. Gąssowska-Dobrowolska [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22 (19). – P. 10701.
54. Clinical Applicability of Conditioning Techniques in Ischemia-Reperfusion Injury: A Review of the Literature / K. Kumar, N. Singh, A. S. Jaggi, L. Maslov // *Curr Cardiol Rev*. – 2021. – Vol. 17 (3). – P. 306–318.

55. Combined administration of silymarin and vitamin C stalls acetaminophen-mediated hepatic oxidative insults in Wistar rats / S. Sabiu, T. O. Sunmonu, E. O. Ajani, T. O. Ajiboye // *Rev. Bras. Farm.* – 2015 – V. 25 – P. 29–34.

56. Comparison of BQ123, epoprostenol, and verapamil as vasodilators during normothermic ex vivo liver machine perfusion / J. Echeverri, N. Goldaracena, J.M. Katho [et al.] // *Transplantation.* – 2018. – Vol. 102. – P.601–608.

57. Comparison of hepatoprotective effect from ischemia-reperfusion injury of remote ischemic preconditioning of the liver vs. local ischemic preconditioning of the liver during human liver resections / M. Rakić, L. Patrlj, F. Amić [et al.] // *Int. J. Surg.* – 2018. – Vol. 54. – P. 248–253.

58. Complement 5 inhibition ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice, dominantly via the C5a-mediated cascade / J. Kusakabe, K. Hata, I. Tamaki [et al.] // *Transplantation.* – 2020. – Vol. 104. – P. 2065–2077.

59. Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment / M. Altarelli, N. Ben-Hamouda, A. Schneider, M. Berger // *Nutr Clin Pract.* – 2019. – V. 34(4). – P. 504–513.

60. Correction: Autophagy in hepatic ischemia-reperfusion injury / B. Mao, W. Yuan, F. Wu [et al.] // *Cell Death Discov.* – 2023. – Vol. 9 (1). – P. 146.

61. Curcumin protects radiation-induced liver damage in rats through the NF- κ B signaling pathway / W. Li, L. Jiang, X. Lu [et al.] // *BMC Complement Med Ther.* – 2021. – V. 21(1). – P. 10.

62. Davies, K. J. A. Adaptive homeostasis / K. J. A. Davies // *Mol Aspects Med.* – 2016. – Vol. 49. – P. 1–7.

63. Dectin-1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration / Q. Fan, R. Tao, H. Zhang [et al.] // *Circulation.* – 2019. – Vol. 139 (5). – P. 663–678.

64. Dendritic Cell-Mediated Regulation of Liver Ischemia-Reperfusion Injury and Liver Transplant Rejection / R. Nakano, L.M. Tran, D.A. Geller [et al.] // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 705465.

65. Dickson, K. M. Implications of Liver Donor Age on Ischemia Reperfusion Injury and Clinical Outcomes / K. M. Dickson, P. N. Martins // *Transplant. Rev.* – 2020. – Vol. 34. – P. 100549.
66. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123 / S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley [et al] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27. – № 1–2. – P. 146–159.
67. Doguer, C. Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver / C. Doguer, J. H. Ha, J. F. Collins // *Compr Physiol.* – 2018. – V. 8(4) – P. 1433–1461.
68. Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 deteriorates hepatic ischemia-reperfusion injury through ROS/JNK/P53 signaling in mice / H. Wu, H. Bai, S. Duan [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 2712185.
69. Dualistic role of platelets in living donor liver transplantation: Are they harmful? / C. Liang, K. Takahashi, K. Furuya [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2022. – Vol. 28 (9). – P. 897– 908.
70. Dynnik, V. V. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore / V. V. Dynnik, E. V. Grishina, N. I. Fedotcheva // *FEBS J.* – 2020. – Vol. 287 (8). – P. 1525–1536.
71. Early-phase circulating miRNAs predict tumor recurrence and survival of hepatocellular carcinoma patients after liver transplantation / K. T. Ng, C. M. Lo, N. Wong [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7. – P. 19824–39.
72. Effect of Pioglitazone on endoplasmic reticulum stress regarding in situ perfusion rat model / V. Telek, L. Erlitz, I. Caleb [et al.] // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 211163.
73. Effect of remote ischemic preconditioning among donors and recipients following pediatric liver transplantation: a randomized clinical trial / B. Qi, X. Q. Wang, S. T. Pan [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2021. – Vol. 27. – P. 345–357.

74. Effect of remote ischemic preconditioning conducted in living liver donors on postoperative liver function in donors and recipients following liver transplantation: a randomized clinical trial / K.W. Jung, J. Kang, H.M. Kwon [et al.] // *Ann Surg.* – 2020. – Vol. 271. – P. 646–653.
75. Effect of remote ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in patients undergoing liver resection: a randomized controlled trial / G. Wu, M. Chen, X. Wang [et al.] // *Minerva Anesthesiol.* – 2020. – Vol. 86. – P. 252–260.
76. Effect of remote ischemic preConditioning on liver injury in patients undergoing liver resection: the ERIC-LIVER trial / J. Y. Teo, A. F. W. Ho, H. Bulluck [et al.] // *HPB (Oxford).* – 2020. – Vol. 22. – P. 1250–1257.
77. Elucidation of the role of α -lipoic acid and vitamin C in methotrexate-induced hepatotoxicity in mice / H. M. Al-Kuraishy, R. R. Abd Hasan, A. I. A. Al-Gareeb [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2023. – V. 27(6). – P. 2277–2287.
78. Establishment and maintenance of the macrophage niche / M. Guillemins, G. R. Thierry, J. Bonnardel, M. Bajenoff // *Immunity.* – 2020. – Vol. 52 (3). – P. 434–451.
79. Exosomes mediate hippocampal and cortical neuronal injury induced by hepatic ischemia-reperfusion injury through activating pyroptosis in rats / L. Zhang, H. Liu, L. Jia [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–17.
80. Experimental and Clinical Aspects of Sevoflurane Preconditioning and Postconditioning to Alleviate Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury: A Scoping Review / L. Benoit, A. Dieu, M. Foguene, E. Bonaccorsi-Riani // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24 (3). – P. 2340.
81. Exploring the Multifaceted Nexus of Uric Acid and Health: A Review of Recent Studies on Diverse Diseases / M. Kuwabara, T. Fukuuchi, Y. Aoki [et al.] // *Biomolecules.* – 2023. – V. 13(10). – P. 1519.
82. Ferroptosis in liver diseases: An Overview / M. M. Capelletti, H. Manceau, H. Puy, K. Peoc'h // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 4908.
83. Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction / J. R. Bunting, T. V. Phan, E. Kamali, R. M. Dowben // *Biophys. J.* – 1989. – V. 56(5). – P. 979–993.

84. Gastrodin pretreatment protects liver against ischemia-reperfusion injury via activation of the Nrf2/HO-1 pathway / B. Yuan, H. Huang, S. Qu [et al.] // *Am J Chin Med.* – 2020. – Vol. 48. – P. 1159–1178.
85. Glucocorticoid use and ischemia-reperfusion injury in laparoscopic liver resection: randomized controlled trial / Y. Hasegawa, H. Nitta, T. Takahara [et al.] // *Ann Gastroenterol Surg.* – 2020. – Vol. 4. – P. 76–83.
86. G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler* / D. Hamel, M. Sanchez, F. Duhamel [et al.] *Chemto* // *Thromb. Vasc. Biol.* – 2014. – Vol. 34. – P. 285–293.
87. Granger, D. N. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept / D. N. Granger, P. R. Kvietys // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 524–551.
88. Green, D. R. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis Part II: The BCL-2 Protein Family // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2022a. – Vol. 14 (6). – P. a041046.
89. Green, D. R. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis: Part I: MOMP and Beyond // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2022b. – Vol. 14 (5). – P. a041038.
90. Guilliams, M. Liver macrophages in health and disease / M. Guilliams, C. L. Scott // *Immunity.* – 2022. – Vol. 55 (9). – P. 1515–1529.
91. Gulcin, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview / İ. Gulcin // *Arch Toxicol.* – 2020. – V. 94 (3). – P. 651–715.
92. Hallmarks of Aging in the Liver / N.J. Hunt, S.W. Kang, G.P. Lockwood [et al.] // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* – 2019. – Vol. 17. – P. 1151–1161.
93. He, L. Mitochondrial Sirtuins and Doxorubicin-induced Cardiotoxicity / L. He, F. Liu, J. Li // *Cardiovasc Toxicol.* – 2021. – Vol. 21 (3). – P. 179–191.
94. Hemorheological and microcirculatory factors in liver ischemia-reperfusion injury-an update on pathophysiology, molecular mechanisms and protective strategies / N. Nemeth, K. Peto, Z. Magyar [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 41864.
95. Hepatocyte HSPA12A inhibits macrophage chemotaxis and activation to attenuate liver ischemia/reperfusion injury via suppressing glycolysis-mediated HMGB1 lactylation and secretion of hepatocytes / S. Du, X. Zhang, Y. Jia [et al.] // *Theranostics.* – 2023. – Vol. 13 (11). – P. 3856–3871.

96. Hepatocyte Mitochondria-Derived Danger Signals Directly Activate Hepatic Stellate Cells and Drive Progression of Liver / P. An, L. Wei, S. Zhao [et al.] // *Fibrosis. Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 2362.
97. Hepatocyte-derived MANF alleviates hepatic ischaemia-reperfusion injury via regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in mice / Y. Yang, P. Wang, C. Zhang [et al.] // *Liver Int.* – 2021. – Vol. 41. – P. 623–639.
98. Hepatoprotective Actions of Ascorbic Acid, Alpha Lipoic Acid and Silymarin or Their Combination Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats / A. M. Abdulrazzaq, M. Badr, O. Gammoh [et al.] // *Medicina (Kaunas)* – 2019. – V. 55(5). – P. 181.
99. Heuer, B. Mitochondrial DNA: Unraveling the "other" genome // *J Am Assoc Nurse Pract.* – 2021. – Vol. 33 (9). – P. 673–675.
100. HIF-1: structure, biology and natural modulators / C. Yang, Z. F. Zhong, S. P. Wang [et al.] // *Chin J Nat Med.* – 2021. – Vol. 19 (7). – P. 521–527.
101. Hille, R. Xanthine Oxidase-A Personal History / R. Hille // *Molecules.* – 2023. – Vol. 28 (4). – P. 1921.
102. 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. – P. 239–256.
103. Hong, J. M. Heme Oxygenase-1 Protects Liver against Ischemia/Reperfusion Injury via Phosphoglycerate Mutase Family Member 5-Mediated Mitochondrial Quality Control / J. M. Hong, S. M. Lee // *Life Sci.* – 2018. – Vol. 200. – P. 94–104.
104. How much ischemia can the severely steatotic rat liver tolerate? / I. D. Kostakis, N. Sikalias, K. Alexiou [et al.] // *In Vivo.* – 2018. – Vol. 32 (6). – P. 1381–1386.
105. Hydrogen sulfide alleviates ischemia induced liver injury by repressing the SPHK1/S1P pathway / L. Chen, B. Lin, J. Yang [et al.] // *Ann Transl Med.* – 2023. – Vol. 11 (2). – P. 73.

106. Hydroxysafflor yellow ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing calcium overload and apoptosis / J. Ye, R. Wang, M. Wang [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 6643615.
107. Hypoxia/reoxygenation exacerbates drug-induced cytotoxicity by opening mitochondrial permeability transition pore: possible application for toxicity screening / Y. Ikeyama, T. Sato, A. Takemura [et al.] // *Toxicology In Vitro.* – 2020. – Vol. 67. – P. 104889.
108. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria / A. Paggio, V. Checchetto, A. Campo [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 572 (7771). – P. 609–613.
109. IDH2 deficiency increases the liver susceptibility to ischemia-reperfusion injury via increased mitochondrial oxidative injury / S. J. Han, H. S. Choi, J. I. Kim [et al.] // *Redox Biology.* – 2018. – Vol. 14. – P. 142–153.
110. Ikegaya, K.Characterization of sulfhydryl heterogeneity in human serum albumin and recombinant human serum albumin for clinical use / K. Ikegaya, K. Nokihara, T. Yasuhara // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2010. – V. 74(11). – P. 2232–6.
111. IL37 overexpression inhibits autophagy and apoptosis induced by hepatic ischemia reperfusion injury via modulating AMPK/mTOR/ULK1 signalling pathways / Q.S. Chen, A. Shen, J.W. Dai [et al.] // *Life Sci.* – 2021. – Vol. 276. – P. 119424.
112. Implications of hydrogen sulfide in liver pathophysiology: Mechanistic insights and therapeutic potential / H.J. Sun, Z.Y. Wu, X.W. Nie [et al.] // *J Adv Res.* – 2020. – Vol. 27. – P. 127–135.
113. Increased oxidative stress caused by impaired mitophagy aggravated liver ischemia and reperfusion injury in diabetic mice / K. Zhijun, Z. Xudong, W. Baoqiang [et al.] // *J. Diabetes Investig.* – 2023. – Vol. 14. – P. 28–36.
114. Increased Succinate Accumulation Induces ROS Generation in In Vivo Ischemia/Reperfusion-Affected Rat Kidney Mitochondria / J. Kamarauskaite, R. Baniene, D. Trumbeckas [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 8855585.

115. Inhibition of Drp1 SUMOylation by ALR protects the liver from ischemia-reperfusion injury / J. Huang, P. Xie, Y. Dong, W. An // *Cell Death Differ.* – 2021. – Vol. 28. – P. 1174–1192.
116. Inhibition of miR-450b-5p ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury via targeting CRYAB / Z. Huang, T. Mou, Y. Luo [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11 (6). – P. 455.
117. Intestinal TLR9 deficiency exacerbates hepatic IR injury via altered intestinal inflammation and short-chain fatty acid synthesis / S. J. Han, M. Kim, E. Novitsky [et al.] // *FASEB J.* – 2020. – Vol. 34. – P. 12083–12099.
118. Intraperitoneal and Extraperitoneal Pringle Hepatic Hilar Occlusion in Laparoscopic Liver Resection: A Prospective Randomized Controlled Study / L. He, W. X. Li, D. C. Zhou [et al.] // *Curr Med Sci.* – 2024. – V. 44(6) – P. 1210–1216.
119. Irisin Alleviates Liver Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Excessive Mitochondrial Fission, Promoting Mitochondrial Biogenesis and Decreasing Oxidative Stress / J. Bi, J. Zhang, Y. Ren [et al.] // *Redox Biol.* – 2019. – Vol. 20. – P. 296–306.
120. Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplantation: Potential role of ferroptosis / N. Yamada, T. Karasawa, T. Wakiya [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2020. – Vol. 20. – P. 1606–1618.
121. Iron-mediated lysosomal membrane permeabilization in ethanol-induced hepatic oxidative damage and apoptosis: Protective effects of quercetin / Y. Li, M. Chen, Y. Xu [et al.] // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2016. – P. 4147610.
122. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: Cellular and molecular mechanisms / W. A. Dar, E. Sullivan, J. S. Bynon [et al.] // *Liver Int.* – 2019. – Vol. 39 (5). – P. 788–801.
123. Ischemia reperfusion injury induces pyroptosis and mediates injury in steatotic liver thorough Caspase 1 activation / V. L. Kolachala, C. Lopez, M. Shen [et al.] // *Apoptosis.* – 2021. – Vol. 26. – P. 361–370.
124. Ischemia Reperfusion injury produces, and ischemic preconditioning prevents, rat cardiac fibroblast differentiation: role of K_{ATP} channels / K. R. Pertiwi, R. M. Hillman, C. A. Scott, E. L. Chilton // *J Cardiovasc Dev Dis.* – 2019. – Vol. 6 (2). – P. 22.

125. Ischemia/Reperfusion Injury: Pathophysiology, Current Clinical Management, and Potential Preventive Approaches / C. D. Sánchez-Hernández, L. A. Torres-Alarcón, A. González-Cortés, A. N. Peón // *Mediators Inflamm.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 8405370.
126. Ischemia-reperfusion injury and its relationship with early allograft dysfunction in liver transplant patients / T. Ito, B. V. Naini, D. Markovic [et al.] // *American Journal of Transplantation.* – 2021. – Vol. 21 (2). – P. 614–625.
127. Ischemic postconditioning lightening ischemia/reperfusion apoptosis of rats via mitochondria pathway / W. W. Chu, X. Y. He, A. L. Yan [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2019. – Vol. 23. – P. 6307–6014.
128. Jiang, S. Clinical application of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury: A literature review / S. Jiang, C. Dandu, X. Geng // *Brain Circ.* – 2020. – Vol. 6 (4). – P. 248–253.
129. Kitada, M. Autophagy in Metabolic Disease and Ageing / M. Kitada, D. Koya // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2021. – Vol. 17. – P. 647–661.
130. König, C. Management von Organblutungen: Leitlinien der American Association for the Surgery of Trauma (AAST) und World Society of Emergency Surgery (WSES) [Management of internal bleeding: Guidelines of the American Association for the Surgery of Trauma (AAST) and World Society of Emergency Surgery (WSES)] / C. König, G. Adam, L. Well // *Radiologie (Heidelb).* – 2025. – V. 65(1). – P. 13–21.
131. Konishi, T. Liver repair and regeneration after ischemia-reperfusion injury is associated with prolonged fibrosis / T. Konishi, R. M. Schuster, A. B. Lentsch // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2019. – Vol. 316 (3). – P. 323–331.
132. Kula-Alwar, D. Targeting Succinate Metabolism in Ischemia/Reperfusion Injury / D. Kula-Alwar, H. A. Prag, T. Krieg // *Circulation.* – 2019. – Vol. 140 (24). – P. 1968–1970.
133. Liang, J. Metabolic reprogramming: strategy for ischemic stroke treatment by ischemic preconditioning / J. Liang, R. Han, B. Zhou // *Biology (Basel).* – 2021. – Vol. 10 (5). – P. 424. – doi: 10.3390/biology10050424.

134. Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications / F. A. Moura, K. Q. de Andrade, J. C. dos Santos, M. O. Goulart // *Curr Top Med Chem.* – 2015. – V. 15(5). – P. 458–483.
135. Liraglutide Attenuates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury by Modulating Macrophage Polarization / S. L. Li, Z. M. Wang, C. Xu [et al.] // *Front Immunol.* – 2022. – V. 13. – P. 869050.
136. Liu, J. Mechanistic Insight and Clinical Implications of Ischemia/Reperfusion Injury Post Liver Transplantation / J. Liu, K. Man // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2023. – Vol. 15 (6). – P. 1463–1474.
137. Liver Ischemia Reperfusion Injury, Enhanced by Trained Immunity, Is Attenuated in Caspase 1/Caspase 11 Double Gene Knockout Mice / A.M. Fagenson, K. Xu, F. Saaoud [et al.] // *Pathogens.* – 2020. – Vol. 9. – P. 879.
138. LncRNA MALAT1 cessation antagonizes hypoxia/reoxygenation injury in hepatocytes by inhibiting apoptosis and inflammation via the HMGB1-TLR4 axis / Y. Zhang, H. Zhang, Z. Zhang [et al.] // *Mol Immunol.* – 2019. – Vol. 112. – P. 22–29.
139. Long noncoding RNA HOTAIR regulates autophagy via the miR-20b-5p/ATG7 axis in hepatic ischemia/reperfusion injury / B. Tang, N. Bao, G. He, J. Wang // *Gene.* – 2019. – Vol. 686. – P. 56–62.
140. Loss of Sirtuin 1 and Mitofusin 2 Contributes to Enhanced Ischemia/Reperfusion Injury in Aged Livers / S. K. Chun, S. Lee, J. Flores-Toro [et al.] // *Aging Cell.* – 2018. – Vol. 17. – P. 12761.
141. Macrophage Polarization and Liver Ischemia-Reperfusion Injury / A.C. Doran, H. Wang, Z. Xi [et al.] // *Int J Med Sci.* – 2021. – Vol. 18 (5). – P. 1104–1113.
142. MAPK signaling pathways in hepatic ischemia/reperfusion injury / B. Yu, Y. Zhang, T. Wang [et al.] // *J Inflamm Res.* – 2023. – Vol. 16. – P. 1405–1418.
143. Measurement of S-glutathionylated proteins by HPLC / D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, R. Rossi // *Amino Acids.* – 2022. – V. 54(4). – P. 675–686.
144. Mechanisms and mathematical modeling of ROS production by the mitochondrial electron transport chain / S. Chenna, W. J. H. Koopman, J. H. M. Prehn, N. M. C. Connolly // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2022. – Vol. 323 (1). – P. 69–83.

145. Mechanistic correlation between mitochondrial permeability transition pores and mitochondrial ATP dependent potassium channels in ischemia reperfusion / R. Behera, V. Sharma, A.K. Grewal [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2023. – Vol. 162. – P. 114599.

146. Melatonin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting NF-kappaB signaling pathway / Y. Gao, Z.T. Li, L. Jin [et al.] // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* – 2021. – Vol. 4. – P. 1.

147. Milliken, A. S. Acid enhancement of ROS generation by complex-I reverse electron transport is balanced by acid inhibition of complex-II: Relevance for tissue reperfusion injury / A. S. Milliken, C. A. Kulkarni, P. S. Brookes // *Redox Biol.* – 2020. – Vol. 37. – P. 101733.

148. Mitochondria regulate intracellular coenzyme Q transport and ferroptotic resistance via STARD7 / S. Deshwal, M. Onishi, T. Tatsuta [et al.] // *Nat Cell Biol.* – 2023. – Vol. 25 (2). – P. 246–257.

149. Mitochondrial complex III bypass complex I to induce ROS in GPR17 signaling activation in GBM / S. Kari, J. Kandhavelu, A. Murugesan [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2023. – Vol. 162. – P. 114678.

150. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms / L. Tilokani, S. Nagashima, V. Paupe, J. Prudent // *Essays Biochem.* – 2018. – Vol. 62. – P. 341–360.

151. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) / R. Z. Zhao, S. Jiang, L. Zhang, Z. B. Yu // *Int J Mol Med.* – 2019. – Vol. 44 (1). – P. 3–15.

152. Mitochondrial fatty acid utilization increases chromatin oxidative stress in cardiomyocytes / I. Menendez-Montes, S. Abdisalaam, F. Xiao [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – Vol. 118 (34). – P. e2101674118.

153. Mitochondrial function in development and disease / M. P. Rossmann, S. M. Dubois, S. Agarwal, L. I. Zon // *Dis Model Mech.* – 2021. – Vol. 14 (6). – P. 048912.

154. Mitochondrial Mechanisms of Apoptosis and Necroptosis in Liver Diseases / Q. Chu, X. Gu, Q. Zheng [et al.] // *Anal Cell Pathol (Amst).* – 2021. – Vol. 2021. – P. 8900122.

155. Mitochondrial membrane potential / L. D. Zorova, V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov [et al.] // *Anal Biochem.* – 2018. – V. 552. – P. 50–59.
156. Mitochondrial Peroxiredoxin-IIF (PRXIIF) Activity and Function during Seed Aging / E. A. Klupczyńska, K. J. Dietz, A. Małecka, E. Ratajczak // *Antioxidants (Basel).* – 2022. – Vol. 11 (7). – P. 1226.
157. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy / M. Onishi, K. Yamano, M. Sato [et al.] // *EMBO J.* – 2021. – Vol. 40. – P. e104705.
158. Monoamine oxidases in age-associated diseases: New perspectives for old enzymes / Y. Santin, J. Resta, A. Parini, J. Mialet-Perez // *Ageing Res Rev.* – 2021. – Vol. 66. – P. 101256.
159. Morris, S. M. The role of platelet mediated thromboinflammation in acute liver injury / S. M. Morris, A. Chauhan // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 1037645.
160. MSCs Ameliorate hepatocellular apoptosis mediated by pink1-dependent mitophagy in liver ischemia/reperfusion injury through AMPK α Activation / J. Zheng, L. Chen, T. Lu [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11. – P. 256.
161. Muscle mitochondrial catalase expression prevents neuromuscular junction disruption, atrophy, and weakness in a mouse model of accelerated sarcopenia / H. Xu, R. Ranjit, A. Richardson, H. Van Remmen // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* – 2021. – Vol. 12 (6). – P. 1582–1596.
162. N-acetylcysteine protects testicular tissue against ischemia/reperfusion injury via inhibiting endoplasmic reticulum stress and apoptosis / I.O. Kazaz, S. Demir, E. Yulug [et al.] // *J Pediatr Urol.* – 2019. – Vol. 15. – P. 1–8.
163. N-Acetylcysteine Reduced Ischemia and Reperfusion Damage Associated with Steatohepatitis in Mice / N. Chaves Cayuela, M. Kiyomi Koike, J. Jacysyn [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 4106.
164. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology / A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S. M. E. Smith, F. Fieschi // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – Vol. 10 (6). – P. 890.

165. Nakamura, K. The evolving role of neutrophils in liver transplant ischemia-reperfusion injury / K. Nakamura, S. Kageyama, J. W. Kupiec-Weglinski // *Curr Transplant Rep.* – 2019. – Vol. 6 (1). – P. 78–89.
166. Nano-positioning and tubulin conformation contribute to axonal transport regulation of mitochondria along microtubules / V. Van Steenberghe, F. Lavoie-Cardinal, Y. Kazwiny [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2022. – Vol. 119 (45). – P. e2203499119.
167. New progress in understanding roles of nitric oxide during hepatic ischemia-reperfusion injury / Y. P. Zhang, X. R. Liu, M. W. Yang [et al.] // *World J Hepatol.* – 2022. – Vol. 14 (3). – P. 504–515.
168. Nieuwenhuijs-Moeke, G. Molecular aspects of volatile anesthetic-induced organ protection and its potential in kidney transplantation / G. Nieuwenhuijs-Moeke, D. Bosch, H. Leuvenink // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 2727.
169. Nobiletin ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury through the activation of SIRT-1/FOXO3a-mediated autophagy and mitochondrial biogenesis / Z. Chen, T. Dusabimana, S. R. Kim [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine.* – 2019. – Vol. 51 (4). – P. 1–16.
170. Nolfi-Donagan, D. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement / D. Nolfi-Donagan, A. Braganza, S. Shiva // *Redox Biol.* – 2020. – Vol. 37. – P. 101674.
171. Nomura, N. Cooperation of Cysteine, Ascorbic Acid, Pyridoxine, and α -Lipoic Acid in Antioxidant Effects on Human Keratinocytes and 3D Human Skin Models / N. Nomura, A. Sawamura, N. J. Miyadai // *Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* – 2024. – V. 70(6). – P. 454–461.
172. Nonalcoholic Fatty Liver Disease / E. M. Brunt, V. W. S. Wong, V. Nobili [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primers.* – 2015. – Vol. 1. – P. 15080.
173. Novel targets and therapeutic strategies to protect against hepatic ischemia reperfusion injury / X. L. Mao, Y. Cai, Y. H. Chen [et al.] // *Front Med (Lausanne).* – 2022. – Vol. 8. – P. 757336.

174. Nrf2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury / R. G. Bardallo, A. Panisello-Roselló, S. Sanchez-Nuno [et al.] // FEBS J. – 2022. – V. 289(18) – P. 5463–5479.

175. NRF2 assessment in discarded liver allografts: a role in allograft function and salvage / O. Ahmed, M. Xu, F. Zhou [et al.] // Am J Transplant. – 2022. – Vol. 22. – P. 58–70.

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

177. Oxaloacetate protects rat liver from experimental warm ischemia/reperfusion injury by improving cellular energy metabolism / G. Merlen, V.A. Raymond, S. Cassim [et al.] // Liver Transplantation. – 2019. – Vol. 25 (4). – P. 627–639.

178. Panov, A.V. Practical mitochondriology: pitfalls and problems in studies of mitochondria with a description of mitochondrial functions. Charlston, NC USA: Create Space, 2015.

179. Park, J. H. Renal effects of uric acid: hyperuricemia and hypouricemia / J. H. Park, Y. I. Jo, J. H. Lee // Korean J Intern Med. – 2020. – V. 35(6). – P. 1291–1304.

180. Pattern recognition receptor-reactivity screening of liver transplant patients: Potential for personalized and precise organ matching to reduce risks of ischemia-reperfusion injury / R. A. Sosa, M. Rossetti, B. V. Naini [et al.] // Ann. Surg. – 2020. – Vol. 271. – P. 922–931.

181. Pautz, A. Regulation of NOS expression in vascular diseases / A. Pautz, H. Li, H. Kleinert // Front Biosci (Landmark Ed). – 2021. – Vol. 26 (5). – P. 85–101.

182. Pfanner, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks / N. Pfanner, B. Warscheid, N. Wiedemann // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2019. – Vol. 20. – P. 267–284.

183. Pharmacological modulation of ischemic-reperfusion injury during Pringle maneuver in hepatic surgery. A prospective randomized pilot study / M. Donadon, A.F. Molinari, F. Corazzi [et al.] // World J Surg. – 2016. – Vol. 40. – P. 2202–2212.

184. Pharmacological preconditioning with phosphodiesterase inhibitor: an answer to stem cell survival against ischemic injury through JAK/STAT signaling / M. Yadav, P. Kumari, V. Yadav, S. Kumar // *Heart Fail Rev.* – 2020. – Vol. 25 (2). – P. 355–366.

185. PINK1-mediated mitophagy protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by restraining NLRP3 inflammasome activation / A. Schlegel, J. Hofmann, Y. Xu [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2020. – Vol. 160. – P. 871–886.

186. Plasma from volunteers breathing helium reduces hypoxia-induced cell damage in human endothelial cells-mechanisms of remote protection against hypoxia by helium / K. F. Smit, G. Oei, M. Konkel [et al.] // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 2019. – Vol. 33. – P. 297–306.

187. Plasma levels of liver-specific miR-122 is massively increased in a porcine cardiogenic shock model and attenuated by hypothermia / P. Andersson, O. Gidlof, O.O. Braun [et al.] // *Shock.* – 2012. – Vol. 37. – P. 234–238.

188. Pleiotropic Effects of Mitochondria in Aging / T. Lima, T.Y. Li, A. Mottis, J. Auwerx // *Nat. Aging.* – 2022. – Vol. 2. – P. 199–213.

189. Ploumi, C. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act / C. Ploumi, I. Daskalaki, N. Tavernarakis // *FEBS J.* – 2017. – Vol. 284. – P. 183–195

190. Precision navigation of hepatic ischemia–reperfusion injury guided by lysosomal viscosity-activatable NIR-II fluorescence / J. Liu, W. Zhang, C. Zhou [et al.] // *J Am Chem Soc.* – 2022. – Vol. 144. – P. 13586–13599.

191. Pre-Ischemic Hypothermic Oxygenated Perfusion Alleviates Protective Molecular Markers of Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Liver / N. Asong-Fontem, A. Panisello-Rosello, N. Beghdadi [et al.] // *Transplant Proc.* – 2022. – Vol. 54 (7). – P. 1954–1969.

192. Prolonged ischemia triggers necrotic depletion of tissue-resident macrophages to facilitate inflammatory immune activation in liver ischemia reperfusion injury / S. Yue, H. Zhou, X. Wang [et al.] // *J Immunol.* – 2017. – Vol. 198 (9). – P. 3588–3595.

193. 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.

194. Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the liver / K. Bavarsad, M.M. Riahi, S. Saadat [et al.] // *Pharmacological Research.* – 2019. – Vol. 141. – P. 53–62.

195. Proteomic analysis reveals ginsenoside Rb1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ROS production from mitochondrial complex I / L. Jiang, X. Yin, Y.H. Chen [et al.] // *Theranostics.* – 2021. – Vol. 11 (4). – P. 1703–1720.

196. Raghunath, A. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications / A. Raghunath, K. Sundarraj, R. Nagarajan [et al.] // *RedoxBiol.* – 2018. – Vol. 17. – P. 297–314.

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

198. 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 [et al.] // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 870239.

199. Regulation of Autophagy Protects against Liver Injury in Liver Surgery-induced Ischaemia/Reperfusion / C. Hu, L. Zhao, F. Zhang, L. Li // *J. Cell. Mol. Med.* – 2021. – Vol. 25. – P. 9905–9917.

200. Remote ischemic preconditioning and diazoxide protect from hepatic ischemic reperfusion injury by inhibiting HMGB1-induced TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling / W. U. Koh, J. Kim, J. Lee [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. 235899.

201. Research progress of nano selenium in the treatment of oxidative stress injury during hepatic ischemia-reperfusion injury / X. Deng, P. Ouyang, W. Xu [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2023. – Vol. 13. – P. 1103483.

202. Ripk3 promotes er stress-induced necroptosis in cardiac ir injury: A mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway / P. Zhu, S. Hu, Q. Jin [et al.] // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. 16. – P. 157–168.

203. Robb, E. L. Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293 (25). – P. 9869–9879.
204. Robert, B. Gasotransmitter-induced therapeutic angiogenesis: a biomaterial prospective / B. Robert, S. Subramaniam // *ACS Omega.* – 2022. – Vol. 7 (50). – P. 45849–45866.
205. Role and mechanisms of mitophagy in liver diseases / X. Ma, T. McKeen, J. Zhang, W. X. Ding // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – P. 837.
206. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases / J. Gracia-Sancho, E. Caparrós, A. Fernández-Iglesias, R. Francés // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2021. – Vol. 18 (6). – P. 411–431.
207. Role of matrix metalloproteinases in cholestasis and hepatic ischemia/reperfusion injury: A review / G. Palladini, A. Ferrigno, P. Richelmi [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 21 (42). – P. 12114–12124.
208. Role of mitochondria in liver metabolic health and diseases / B. Morio, B. Panthu, A. Bassot, J. Rieusset // *Cell Calcium.* – 2021. – Vol. 94. – P. 102336.
209. Role of mitochondrial membrane potential and lactate dehydrogenase a in apoptosis / S. Zaib, A. Hayyat, N. Ali [et al.] // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2022. – Vol. 22 (11). – P. 2048–2062.
210. Role of mitochondrial pathways in cell apoptosis during hepatic ischemia/reperfusion injury / S. Zhang, S. Rao, M. Yang [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23 (4). – P. 2357.
211. Role of mitochondrial quality surveillance in myocardial infarction: from bench to bedside / H. Zhou, J. Ren, S. Toan, D. Mui // *Ageing Research Reviews.* – 2021. – Vol. 66. – P. 101250.
212. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease / Z. Chen, R. Tian, Z. She [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2020. – Vol. 152. – P. 116–141.
213. Rumpf, J. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins / J. Rumpf, R. Burger, M. Schulze // *Int J Biol Macromol.* – 2023. – V. 233. – P. 123470.

214. Selenium nanoparticles pre-treatment reverse behavioral, oxidative damage, neuronal loss and neurochemical alterations in pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in mice / X. Yuan, Z. Fu, P. Ji [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2020. – Vol. 15. – P. 6339–6353.

215. Sengul, D. Connection of reactive oxygen species as an essential actor for the mechanism of phenomena; ischemic preconditioning and postconditioning: Come to age or ripening? / D. Sengul, I. Sengul // *North Clin Istanbul*. – 2021. – Vol. 8 (6). – P. 644–649.

216. Shan, Z. Hepatic macrophages in liver injury / Z. Shan, C. Ju // *Front Immunol*. – 2020. – Vol. 11. – P. 322.

217. Shi, Q. Pterostilbene alleviates liver ischemia/reperfusion injury via PINK1-Mediated Mitophagy / Q. Shi, G. Zhao, S. Wei [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2022. – Vol. 148. – P. 19–30.

218. 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 [et al.] // *Transplantation*. – 2021. – Vol. 105 (11). – P. 2362–2373.

219. Shin, J.-K. Genipin protects the liver from ischemia/reperfusion injury by modulating mitochondrial quality control / J.-K. Shin, S.-M. Lee // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 328. – P. 25–33.

220. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D. P. Jones // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2020. – Vol. 21 (7). – P. 363–383.

221. Siva Sankar, D. Protein complexes and neighborhoods driving autophagy / D. Siva Sankar, J. Dengjel // *Autophagy*. – 2020. – Vol. 17. – P. 2689–705.

222. Sodium nitrite attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats / E. K. Choi, H. Jung, K. J. Kim [et al.] // *Exp Clin Transplant*. – 2019. – Vol. 17 (3). – P. 348–354.

223. Sogami, M. The microheterogeneity of plasma albumins. V. Permutations in disulfide pairings as a probable source of microheterogeneity in bovine albumin / M. Sogami, H. A. Petersen, J. F. Foster // *Biochemistry*. – 1969. – V. 8(1). – P. 49–58.

224. Spatial transcriptomics analysis of zone-dependent hepatic ischemia-reperfusion injury murine model / J. Xin, T. Yang, X. Wu [et al.] // *Commun. Biol.* – 2023. – Vol. 6. – P. 194.

225. Stankiewicz, R. Direct, remote and combined ischemic conditioning in liver surgery / R. Stankiewicz, M. Grąt // *World J Hepatol.* – 2021. – Vol. 13 (5). – P. 533–542.

226. Structure, Distribution, Regulation, and Function of Splice Variant Isoforms of Nitric Oxide Synthase Family in the Nervous System / N. Hosseini, M. Kourosh-Arabi, S. Nadjafi, B. Ashtari // *Curr Protein Pept Sci.* – 2022. – Vol. 23 (8). – P. 510–534.

227. Structure, mechanism, and regulation of mitochondrial DNA transcription initiation / U. Basu, A.M. Bostwick, K. Das [et al.] // *J Biol Chem.* – 2020. – Vol. 295 (52). – P. 18406–18425.

228. Structure-functional implications of longevity protein p66Shc in health and disease / H. A. Mir, R. Ali, U. Mushtaq, F. A. Khanday // *Ageing Res Rev.* – 2020. – Vol. 63. – P. 101139.

229. Study of the therapeutic effects of *Lactobacillus* and α -lipoic acid against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats / K. M. Zoheir, A. A. Amara, S. Ahmad [et al.] // *Genet. Eng. Biotechnol.* – 2014. – V. 12. – P. 135–142.

230. Susceptibility of rat steatotic liver to ischemia-reperfusion is treatable with liver-selective matrix metalloproteinase inhibition / X. Wang, C. J. Walkey, A. C. Maretti-Mira [et al.] // *Hepatology.* – 2020. – Vol. 72 (5). – P. 1771–1785.

231. Sztolsztener, K Hepatic-Metabolic Activity of α -Lipoic Acid-Its Influence on Sphingolipid Metabolism and PI3K/Akt/mTOR Pathway in a Rat Model of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease / K. Sztolsztener, A. Chabowski // *Nutrients.* – 2024. – V. 16(10) – P. 1501.

232. TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions / I. Martínez-Reyes, L.P. Diebold, H. Kong [et al.] // *Mol. Cell.* – 2016. – Vol. 61 (2). – P. 199–209.

233. T-Cell Immunoglobulin and mucin domain-containing protein-4 is critical for kupffer cell homeostatic function in the activation and resolution of liver ischemia

reperfusion injury / M. Ni, J. Zhang, R. Sosa [et al.] // *Hepatology*. – 2021. – Vol. 74 (4). – P. 2118–2132.

234. The association of maternal food quality score (FQS) with breast milk nutrient content and antioxidant content of infant urine: a cross-sectional study / S. Karbasi, M. Mohamadian, M. Naseri [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth*. – 2023. – V. 23 (1). – P. 126.

235. The Cell Biology of Mitochondrial Membrane Dynamics / M. Giacomello, A. Pyakurel, C. Glytsou, L. Scorrano // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2020. – Vol. 21. – P. 204–224.

236. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. / M. Mendes-Braz, M. Elias-Miró, M. B. Jiménez-Castro, A. Casillas-Ramírez // *J Biomed Biotechnol.* – 2012. – V. 2012. – P. 298657.

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

238. The Effect of Thyme Essential Oil on Liver Injuries Caused by Renal Ischemia-Reperfusion in Rats / R. Rostami, Z. Eslamifar, S. Nazemi [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2022. – P. 2988334.

239. The F1Fo-ATPase inhibitor protein IF1 in pathophysiology / C. Gatto, M. Grandi, G. Solaini [et al.] // *Front Physiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 917203.

240. The hepato-renal protective potential of walnut seed skin extract against acute renal ischemia/reperfusion damage / S. Askin, H. Askin, E. Dursun [et al.] // *Cytokine*. – 2022. – V. 153 – P. 155861.

241. The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity / P. Kameritsch, M. Singer, C. Nuernbergk [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2021. – Vol. 118 (7). – P. e1921828118.

242. The protective effects of carbon monoxide against hepatic warm ischemia-reperfusion injury in MHC-Inbred miniature swine / T. Murokawa, H. Sahara, M. Sekijima [et al.] // *J Gastrointest Surg.* – 2020. – Vol. 24 (5). – P. 974–982.

243. The protective effects of fibroblast growth factor 10 against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice / S. Li, Z. Zhu, M. Xue [et al.] // *Redox Biol.* – 2021. – Vol. 40. – P. 101859.

244. The role of ischemia/reperfusion injury in early hepatic allograft dysfunction / J. Zhou, J. Chen, Q. Wei [et al.] // *Liver Transpl.* – 2020. – Vol. 26. – P. 1034–1048.

245. 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 [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 6670579.

246. Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -Dependent permeability transition in rat liver mitochondria under the streptozotocin-induced type I diabetes / K.N. Belosludtsev, E.Y. Talanov, V.S. Starinets [et al.] // *Cells.* – 2019. – Vol. 8 (9). – P. 1014.

247. Trapero-Marugán, M. Stretching the Boundaries for Liver Transplant in the 21st Century / M. Trapero-Marugán, E. C. Little, M. Berenguer // *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* – 2018. – Vol. 3. – P. 803–811.

248. Tripartite Motif-Containing 27 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury by Suppressing Transforming Growth Factor beta-Activated Kinase 1 (TAK1) by TAK1 Binding Protein 2/3 Degradation / S. Y. Chen, H. P. Zhang, J. Li [et al.] // *Hepatology.* – 2021. – Vol. 73. – P. 738–758.

249. Two-photon fluorescence imaging of mitochondrial superoxide anion transport mediating liver ischemia-reperfusion injury in mice / W. Zhang, D. Su, P. Li [et al.] // *Chemical Communications.* – 2019. – Vol. 55 (72). – P. 10740–10743.

250. TXNIP knockdown alleviates hepatocyte ischemia reperfusion injury through preventing p38/JNK pathway activation / Y. Zhang, L. S. Miao, Y. M. Cai [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – Vol. 502 (3). – P. 409–414.

251. Ursodeoxycholyt lysophosphatidylethanolamide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via phospholipid metabolism-mediated mitochondrial quality control / J. Gu, T. Zhang, J. Guo [et al.] // *FASEB J.* – 2020. – Vol. 34 (6). – P. 6198–6214.
252. USP15 Regulates P66Shc stability associated with drp1 activation in liver Ischemia/Reperfusion / X. Tian, Y. Zhao, Z. Yang [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2022. – Vol. 13. – P. 823. – doi: 10.1038/s41419-022-05277-8.
253. Venditti, P. The role of reactive oxygen species in the life cycle of the mitochondrion / P. Venditti, S. Di Meo // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (6). – P. 2173.
254. Wang, J. Mitochondrial quality control in cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury: new insights into the mechanisms and therapeutic potentials / J. Wang, S. Toan, H. Zhou // *Pharmacol. Res.* – 2020. – Vol. 156. – P. 104771.
255. Wang, Y. Neutrophil-induced liver injury and interactions between neutrophils and liver sinusoidal endothelial cells / Y. Wang, Y. Liu // *Inflammation.* – 2021. – Vol. 44 (4). – P. 1246–1262.
256. Wang, Y. Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway / Y. Wang, H. Zhang // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol. 1206. – P. 67–83.
257. White, K. The roles of NADPH and isocitrate dehydrogenase in cochlear mitochondrial antioxidant defense and aging / K. White, S. Someya // *Hear Res.* – 2023. – Vol. 427. – P. 108659.
258. Xian, H. Loss of MIEF1/MiD51 confers susceptibility to BAX-mediated cell death and PINK1-PRKN-dependent mitophagy / H. Xian, Y. C. Liou // *Autophagy.* – 2019. – Vol. 15 (12). – P. 2107–2125.
259. Yellon, D. M. The RISK pathway leading to mitochondria and cardioprotection: how everything started / D. M. Yellon, S. Beikoghli Kalkhoran, S. M. Davidson // *Basic Res Cardiol.* – 2023. – Vol. 118 (1). – P. 22.
260. Young Plasma Attenuates Age-dependent Liver Ischemia Reperfusion Injury / A. Liu, J. Yang, Q. Hu [et al.] // *FASEB J.* – 2019. – Vol. 33. – P. 3063–3073.
261. Zinovkin, R. A. Mitochondria-Targeted Drugs / R. A. Zinovkin, A. A. Zamyatnin // *Curr Mol Pharmacol.* – 2019. – V. 12(3). – P. 202–214.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблица 1.1 – Митохондриальные источники генерации активных форм кислорода	24
Рисунок 1.1 – Митохондриальная антиоксидантная система	29
Рисунок 1.2 – Механизм продукции АФК в митохондриях при ИРС	48
Рисунок 1.3 – Источники АФК при ишемии-реперфузии печени	49
Рисунок 1.4 – Метаболическое зонирование в печеночной дольке	57
Таблица 1.2 – Основные группы и представители фармакологических препаратов, использующихся для профилактики ишемически-реперфузионных повреждений печени	69
Рисунок 2.1 – Дизайн исследования	72
Рисунок 2.2 – Особенности морфологии печени крыс	75
Рисунок 2.3 – Общий вид ворот печени крысы. Выделен аналог гепатодуоденальной связки	76
Рисунок 2.4 – Моделирование васкулярной эксклюзии печени в эксперименте	77
Рисунок 2.5 – Оценка жизнеспособности гепатоцитов в суспензии (разбавление в 16 раз). Окраска трипановым синим	80
Рисунок 2.6 – Типичные кинетические кривые интенсивности флуоресценции сафранина О в энергизированном и деэнергизированном состоянии митохондрий после различной по длительности ишемии печени крыс	97
Рисунок 2.7 – Принципы определения состояния неферментного звена прооксидантно-антиоксидантной системы	99
Рисунок 3.1 – Изменение активности аланинаминотрансферазы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	105
Рисунок 3.2 – Изменение активности аспартатаминотрансферазы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	106

Рисунок 3.3 – Изменение активности лактатдегидрогеназы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	107
Рисунок 3.4 – Изменение активности глутатион-S-трансферазы в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	108
Рисунок 3.5 – Изменение концентрации молочной кислоты в плазме крови в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	109
Таблица 3.1 – Изменение антиоксидантного потенциала и активности каталазы в крови в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	110
Таблица 3.2 – Изменение показателей метаболизма тиолсодержащих веществ в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	111
Рисунок 3.6 – Изменение содержания продуктов перекисного окисления липидов в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс	113
Таблица 3.3 – Корреляция между лабораторными показателями крови при ишемически-реперфузионном повреждении печени крыс	114
Таблица 3.4 – Корреляция между лабораторными показателями крови после 20-минутной ишемии и 3-/8-часовой реперфузии печени крыс	115
Рисунок 3.7 – Динамика активности супероксиддисмутазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс	116
Рисунок 3.8 – Динамика активности каталазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс	117
Рисунок 3.9 – Динамика активности глутатионпероксидазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс	118
Рисунок 3.10 – Динамика активности глутатионредуктазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс	119

Рисунок 3.11 – Динамика концентрации глутатиона в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс	120
Таблица 3.5 – Динамика активности ферментов антиоксидантной системы печени крыс при ишемии-реперфузии	121
Таблица 3.6 – Динамика активности глутатион-зависимых ферментов антиоксидантной системы печени крыс при ишемии-реперфузии	122
Рисунок 3.12 – Динамика концентрации глутатиона в гомогенате печени крыс при ишемии-реперфузии печени крыс	123
Рисунок 3.13 – Динамика железо-восстанавливающей способности в гомогенате печени крыс при ишемии-реперфузии	124
Рисунок 3.14 – Динамика активности пируватдегидрогеназы в гомогенате печени крыс при ишемии-реперфузии	125
Таблица 3.7 – Изменения маркеров цитолиза гепатоцитов на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени	126
Таблица 3.8 – Изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса крови на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени	127
Таблица 3.9 – Изменения активности ферментов антиоксидантной системы на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени	127
Таблица 3.10 – Изменения состояния тиолового звена антиоксидантной системы на фоне различных моделей васкулярной эксклюзии печени	128
Таблица 3.11 – Динамика изменений активности ферментов антиоксидантной системы эритроцитов на фоне односторонней ишемии почки	129
Рисунок 3.15 – Динамика изменений концентрации глутатиона в эритроцитарной взвеси на фоне односторонней ишемии почки	130
Таблица 3.12 – Показатели состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса в цитозоле и суспензии митохондрий печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения	132
Рисунок 3.16 – Концентрация глутатиона в цитозольной фракции печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения	133

Таблица 3.13 – Показатели состояния ферментов антиоксидантной системы в цитозоле и суспензии митохондрий печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения	134
Таблица 3.14 – Изменения мембранного потенциала в суспензии митохондрий печени крыс после ишемически-реперфузионного повреждения	135
Рисунок 3.17 – Изменения микровязкости мембран митохондрий печени крыс в фазе ишемии и реперфузии	136
Рисунок 3.18 – Изменения концентрации ионов магния после ишемически-реперфузионного повреждения печени в эксперименте	138
Рисунок 3.19 – Изменения концентрации ионов цинка после ишемически-реперфузионного повреждения печени в эксперименте	139
Таблица 3.15 – Динамика изменений маркеров обмена железа в сыворотке крови крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени	140
Таблица 3.16 – Изменения некоторых микроэлементов в плазме крови крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени	141
Таблица 3.17 – Изменения некоторых микроэлементов в эритроцитах крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени	143
Таблица 3.18 – Изменения некоторых микроэлементов в гомогенате печени крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени	143
Таблица 4.1 – Влияние антиоксидантного preconditionирования в условиях ишемии-реперфузии печени на выраженность цитолитического синдрома	166
Рисунок 4.1 – Влияние комбинированной антиоксидантной терапии на железо-восстанавливающую способность плазмы крови крыс после ишемии-реперфузии печени	168
Рисунок 4.2 – Влияние комбинированной антиоксидантной терапии на концентрацию глутатиона в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени	169

Рисунок 4.3 – Влияние комбинированной антиоксидантной терапии на концентрацию продуктов липопероксидации в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени	171
Таблица 4.2 – Влияние антиоксидантного preconditionирования на баланс прооксидантно-антиоксидантной системы печени в условиях ишемии-реперфузии	172
Таблица 4.3 – Влияние метаболитических цитопротекторов на выраженность цитолитического синдрома при экспериментальном моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени	174
Таблица 4.4 – Влияние метаболитических цитопротекторов на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса при экспериментальном моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени	175
Таблица 4.5 – Влияние комбинированного энерготропного preconditionирования на выраженность цитолитического синдрома при экспериментальном моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени	176
Таблица 4.6 – Влияние preconditionирования гидропероксидом трет-бутила на цитоллиз гепатоцитов в условиях ишемически-реперфузионного повреждения печени	177
Рисунок 4.4 – Влияние прооксидантного preconditionирования на изменения общей антиоксидантной активности плазмы крови в условиях экспериментального моделирования ишемии-реперфузии печени	179
Рисунок 4.5 – Влияние прооксидантного preconditionирования на изменения интенсивности накопления продуктов липопероксидации в крови в условиях экспериментального моделирования ишемии-реперфузии печени	180
Таблица 4.7 – Влияние хелатотерапии на выраженность цитолитического синдрома при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс	182

Таблица 4.8 – Влияние хелатотерапии на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс	182
Рисунок 4.6 – Влияние дихлорацетата натрия на активность пируватдегидрогеназы в ишемический и реперфузионный периоды	188
Рисунок 4.7 – Интенсивность флуоресценции 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата в суспензии гепатоцитов при инкубации с дихлорацетатом натрия	190
Рисунок 4.8 – Влияние дихлорацетата натрия на железо-восстанавливающую способность плазмы крови после ишемии и реперфузии печени	191
Рисунок 4.9 – Влияние дихлорацетата натрия на образование 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в гомогенате печени после ишемии и реперфузии	191
Рисунок 5.1 – Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	197
Рисунок 5.2 – Активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	198
Рисунок 5.3 – Концентрация сывороточного альбумина в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	199
Рисунок 5.4 – Активность гаммаглутамилтрансферазы в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	200
Рисунок 5.5 – Концентрация общего билирубина в сыворотке крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	201
Рисунок 5.6 – Общая антиоксидантная активность в плазме крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	202

Рисунок 5.7 – Уровень тиобарбитурового числа в эритроцитах больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	204
Рисунок 5.8 – Активность каталазы в эритроцитах больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	205
Рисунок 5.9 – Концентрация глутатиона в эритроцитах больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	206
Рисунок 5.10 – Общее содержание тиоловых групп в плазме крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	208
Таблица 5.1 – Показатели состояния тиоловых групп в плазме крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	209
Рисунок 5.11 – Изменение активности АЛТ в сыворотке крови больных алкогольным гепатитом на фоне комбинированной терапии серосодержащими гепатопротекторами	211
Рисунок 5.12 – Изменение активности ГГТ в сыворотке крови больных алкогольным гепатитом на фоне комбинированной терапии серосодержащими гепатопротекторами	212
Таблица 5.2 – Показатели состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	213
Таблица 5.3 – Показатели состояния тиолового звена антиоксидантной системы крови больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ на фоне метаболической терапии	214
Таблица 5.4 – Корреляционная взаимосвязь общей антиоксидантной активности и уровня тиоловых групп в плазме крови	218

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Акты внедрения


 УТВЕРЖДАЮ
 Проректор по науке и стратегическому
 развитию
 ФГБОУ ВО КалмГУ им. Б.Б. Городовикова,
 к.б.н. К.Е. Бадмаева 20 23 г.

АКТ

об использовании предложения в научно-исследовательской деятельности

1. Наименование предложения: рекомендации по разработке и апробации новых схем гепатопротекторной терапии в эксперименте.
 2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Патобиохимия ишемически-реперфузионных повреждений печени и способы их метаболической коррекции (клинико-экспериментальное исследование)».
 3. Исполнитель: кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Попов Константин Андреевич.
 4. Научный консультант: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
 5. Место внедрения: регионального научно-производственного центра по воспроизводству сельскохозяйственных животных и организации проведения оценки животных производителей ФГБОУ ВО КалмГУ им. Б.Б. Городовикова
 6. Дата использования предложения: с июня 2023 года.
- Эффективность внедрения: предложенные рекомендации используются для терапии острых повреждений печени животных и разработки новых эффективных способов комбинированного использования гепатопротекторов и метаболических средств.

Директор регионального научно-производственного центра
по воспроизводству сельскохозяйственных животных
и организации проведения оценки животных производителей
ФГБОУ ВО КалмГУ им. Б.Б. Городовикова

 А.И. Хахлинов

Автор предложения, к.м.н., доцент

К.А. Попов



**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. 8 (861) 268-36-84 факс 8 (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК ТОФК 010349101

№ _____ от " _____ " _____ 20 ____ г. на № _____ от " _____ " _____ 20 ____ г.



А.В. Лукина
20 25 г.

АКТ

об использовании предложения в лечебно-диагностическом процессе

1. Наименование предложения: выбор оптимального лабораторного маркера острого повреждения печени.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Патобиохимия ишемически-реперфузионных повреждений печени и способы их метаболической коррекции (клинико-экспериментальное исследование)».
3. Исполнитель: кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Попов Константин Андреевич.
4. Научный консультант: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
5. Место внедрения: клиничко-диагностическая лаборатория.
6. Дата использования предложения: с января 2023 года.
7. Эффективность внедрения: предложенные рекомендации расширяют возможности интерпретации изменений лабораторных маркеров цитолитического синдрома при повреждениях печеночной паренхимы позволяют дифференцировано оценить вклад реперфузионных и ишемических повреждений в развитие патологического процесса после временного выключения печени из системного кровотока.

Заведующая клиничко-диагностической лабораторией

А.А. Шиянь

Автор предложения, к.м.н., доцент

К.А. Попов



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке и стратегическому
развитию ФГБОУ ВО «КалмГУ им. Б.Б.
Гордодовикова»

К.Е. Бадмаева

20.05.2025 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

СПОСОБА ПРОФИЛАКТИКИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫХ
ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

НАЗВАНИЕ СПОСОБА: способ профилактики ишемически-реперфузионных повреждений печени у лабораторных животных.

АВТОР ВНЕДРЕНИЯ: кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Попов Константин Андреевич.

ПРЕДЛОЖЕНИЕ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ в региональном научно-производственном центре по воспроизводству сельскохозяйственных животных Республики Калмыкия с февраля 2025 года.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДЛОЖЕНИЯ: в экспериментальных условиях для изучения защиты печени от ишемически-реперфузионного повреждения выполняется прием прооксидантного preconditionирования путем внутрибрюшинного введения 1 мл 0,5% раствора гидроперекиси трет-бутила или 1 мл 100 мг/100 г дихлорацетата натрия за 1 сутки и за 30 минут перед сосудистой изоляцией. Способ позволяет снизить проявления цитолитического синдрома после основного повреждения печени в ходе ее сосудистой изоляции на 35-45%.

Директор регионального научно-производственного центра
по воспроизводству сельскохозяйственных животных
Республики Калмыкия
ФГБОУ ВО «КалмГУ им. Б.Б. Гордодовикова»

А.И. Хахлинов

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

ГБУЗ Краевой наркологический
диспансер МЗ КК

Д.А. Любченко

"27" 06 2024 г.

АКТ

об использовании предложения в лечебно-диагностическом процессе

1. Наименование предложения: способ лабораторного мониторинга цитолиза гепатоцитов и оценки эффективности гепатопротекторной терапии.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: "Исследование патобиохимических механизмов ишемически-реперфузионного повреждения печени и способов их коррекции".
3. Исполнители: доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Попов Константин Андреевич, ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Азимов Эрустам Адамович.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Быков Илья Михайлович.
5. Дата использования предложения: с января 2024 года
6. Эффективность внедрения:
Предложенный оригинальный способ обеспечил увеличение чувствительности и специфичности маркеров цитолиза гепатоцитов, что расширило обоснования для назначения гепатопротекторной терапии, позволило мониторить ее эффективность и при необходимости вносить коррективы в лечебную тактику.

Зав. наркологическим отделением

Г.Ю.Вакуленко

Авторы предложения

И.М. Быков

К.А. Попов

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. 8 (861) 268-36-84 факс 8 (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК ТОФК 010349101

№ _____ от " _____ " _____ 20 ____ г. на № _____ от " _____ " _____ 20 ____ г.



УТВЕРЖДАЮ

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

Т.В. Гайворонская

« 15 » _____ 20 25 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Попова Константина Андреевича
в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации докторской диссертации Попова Константина Андреевича на тему «Патобиохимия ишемически-реперфузионных повреждений печени и способы их метаболической коррекции (клинико-экспериментальное исследование)» внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии при изучении дисциплин «биологическая химия» и «клиническая биохимия», читаемых студентам по специальностям 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия, 31.05.03 Стоматология, 32.05.01 Медико-профилактическое дело, 33.05.01 Фармация.

В течение 2024/2025 учебного года прочитано 7 лекций, включающих аспекты диссертационного исследования К.А. Попова.

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

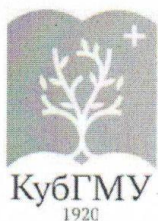
И.М. Быков

Автор предложения, к.м.н., доцент

К.А. Попов

Начальник учебного управления
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Е.И. Быстрова



**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. 8 (861) 268-36-84 факс 8 (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК ТОФК 010349101

№ _____ от " _____ " _____ 20 ____ г. на № _____ от " _____ " _____ 20 ____ г.



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научно-исследовательской
работе ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России,
д.м.н., профессор

А.Н. Редько

20 ____ г.

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: система рекомендаций по экспериментальному моделированию ишемически-реперфузионных повреждений печени с оценкой эффективности способов фармакологического preconditionирования.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Патобиохимия ишемически-реперфузионных повреждений печени и способы их метаболической коррекции (клинико-экспериментальное исследование)».
3. Исполнитель: кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Попов Константин Андреевич.
4. Научный консультант: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, доктор медицинских наук, профессор И.М. Быков.
5. Место внедрения: отдел фундаментальных исследований в области регенеративной медицины центральной научно-исследовательской лаборатории.
6. Дата использования предложения: с января 2023 года.
7. Эффективность внедрения: предложенные рекомендации используются в экспериментальной работе центральной научно-исследовательской лаборатории для создания моделей острых повреждений печени и изучения перспективных способов гепатопротекторной терапии.

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

К.И. Мелконян

Автор предложения, к.м.н., доцент

К.А. Попов



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

ФГБОУ ВО «КалмГУ им. Б.Б. Городовикова»

Б.А. Натыева

05 20 25 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в учебный процесс кафедры химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова» результатов диссертационного исследования Попова Константина Андреевича на тему «Патобиохимия ишемически-реперфузионных повреждений печени и способы их метаболической коррекции (клинико-экспериментальное исследование)».

Комиссия в составе и.о. заведующего кафедрой химии и фармацевтической технологии, к.б.н., доцента Л.В. Джабруевой (председатель); доцента кафедры химии и фармацевтической технологии, к.б.н. Ц.Д. Даваевой, профессора кафедры химии и фармацевтической технологии, д.б.н. Л.Х. Сангаджиевой удостоверяет, что результаты диссертационного исследования Попова Константина Андреевича на тему «Патобиохимия ишемически-реперфузионных повреждений печени и способы их метаболической коррекции (клинико-экспериментальное исследование)» используются в учебном процессе при разработке курсов лекций и проведении практических занятий по дисциплинам «Биологическая химия» и «Токсикологическая химия» для студентов, обучающихся по специальностям 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия, 36.05.01 Ветеринария и 33.05.01 Фармация.

В течение 2024/2025 учебного года прочитано 5 лекций, включающих аспекты диссертационного исследования К.А. Попова.

И.о. заведующего кафедрой
химии и фармацевтической технологии
ФГБОУ ВО «КалмГУ им. Б.Б. Городовикова»
к.б.н., доцент

Л.В. Джабруева

Профессор кафедры
химии и фармацевтической технологии
ФГБОУ ВО «КалмГУ им. Б.Б. Городовикова»
д.б.н., профессор

Л.Х. Сангаджиева

Доцент кафедры
химии и фармацевтической технологии
ФГБОУ ВО «КалмГУ им. Б.Б. Городовикова»
к.б.н.

Ц.Д. Даваева



Патенты на изобретения

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2593340

**СПОСОБ БИОХИМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ
МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ЖЕЛЧИ ПРИ
ЛИТОГЕНЕЗЕ**

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России) (RU), Быков Михаил Ильич (RU), Басов Александр Александрович (RU), Попов Константин Андреевич (RU), Малышко Вадим Владимирович (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015128708

Приоритет изобретения 14 июля 2015 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 11 июля 2016 г.

Срок действия патента истекает 14 июля 2035 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2644305

СПОСОБ СНИЖЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОЛИЗА В
УСЛОВИЯХ ЧАСТИЧНОЙ СОСУДИСТОЙ ИЗОЛЯЦИИ
ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Патентообладатели: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (RU), Цымбалюк Игорь Юрьевич (RU), Мануйлов Александр Михайлович (RU), Басов Александр Александрович (RU), Попов Константин Андреевич (RU), Хубиева Фатима Умаровна (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017101902

Приоритет изобретения 20 января 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 08 февраля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 20 января 2037 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



Базы данных

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2025620526

**Лабораторные показатели крови крыс в условии
экспериментального моделирования ишемически-
реперфузионного повреждения печени**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Кубанский государственный медицинский университет"
Министерства Здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Попов Константин Андреевич (RU), Тутаришева
Саида Муратовна (RU), Быков Илья Михайлович (RU)*



Заявка № 2024626042

Дата поступления 05 декабря 2024 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 29 января 2025 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

документ подписан электронной подписью
Сертификат: 0592e781ac3005f54f2401670bca2026
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2025620441

**Лабораторные маркеры, ассоциированные с разным
уровнем употребления алкоголя**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Кубанский государственный медицинский
университет" Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Ермакова Галина Алексеевна (RU), Быков Илья
Михайлович (RU), Попов Константин Андреевич (RU)*

Заявка № 2024626058

Дата поступления 05 декабря 2024 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 24 января 2025 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

документ подписан электронной подписью

Сертификат: 0692e7b1d63300b542401e70bca2026

Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**

Действителен с 10.07.2024 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов