

На правах рукописи

ПОПОВ Константин Андреевич

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

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Краснодар – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России).

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Быков Илья Михайлович.

Официальные оппоненты:

Синицкий Антон Иванович, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биохимии имени Р.И. Лифшица, заведующий кафедрой;

Звягина Валентина Ивановна, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, доцент кафедры;

Микашинович Зоя Ивановна, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра общей и клинической биохимии № 1, профессор кафедры.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 28 октября 2025 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.014.02 на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4, тел. (861) 262-50-18).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и официальном сайте (<http://www.ksma.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.2.014.02
доктор медицинских наук,
профессор



Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Dar W.A. et al., 2019]. Также ишемия и реперфузия являются одними из ключевых проблем критических состояний в реаниматологии [Ito T. et al., 2021]. 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 [Liu J. et al., 2022]. 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 [Bavarsad K. et al., 2019]. 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 [Tang S.P. et al., 2022; Deng X. et al., 2023]. 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 [Qi B. et al., 2021; Asong-Fontem N. et al., 2022]. 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 [Мао Х.Л. et al., 2022]. 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_{ATP} -каналы) и аденозина, ингаляционных анестетиков, в том числе севофлурана [Nieuwenhuijs-Moeke G. et al., 2021; Benoit L. et al., 2023]. Показана возможность использования инертных газов для защиты донорской печени от ИРП при трансплантации [Smit K.F. et al., 2019]. 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 [Yadav M. et al., 2020]. 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 условиях 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 preconditionирования, 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);

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 preconditionирования ишемически-реперфузионного повреждения печени за счет использования активатора пируватдегидрогеназы – дихлорацетата натрия (патент № 2644305 от 08.02.2018);

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 условиях 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). Представлены и обсуждены метаболические изменения в крови, гомогенате печени, митохондриальной и цитозольной фракциях гомогената, желчи (патент № 2593340, от 10.08.2016). 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 условиях 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). Анализ механизмов цитопротективного действия дихлорацетата натрия позволил предположить возможность эффекта прооксидантного прекондиционирования, 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 прекондиционирования 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 (АК) 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 патобиохимические 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.

Публикации. 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, зарегистрированы 2 базы данных.

Личный вклад автора в исследование. Автор 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 патофизиологии 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 %.

Структура и объем 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 источник, из которых 21 отечественных и 240 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с целью и задачами исследования был разработан дизайн, представленный на рисунке 1. Проведение исследования было одобрено независимым этическим комитетом при ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России на заседании 29 января 2021 г., протокол № 96.

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. Для выполнения полной сосудистой изоляции после срединной лапаротомии выделяли аналог гепатодуоденальной связки и пережимали атравматическим сосудистым зажимом типа Бульдог. Для моделирования частичной сосудистой изоляции пережимали сосудистые пучки, питающие левую боковую и центральную доли печени крыс. После ишемического или реперфузионного периода определенной продолжительности выполняли забор крови из каудальной полой вены в шприцы с гепарином натрия и образцов ткани печени. При моделировании частичной васкулярной эксклюзии отдельно забирали ишемизированные и интактные доли органа.

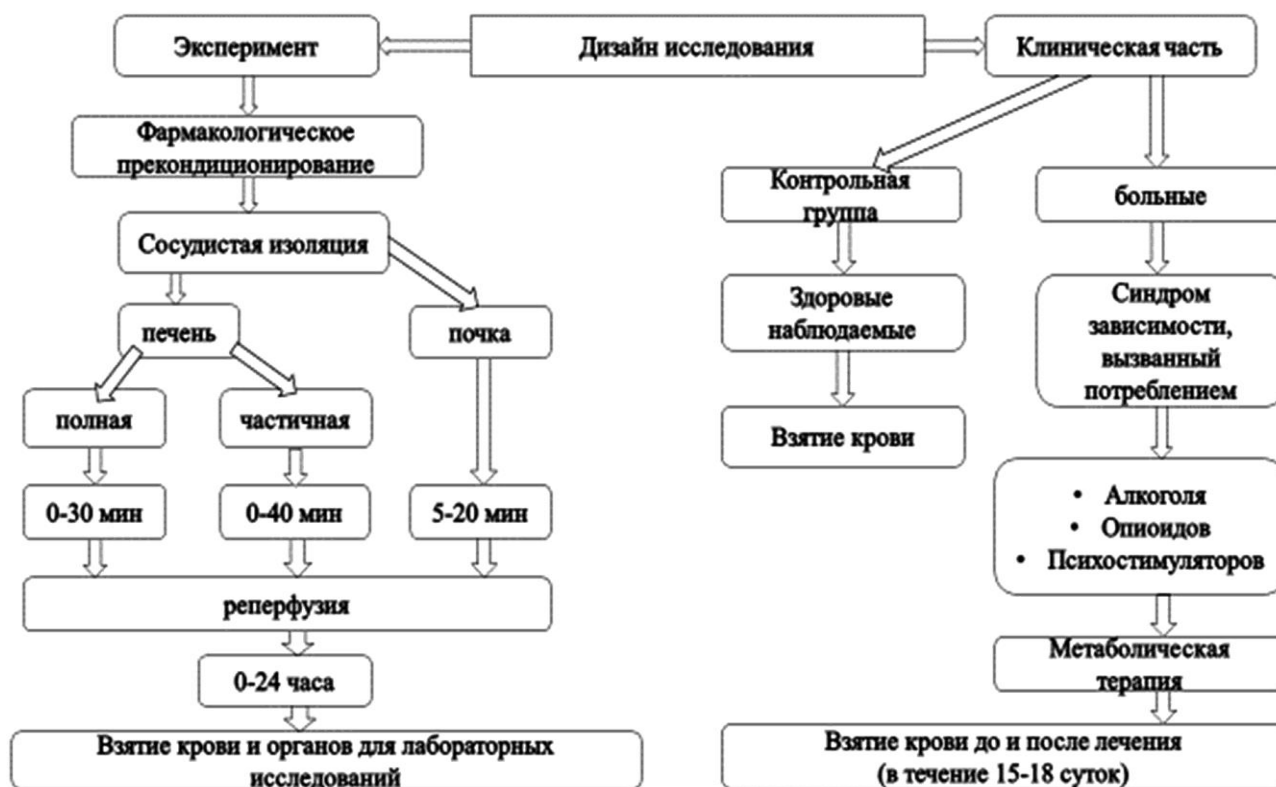


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Для фармакологического preconditionирования на экспериментальном этапе использовали: физиологический раствор, ремаксол (НТТФ Полисан, Россия, в 1,0 литре раствора содержит янтарную кислоту (сукцинат) – 5,280 г; N-метилглуксамин (меглюмин) – 8,725 г; инозин (рибоксин) – 2,0 г; метионин – 0,75 г; никотинамид – 0,25 г), растворы АК (10 мг/100 г), липоевой кислоты (4 мг/100 г), эмульсию α -токоферола ацетата (4 мг/100 г), дихлорацетата натрия (100 мг/100 г), кокарбоксилазы (4 мг/100 г), пирувата натрия (10 мг/100 г), 0,1–1 % растворы трет-бутил гидропероксида (ГПТБ), 1–3 % растворы пероксида водорода, растворы ЭДТА 0,2–0,4 %, дефероксамина (50 мг/кг). Вышеперечисленные вещества и препараты вводили внутривенно. Использовали схемы монотерапии и комбинированного введения препаратов.

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.

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.

Для оценки эффективности метаболической гепатопротекции 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 3 группы были разделены на 2 подгруппы в зависимости от проводимой дезинтоксикационной терапии: «С» (стандартный курс терапии) и «Р» (стандартный курс терапии, дополненный ремаксолом). Ремаксол вводили по 400 мл 1 раз в день в течение 10 дней.

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

Для оценки эффективности комбинированной метаболической коррекции повреждений печени при алкогольном гепатите с использованием серосодержащих гепатопротекторов были сформированы следующие группы испытуемых лиц:

Контрольная группа – 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, которым вводили адеметионин (400 мг в/в ежедневно в составе лекарственного препарата «Гепцифол», Фармсинтез АО, Россия), липоевую кислоту (600 мг в/в ежедневно в составе лекарственного препарата «Октолипен», Уфимский витаминный завод, Россия) или оба препарата одновременно.

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.

Лабораторный этап исследования выполнен на трех базах: клинико-диагностические лаборатории университетской клиники и наркодиспансера, лаборатория кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

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 аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и гамма-глутамилтрансферазы (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).

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 Randox (Великобритания).

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). Для определения концентрации пирувата использовали набор реагентов «ПИРУВАТ UV-АБРИС+ Энзиматический UV-метод» («НПФ АБРИС+», Россия). Для определения активности пируватдегидрогеназы использовали набор реагентов ab110671 Pyruvate dehydrogenase (PDH) Combo (Activity+Quantity) Microplate Assay Kit (Abcam Limited, Великобритания). Определение мембранного потенциала митохондрий осуществляли с использованием катионного флуоресцентного красителя сафранин О (AppliChem, США).

Для оценки состояния прооксидантно-антиоксидантного статуса биожидкостей определяли общую антиоксидантную активность (АОА), содержание восстановленного и окисленного глутатиона, тиоловых групп белков плазмы крови, активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР), глутатион-S-трансферазы, каталазы (КАТ) и супероксиддисмутазы (СОД), 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) [Gulcin İ., 2020] и способ оценки скорости сорбции катионного радикала 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) диаммониевой соли (АБТС) [Rumpf J. et al., 2023]. Содержание восстановленного и окисленного глутатиона определяли по методике, основанной на использовании реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), ДТБН) [Карпищенко А.И. и соавт., 2012]. 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 pH 7,4 [Попов К.А. и соавт., 2017; Karbasi S. et al., 2023]. Определение активности глутатионпероксидазы проводили по методике, основанной на расходовании глутатиона при нейтрализации гидроперекиси трет-бутила. Определение активности глутатионредуктазы выполняли по методике, основанной на реакции фермента – восстановлении окисленной формы глутатиона с использованием НАДФН. Определение активности глутатион-S-трансферазы осуществляли по методике, основанной на измерении скорости образования конъюгата с 2,4-динитро-1-хлорбензолом. Определение активности каталазы было основано на способности перекиси водорода поглощать свет в УФ-области спектра при 260 нм [Карпищенко А.И. и соавт., 2012]. Определение активности супероксиддисмутазы выполняли по непрямому методу, основанному на регистрации степени торможения реакции окисления кверцетина в среде с генерацией супероксидных анион-радикалов [Костюк В.А. и соавт., 1990].

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 [Лемешко В.В. и соавт., 1987]. Для определения концентрации 8-OHdG использовали коммерческие наборы реагентов ab201734 (Abcam, USA). Для определения содержания продуктов липопероксидации 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 [Hempel S. L. et al., 1999].

Концентрацию ионов кальция, магния и цинка в плазме крови определяли с использованием наборов реагентов АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия). Для определения сывороточного железа и ферритина использовали наборы реагентов Randox (Великобритания). 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).

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. Проверка на нормальность включала

автоматическое определения целого ряда критериев, среди которых ориентировались в первую очередь на критерий Шапиро-Уилка, который предпочтителен для использования при небольших объемах выборки [Субботина А.В., Гржибовский А.М., 2014]. 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 [Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.М., 2011]. 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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. 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

(рисунок 2). В данной ситуации с одной стороны может иметь место разрушение ткани печени в результате повреждающего действия реперфузии с высвобождением большого количества ферментов-маркеров цитолиза в кровь, с другой стороны такой отсроченный характер увеличения активности АЛТ, АСТ и ЛДГ может быть результатом сохранения ишемии в части печеночной паренхимы после восстановления кровотока.

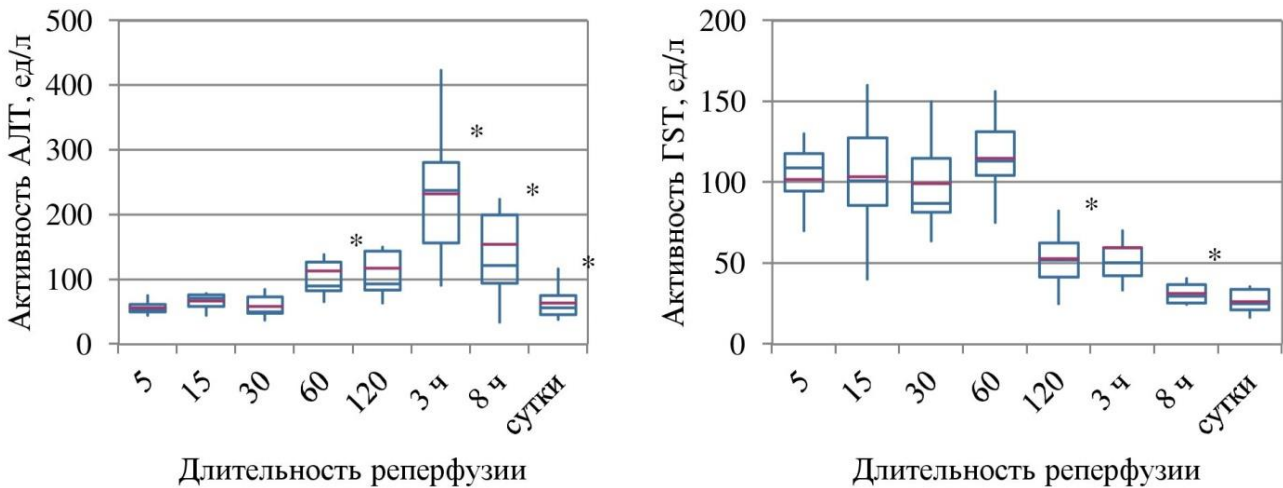


Рисунок 2 – Изменение активности аланинаминотрансферазы и глутатион-S-трансферазы после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс (Me (Q1/Q3)):

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

Оценка динамики изменений показателей окислительного гомеостаза в ранние сроки реперфузионного периода после 20-минутной полной сосудистой изоляции печени крыс показала ряд особенностей. Это увеличение антиоксидантной активности плазмы крови, регистрируемое в течение 60–120 минут после начала реперфузионной стадии, что связано с эффектом высвобождения в кровь метаболитов с восстановительной активностью из поврежденных клеток печени. Выявленные изменения показателей эритроцитарной взвеси 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, характеризующийся поддержанием более высокой активности глутатионпероксидазы в первые 5 минут и концентрации глутатиона в течение 60 минут. Накопление ТБК-реактивных продуктов сдерживалось вплоть до 60 минут реперфузии.

Множественный 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:

$$\text{АЛТ (8 часов реперфузии)} = -321,1635 + 533,0977 * \text{ТБЧ} + 312,9255 * \text{АБТС (скорректированный } R^2 = 0,9382).$$

Была проведена оценка изменений маркеров окислительного гомеостаза в крови и печени животных в динамике развития ишемически-реперфузионного повреждения печени с 5 минутным интервалом забора материала в течение 20 минут ишемии и 20 минут после восстановления кровотока. В результате было установлено 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 (рисунок 3).

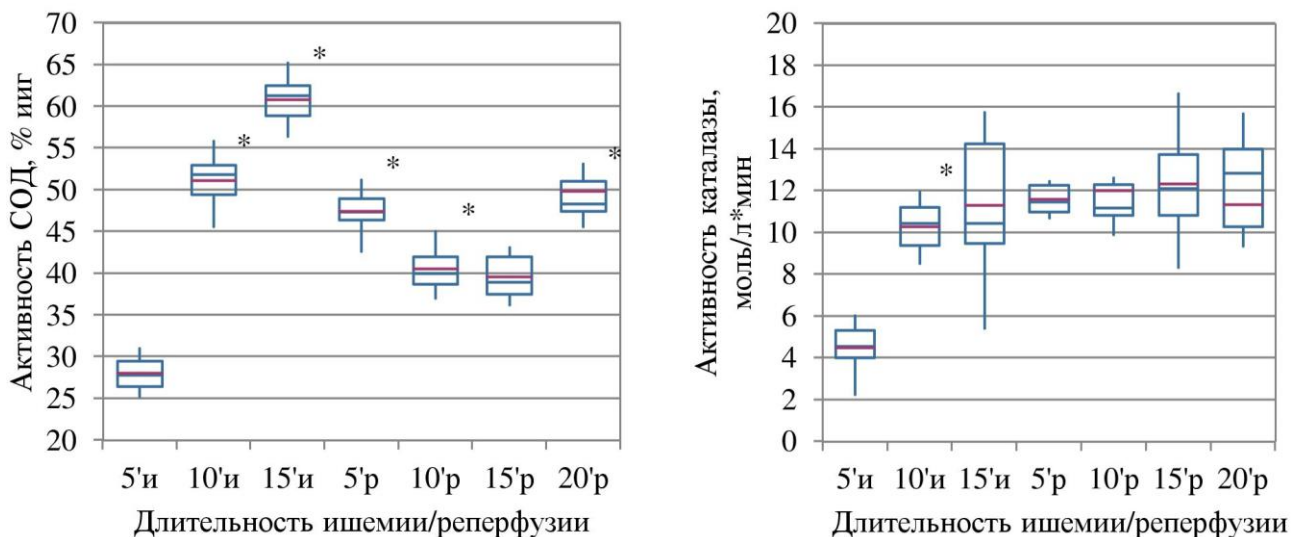


Рисунок 3 – Изменение активности супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах при ишемии-реперфузии печени крыс (Me (Q1/Q3)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с показателем предыдущего этапа наблюдения

Кроме того, отмечалось увеличение активности исследуемых ферментов эритроцитарной взвеси и тенденция к прогрессирующему снижению активности этих же ферментов в ткани печени (таблица 1). Полученные данные указывают на необходимость метаболической поддержки АОС при ИРП печени.

Таблица 1 – 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.

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.

Отдельного внимания заслуживает анализ изменений функционального состояния ПДК. 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 в условиях ИРП печени также наблюдается эффект снижения активности пируватдегидрогеназы при восстановлении кровотока после поддержания ее на уровне, близком нормальному, в ишемической фазе. 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 %. Полученные данные являются основанием для поиска способов метаболической коррекции, нацеленной на регуляцию активности ПДК с помощью его активатора ДХА натрия, кофакторов и изменения концентрации субстрата.

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. Так 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 (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса 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)
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.

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.

Анализ фундаментальных особенностей ИРП печени позволил 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. Техническим недостатком моделей полной сосудистой изоляции печени является необходимость выполнения сложных портокавальных анастомозов, необходимых для сброса давления в системе воротной вены при пролонгировании ишемии в течение 25 минут и более. 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. 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.

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. 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 (таблица 3).

Таблица 3 – Динамика изменений активности ферментов антиоксидантной системы эритроцитов на фоне односторонней ишемии почки (Ме (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)
5минИ	33,0 (31,2/35,5)	34,4 (27,3/42,9)*	328 (305/352)	263 (219/303)
10минИ	31,8 (30,7/33,0)	28,8 (27,1/31,0)	375 (344/395)	198 (179/219)*
15минИ	37,6 (33,7/41,6)*	33,5 (31,0/35,8)	369 (343/392)	352 (306/381)*
20минИ	44,1 (40,3/48,3)*	30,6 (26,1/34,8)	338 (309/367)	241 (200/292)*
5минР	21,6 (20,0/22,4)*	34,4 (28,5/43,1)	150 (113/173)*	173 (137/195)*
10минР	44,2 (36,4/49,9)*	31,1 (26,7/37,7)	495 (441/539)*	284 (251/308)*
15минР	35,3 (32,1/37,4)*	26,2 (22,3/30,6)	261 (249/276)*	247 (211/288)
20минР	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.

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.

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.

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.

Оценка изменений микроэлементного гомеостаза также позволила получить ценную информацию о развитии повреждения печени при ишемии-реперфузии. 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. Анализ изменений содержания микроэлементов в плазме крови в целом подтвердил данную гипотезу (таблица 4).

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. 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.

Таблица 4 – Изменения некоторых микроэлементов в плазме крови крыс в процессе развития ишемически-реперфузионного повреждения печени (Ме (Q1/Q3))

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.

Особенности биохимических нарушений, проанализированные выше, обусловили направленный поиск перспективных стратегий метаболической терапии ишемически-реперфузионного повреждений печени в эксперименте. Основной задачей исследования было совершенствование методов фармакологического preconditionирования 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).

В результате оценки цитопротективной активности комбинированного энерготропного preconditionирования ИРП печени было подтверждено синергетическое действие компонентов ремаксолола 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. Так на фоне введения ремаксолола 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. Данные получены в сравнении с самостоятельным использованием одного из компонентов комбинированной схемы кондиционирования. Таким образом, ключевая гипотеза о более высокой эффективности использования ремаксолола с антиоксидантами прямого механизма действия была подтверждена (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние антиоксидантного прекондиционирования в условии 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+АК	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+АК+ЛК	228,6 (176,5/302,4)*	338,8 (273,2/412,8)*	656,8 (603,8/693,0)*
11 Р+АК+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.

Анализ влияния используемых гепатопротекторов в условии васкулярной эксклюзии печени на антиоксидантную активность плазмы крови показал значительный рост железо-восстанавливающей способности биожидкости. 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. 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 прекондиционирования. Так в условии моделирования ИРП печени без проведения метаболической коррекции содержание ТБК-реактивных продуктов было увеличено в эритроцитах в 4,4 раза. В условии комбинации ремаксол с липоевой кислотой были достигнуты наиболее низкие значения концентрации ТБК-реактивных продуктов, которые превышали контрольные цифры только в 1,6–1,9 раза. 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 (рисунок 4).

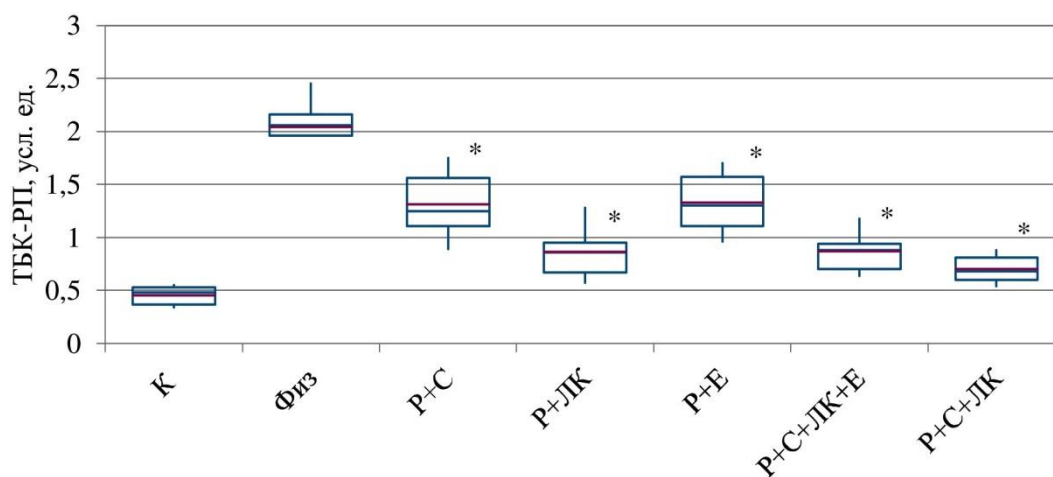


Рисунок 4 – Влияние комбинированной антиоксидантной терапии на концентрацию продуктов липопероксидации в эритроцитах крыс после ишемии-реперфузии печени (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением маркера 2 группы (Физ). Сокращения: К – контрольная группа; Физ – группа животных, которым вводили физиологический раствор; Р – ремаксол; С – аскорбиновая кислота; ЛК – липоевая кислота; Е – токоферола ацетат

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 (таблица 6). 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 оксидативных повреждений биомолекул была снижена в опытной группе в обеих долях примерно в равной степени (на 34–44 %) 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.

Таблица 6 – Влияние антиоксидантного прекондиционирования на баланс прооксидантно-антиоксидантной системы печени в условии ишемии-реперфузии (Me (Q₁/Q₃))

Исследуемые показатели	Экспериментальная модель: 40 мин частичная ишемия + 180 мин реперфузия			
	Используемые антиоксиданты (введение за сутки до и непосредственно перед экспериментом):			
	Физиологический раствор 2 мл (группа сравнения)		Ремаксол 2 мл + 20 мг АК + 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-реактивные продукты, 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-АБТС, 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.

Другой перспективной возможностью повышения эффективности фармакологического прекондиционирования ИРП является воздействие на ПДК. В эксперименте использовали активатор ПДК – ДХА натрия и коферменты ПДК – тиаминпирофосфат и липоевую кислоту. 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, раза. 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. Предварительное введение ДХА натрия способствовало росту активности пируватдегидрогеназы в 2–3 раза в условиях ишемии или реперфузии, снижению уровня лактата, активности ЛДГ, АСТ и АЛТ в плазме крови. Оценка прооксидантно-антиоксидантного баланса у крыс изученных групп показала выраженное влияние липоевой кислоты, которое заключалось 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.

В результате определения активности пируватдегидрогеназы в условиях preconditionирования ДХА натрия было установлено увеличение анализируемого параметра как в ишемическом, так и в реперфузионном периоде в равной степени. 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, АК 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. 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. Поэтому основной гипотезой, способной объяснить цитопротективную активность ДХА натрия в условиях ИРП печени, является имитация ишемического preconditionирования опосредованная интенсификацией образования активных форм кислорода в ишемический период. 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 при условии инкубирования с ДХА натрия была определена статистически значимо увеличенная на 13 % флуоресценция зонда H_2DCF –

редокс-зависимого флуоресцентного зонда, интенсивность свечения которого прямо пропорциональна уровню генерации АФК в клетках.

В условии прекондиционирования 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 (рисунок 5).

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.

С учетом предполагаемых эффектов ДХА натрия, связанных с индукцией окислительного стресса, было предложено апробировать в эксперименте прооксидантное прекондиционирование с использованием окислителей прямого действия (0,5 % раствор ГПТБ 1 мл внутрибрюшинно).

В результате проведенных исследований было показано, что защита печени от повреждающего действия ИРП возможна с использованием эффекта прооксидантного прекондиционирования (таблица 7). Было показано, что для этих целей в эксперименте может использоваться 0,5 % раствор ГПТБ, который

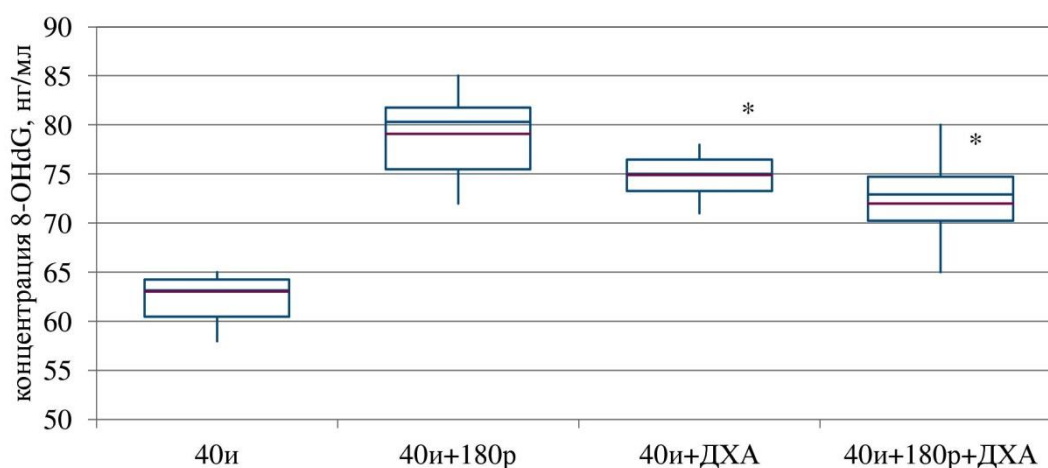


Рисунок 5 – Влияние дихлорацетата натрия на образование 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в гомогенате печени после ишемии и реперфузии (Me (Q₁/Q₃)): * – статистически значимые (p < 0,05) различия при сравнении со значением показателя группы сравнения (без ДХА натрия). Сокращения: 40и – ишемический период 40 минут; 180р – реперфузионный период 180 минут; ДХА – в условии прекондиционирования дихлорацетатом натрия

вводили в объеме 1 мл внутривенно за сутки до моделирования частичной сосудистой изоляции печени. 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. 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.

Таблица 7 – Влияние preconditionирования гидропероксидом трет-бутила на цитолиз гепатоцитов в условиях 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.

В условиях preconditionирования 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. Введение АК ожидаемо обеспечивало поддержание высокого уровня антиоксидантной активности плазмы крови, которая после моделирования ИРП даже превышала контрольные значения на 34 %. Комбинированное preconditionирование характеризовалось значением железо-восстанавливающей активности плазмы крови в пределах контрольного уровня после выполнения эксперимента. Определение содержания ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси животных экспериментальных групп показало практически полностью противоположные изменения антиоксидантной активности результаты. В условиях 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. 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. Комбинированное введение ГПТБ и АК характеризовалось нивелированием эффектов друг друга и поддержанием уровня ТБК-реактивных продуктов эритроцитарной взвеси в пределах значений, характерных для животных группы сравнения (рисунок 6).

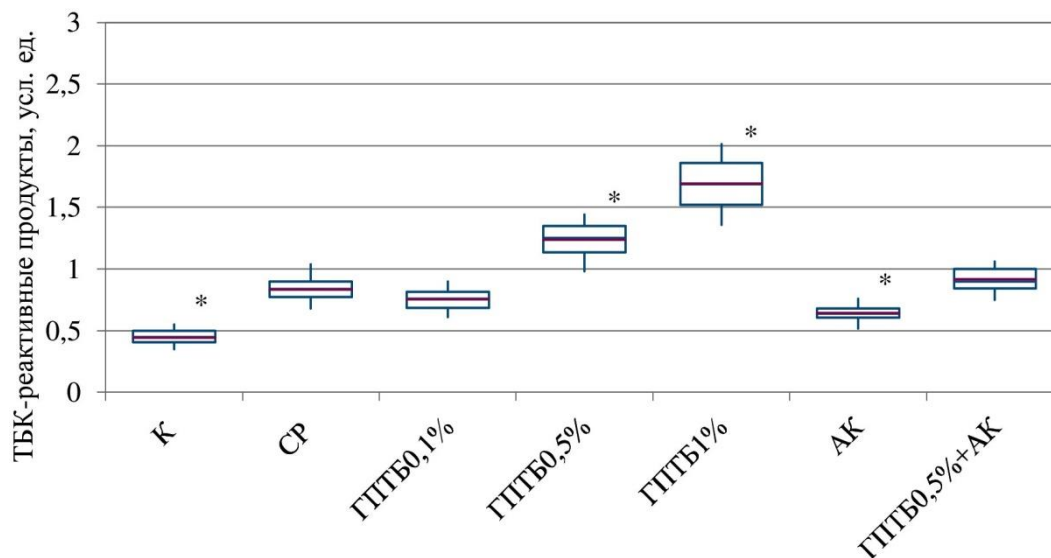


Рисунок 6 – Влияние прооксидантного preconditionирования на изменения интенсивности накопления продуктов липопероксидации в крови в условии экспериментального моделирования ишемии-реперфузии печени (Me (Q_1/Q_3)): * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия от показателя группы сравнения (СР).

Сокращения: ГПТБ – гидропероксид трет-бутила; АК – аскорбиновая кислота

С учетом выявленных особенностей изменений микроэлементного гомеостаза на фоне ИРП печени у крыс было предложено провести оценку эффективности использования хелаторов. Проведенные исследования подтвердили возможность профилактики ИРП путем preconditionирования с использованием неселективных и селективных хелаторов ионов металлов. 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 %. В условии preconditionирования селективным хелатором ионов железа – 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. Оценка изменений общей антиоксидантной активности показала практически полное отсутствие влияния хелатотерапии, что объяснимо косвенным механизмом влияния препаратов на окислительный метаболизм в условии низкой их восстановительной способности.

В клинко-экспериментальной практике распространены повреждения печени различного этиопатогенеза. Общие звенья патогенеза при ишемии-реперфузии и интоксикации ксенобиотиками позволяют оценить эффективность разрабатываемых способов метаболической коррекции у больных с токсическими формами гепатита. 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. Активность печеночных аминотрансфераз в сыворотке крови на фоне зависимости от опиоидов и психостимуляторов была увеличена в 2,0–3,0 раза, а на фоне алкогольной зависимости – в 5,0–7,0 раз. Для больных с алкогольным гепатитом были характерны увеличенные значения активности ГГТ в 3,3–3,8 раза.

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. Была подтверждена более высокая эффективность комбинированной метаболической терапии с использованием ремаксол, 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.

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. 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 на 26–40 % и увеличением образования продуктов свободнорадикальных повреждений биомолекул в 2,7–3,4 раза. В эритроцитарной взвеси больных с синдромом алкогольной зависимости концентрация ТБК-реактивных продуктов была увеличена в меньшей степени – в 1,7–1,9 раза. 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 ремаксол – 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.

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. 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.

Анализ особенностей влияния комбинированного использования серосодержащих гепатопротекторов также позволил сделать ряд важных наблюдений. В клинических условиях установлено наличие синергетического эффекта при комбинированном использовании адеметионина и липоевой кислоты для лечения алкогольного гепатита. 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 после лечения продемонстрировал наличие статистически значимых различий, а попарные сравнения подтвердили, что уровень рассматриваемого лабораторного показателя пациентов, получавших и адеметионин, и липоевую кислоту находится на наиболее низком уровне, значимо различающемся от данных, полученных в ходе монотерапии. Аналогичные данные получены и при анализе изменений активности ГГТ, которую обычно рассматривают как один из непрямых маркеров употребления алкоголя (рисунок 7).

Одним из механизмов синергетического действия адеметионина и липоевой кислоты может быть наличие разных молекулярных мишеней. 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. Железо-восстанавливающая способность плазмы крови больных, получавших липоевую кислоту после лечения увеличивалась на 59–62 %, а введение адеметионина не влияло на данный лабораторный показатель.

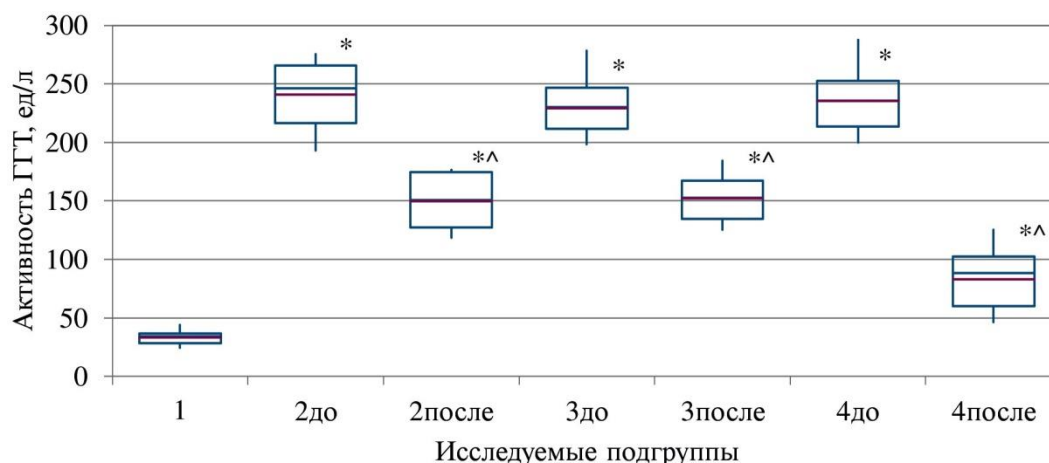


Рисунок 7 – Изменение активности ГГТ в сыворотке крови больных алкогольным гепатитом на фоне комбинированной терапии серосодержащими гепатопротекторами (Me (Q₁/Q₃)):

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

^ – статистически значимые различия от исходного значения показателя. Исследуемые подгруппы больных: 1 – здоровые добровольцы; 2–4 больные алкогольным гепатитом в условии терапии с использованием адеметионина (2), липоевой кислоты (3) или обоих препаратов (4)

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). 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 ДХА 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)-(ПГ-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 ремаксола, 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 условии 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 прекондиционирования 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 прекондиционирование 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 ремаксоло (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 ИССЛЕДОВАНИЯ

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 исследование 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 полиорганных нарушений. Такие исследования имеют интерес, связанный с разработкой прогностических лабораторных маркеров. Анализ медикаментозных подходов к прекондиционированию 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования

1. Метаболическая коррекция дихлорацетатом натрия ишемически-реперфузионного повреждения при сосудистой изоляции печени в эксперименте / И.Ю. Цымбалюк, А.М. Мануйлов, **К.А. Попов**, А.А. Басов // Новости хирургии. – 2017. – Т. 25. – № 5. – С. 447–453.

2. Effect of drinking ration with reduced deuterium content on brain tissue prooxidant-antioxidant balance in rats with acute hypoxia model / A.A. Kravtsov, S.V. Kozin, **К.А. Попов** [et al.] // Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences. – 2018. – Vol. 8. – № 2. – P. 42–51.

3. Characterization of the metabolic disorders in rats with alloxan-induced diabetes and chronic alcoholic intoxication / I.M. Bykov, **К.А. Попов**, H.P. Berberidy [et al.] // Medical News of North Caucasus. – 2018. – Vol. 13. – № 3. – P. 511–515.

4. Changes in state of the thiol linkages of an antioxidant system during ischemia and reperfusion, against a background of vascular exclusion in the rat liver / **К.А. Попов**, I.M. Bykov, I.Yu. Tsymbalyuk [et al.] // Medical News of North Caucasus. – 2018. – Vol. 13. – № 3. – P. 525–529.

5. Изменения мембранного потенциала митохондрий в зависимости от длительности ишемии и реперфузии / **К.А. Попов**, И.М. Быков,

И.Ю. Цымбалюк [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14. – № 1.2. – С. 231–234.

6. Changes in prooxidant-antioxidant system indices in the blood and brain of rats with modelled acute hypoxia which consumed a deuterium-depleted drinking diet / A.A. Basov, S.V. Kozin, **К.А. Попов** [et al.] // Biology Bulletin. – 2019. – Vol. 46. – № 6. – P. 531–535.

7. Comparison of the effectiveness of various sulphur-containing hepatoprotectors against chronic alcoholization / I.M. Bykov, H.P. Berberidi, **К.А. Попов** [et al.] // Medical News of North Caucasus. – 2019. – Vol. 14. – № 3. – P. 523–527.

8. Маркеры окислительного стресса у пациентов с синдромом зависимости от опиоидов и психостимуляторов / И.М. Быков, Д.А. Любченко, **К.А. Попов** [и др.] // Инновационная медицина Кубани. – 2020. – № 4. – С. 20–26.

9. Markers of endogenous intoxication and oxidative stress in patients with opioid dependences / I. Bykov, **К. Попов**, D. Lubchenko [et al.] // Archive Euromedica. – 2020. – Vol. 10. – № 4. – С. 23–25.

10. Выбор оптимального маркера острого повреждения печени крыс в эксперименте / **К.А. Попов**, И.Ю. Цымбалюк, Р.И. Сепиашвили [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2020. – Т. 24. – № 4. – С. 293–303.

11. Peculiarities of evaluation of the oral fluid antioxidant activity in patients with local or systemic diseases / **К. Попов**, N. Bykova, O. Shvets [et al.] // Georgian Medical News. – 2021. – № 2. – P. 68–73.

12. Изменение свободнорадикальных процессов в организме крыс под влиянием низкочастотного электромагнитного поля / Е.Е. Текуцкая, И.С. Рябова, **К.А. Попов** [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172. – № 11. – С. 602–606.

13. Прооксидантное прекондиционирование ишемически-реперфузионного поражения печени в эксперименте / **К.А. Попов**, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2022. – Т. 17. – № 1. – С. 56–59.

14. Изменения показателей прооксидантно-антиоксидантной системы у больных с синдромом зависимости от наркотических веществ в реабилитационном периоде / И.М. Быков, Д.А. Любченко, **К.А. Попов** [и др.] // Инновационная медицина Кубани. – 2022. – № 2. – С. 31–36.

15. Влияние раствора этилового спирта со сниженным содержанием дейтерия на развитие хронической алкогольной интоксикации в эксперименте / **К.А. Попов**, Г.А. Ермакова, И.М. Быков [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2023. – Т. 104. – № 1. – С. 81–88.

16. Сравнительная оценка влияния гепатопротекторов на состояние окислительного гомеостаза в крови больных алкогольным гепатитом: рандомизированное экспериментальное исследование / И.М. Быков,

Г.А. Ермакова, **К.А. Попов** [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2023. – Т. 30. – № 1. – С. 88–97.

17. Смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме лабораторных животных при пятикратном повышении концентрации дейтерия в питьевом рационе / С.В. Козин, О.М. Лясота, **К.А. Попов** [и др.] // Биофизика. – 2023. – Т. 68. – № 2. – С. 369–375.

18. Correction of ischemic reperfusion liver damage in the experiment with the use of antioxidant drugs / **К.А. Попов**, I.M. Bykov, I.Yu. Tsymbalyuk, M.I. Bykov // Medical News of North Caucasus. – 2023. – Т. 18. – № 2. – Р. 164–168.

19. Влияние комбинированной гепатопротекторной терапии серосодержащими препаратами на состояние окислительного гомеостаза в крови больных алкогольным гепатитом: рандомизированное проспективное исследование / И.М. Быков, Г.А. Ермакова, **К.А. Попов** [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2024. – № 6. – С. 15–27.

20. Ermakova, G.A. Combined hepatoprotective therapy for experimental alcoholic liver damage / G.A. Ermakova, **К.А. Попов**, I.M. Bykov // Medical News of North Caucasus. – 2024. – Vol. 19. – № 2. – Р. 158–162.

21. Патобиохимические особенности развития пострезекционной печеночной недостаточности и перспективы ее метаболической коррекции / И.М. Быков, А.С. Шевченко, **К.А. Попов** [и др.] // Инновационная медицина Кубани. – 2024. – № 1. – С. 144–151.

22. Thiol groups of proteins of the blood plasma as the state indices for the non-specific resistance system of an organism / I. Bykov, I. Egorova, **К. Попов** [et al.] // Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: innovative technologies, Filodiritto International Proceedings, Bologna, Italy. – 2018. – Vol. 10. – Р. 291–334.

Работы, опубликованные в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Изменения в системе глутатиона при интраоперационной ишемии печени у крыс / И.Ю. Цымбалюк, **К.А. Попов**, К.И. Мелконян, А.П. Сторожук // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – URL : <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21775> (дата обращения: 10.04.2025).

2. Динамика метаболических показателей при частичной сосудистой изоляции печени у крыс / И.Ю. Цымбалюк, **К.А. Попов**, Е.Е. Есауленко [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 3. – С. 137–144.

3. Метаболическая коррекция ишемически-реперфузионного повреждения печени при ее васкулярной эксклюзии в эксперименте / И.Ю. Цымбалюк, А.М. Мануйлов, **К.А. Попов**, О.В. Дьяков // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2017. – Т. 10. – № 2. – С. 130–136.

4. Временная зависимость метаболических показателей при частичной сосудистой изоляции печени в эксперименте / А.М. Мануйлов, И.Ю. Цымбалюк, **К.А. Попов** [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 9. – С. 82–86.

5. Changes in rabbits' liver morphological parameters in simulation of hypoxia corrected by the use of the modified isotopic D/H composition in the water / M.I. Bykov, M. Chikhladze, **K.A. Popov** [et al.] // RUDN Journal of Medicine. – 2018. – Т. 22, № 1. – С. 120–126.

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

7. Особенности изменений биохимических показателей у крыс с алкогольной интоксикацией на фоне коррекции с использованием липоевой кислоты / Х.П. Бербериди, **К.А. Попов**, И.М. Быков [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2019. – Т. 9. – № 3. – С. 13–18.

8. Состояние системы антиоксидантной защиты печени крыс при ишемии и реперфузии / **К.А. Попов**, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2020. – Т. 24. – № 1. – С. 93–104.

9. Динамика изменений показателей окислительного гомеостаза в процессе реперфузии печени крыс после васкулярной эксклюзии / **К.А. Попов**, Я.Е. Денисова, А.Н. Столярова [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2021. – Т. 11. – № 2. – С. 40–45.

10. Роль пируватдегидрогеназного комплекса в развитии ишемически-реперфузионного синдрома / **К.А. Попов**, Я.Е. Денисова, И.М. Быков [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2022. – Т. 29. – № 4. – С. 75–93.

11. Эффективность метаболической профилактики ишемически-реперфузионного повреждения печени с использованием ремаксоло / Э.А. Азимов, И.М. Быков, **К.А. Попов** [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2022. – Т. 23. – № 2. – С. 5–8.

12. Фармакологическое preconditionирование ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс средствами энерготропной направленности действия / **К.А. Попов**, А.Н. Столярова, Г.А. Ермакова [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. – Т. 12. – № 3. – С. 50–56.

13. Комбинированная энерготропная коррекция патобиохимических нарушений при васкулярной эксклюзии печени в эксперименте / А.Н. Столярова, Е.Е. Есауленко, А.С. Шевченко, **К.А. Попов** // Вестник МГПУ. Серия: Естественные науки. – 2024. – Т. 56. – № 4. – С. 44–56.

Работы, опубликованные в изданиях РИНЦ

1. **Попов, К.А.** Интенсивность свободнорадикального окисления при сосудистой изоляции печени у крыс / И.Ю. Цымбалюк, **К.А. Попов** // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 11-1. – С. 127–128.
2. Метаболическая коррекция повреждения печени крыс при частичной сосудистой изоляции / **К.А. Попов**, И.Ю. Цымбалюк, И.М. Быков, Е.Е. Есауленко // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM (4–8 октября 2016 года, Сочи-Дагомыс). – Acta Naturae, 2016. – Спецвыпуск Том 2. – С. 61–62.
3. The peculiarities in sensibility of the protein thiol groups in the blood plasma to oxidative modification / I.M. Bykov, I.A. Egorova, **К.А. Попов** [et al.] // International Journal on Immunorehabilitation. – 2018. – Vol. 20. – № 1. – P. 38–39.
4. Особенности окислительных нарушений при ишемии–реперфузии печени у крыс / И.М. Быков, **К.А. Попов**, И.Ю. Цымбалюк [и др.] // Аллергология и иммунология. 2018. – Т. 19. – № 1. – С. 55–56.
5. Динамика показателей системы антиоксидантной защиты крови при ишемически-реперфузионном повреждении почки / **К.А. Попов**, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2019. – Т. 20. – № 1. – С. 37.
6. Быков, И.М. Изменение функционального состояния митохондрий в зависимости от длительности ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс / И.М. Быков, **К.А. Попов**, И.Ю. Цымбалюк // Acta Naturae. – 2019. – Спецвыпуск Том 2. – С. 208–209.
7. Роль функционального состояния митохондрий в ишемически-реперфузионном повреждении печени / **К.А. Попов**, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк, О.В. Дьяков // Acta Naturae. – 2019. – Спецвыпуск Том 2. – С. 214.
8. Особенности лабораторной оценки повреждения печени крыс в эксперименте / И.Ю. Цымбалюк, И.М. Быков, **К.А. Попов** [и др.] // Аллергология и иммунология : материалы XXIII Всемирного конгресса по астме, аллергии и иммунопатологии, III международного конгресса по молекулярной аллергологии (22–24 октября 2020 года, Москва). – Т. 21. – № 1. – С. 52–53.
9. Оценка эффективности энерготропной профилактики ишемически-реперфузионных повреждений печени / **К.А. Попов**, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк [и др.] // Аллергология и иммунология : материалы XXIII Всемирного конгресса по астме, аллергии и иммунопатологии, III международного конгресса по молекулярной аллергологии (22–24 октября 2020 года, Москва). – Т. 21. – № 1. – С. 53.
10. The functional state of the liver in patients suffering from atopic dermatitis / R.I. Sepiashvili, **К.А. Попов**, I.M. Bykov [et al.] // European Journal of Immunology. – 2021. – Vol. 51. – Suppl. 1. – P. 197.

11. Прекондиционирование ишемически-реперфузионного повреждения печени с использованием средств прооксидантной направленности / **К.А. Попов**, И.М. Быков, Е.С. Устинова [и др.] // Материалы III объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезда биохимиков России, X Российского симпозиума «Белки и пептиды», VII Съезда физиологов СНГ (3–8 октября 2022 года, Сочи – Дагомыс). – М. : Издательство «Перо», 2022. – Т. 2. – С. 241–242.

12. **Попов, К.А.** Патобиохимические изменения при ишемически-реперфузионном повреждении печени / **К.А. Попов** // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Биохимия XXI века», посвященной 90-летию кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (26 ноября 2021 года, Краснодар). – Краснодар, 2021. – С. 206–209.

13. Быков, И.М. Активность пируватдегидрогеназы в условии экспериментального моделирования ишемии и реперфузии печени / И.М. Быков, **К.А. Попов**, Я.Е. Денисова // Передовые исследования Кубани: Сборник материалов Ежегодной отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (20–22 июня 2022 года, Сочи). – Сочи, 2022. – С. 301–303.

14. Механизмы протективного действия дихлорацетата натрия при ишемически-реперфузионном синдроме / **К.А. Попов**, И.М. Быков, А.Н. Столярова [и др.] // Материалы III объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезда биохимиков России, X Российского симпозиума «Белки и пептиды», VII Съезда физиологов СНГ (3–8 октября 2022 года, Сочи – Дагомыс). – М. : Издательство «Перо», 2022. – Т. 3. – С. 71–72.

15. Современные подходы к метаболической профилактике послеоперационных ишемически-реперфузионных осложнений / **К.А. Попов**, И.М. Быков, Е.С. Устинова [и др.] // Материалы I межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Здоровьесберегающие технологии: опыт современности и перспективы будущего» (16 декабря 2022 года, Краснодар). – Краснодар, 2022. – С. 308–311.

16. Ермакова, Г.А. Современные возможности гепатопротекторной терапии больных алкогольной болезнью печени / Г.А. Ермакова, И.М. Быков, **К.А. Попов** // Социальные и клинические рубежи современной психиатрии и наркологии: сборник трудов всероссийской научно-практической конференции (14 марта 2024 года, Краснодар). – Краснодар, 2024. – С. 90–93.

17. **Попов, К.А.** Сравнительный анализ экспериментальных моделей ишемически-реперфузионного повреждения печени / **К.А. Попов** // XXV Всероссийская конференция с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (10-11 ноября 2023 года, Москва). – М. : Издательство ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 2023. – С. 177–178.

18. **Попов, К.А.** Коррекция ишемически-реперфузионного повреждения печени с использованием хелатора ионов металлов в эксперименте / **К.А. Попов** // Неделя науки 2023: материалы Международного молодёжного форума (14 – 17 ноября 2023 года, Ставрополь). – Ставрополь : СтГМУ, 2023. – С. 312–314.

19. Dynamics in indices of the system of antioxidant protection of blood against the background of the ischemic reperfusion of a kidney / **К. Попов**, I. Bykov, I. Tsymbalyuk [et al.] // Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: innovative technologies, Filodiritto International Proceedings, Bologna, Italy. – 2019. – P. 201–205.

20. Evaluating the Effectiveness Energotropic Preventing Ischemia-reperfusion Liver Damage / **К. Попов**, I. Bykov, I. Tsymbalyuk [et al.] // Allergy & Asthma, COVID-19 & COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: innovative technologies, Filodiritto International Proceedings, Bologna, Italy. – 2021. – P. 135–139.

21. Laboratory Assessment of Rat Liver Damage in an Experiment / I. Tsymbalyuk, E. Ustinova, **К. Попов** [et al.] // Allergy & Asthma, COVID-19 & COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: innovative technologies, Filodiritto International Proceedings, Bologna, Italy. – 2021. – P. 173–177.

Патенты

1. Патент № 2593340 Российская Федерация, МПК G01N 33/48; G01N 33/50. Способ биохимической оценки метаболических нарушений в желчи при литогенезе : № 2015128708 : заявл. 14.07.2015 : опубл. 10.08.2016 / Быков М.И., Басов А.А., **Попов К.А.**, Малышко В.В. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. – Бюл. № 22. – 19 с.

2. Патент № 2644305 Российская Федерация, МПК G09B23/28, A61K 31/185, A61P 1/16. Способ снижения гепатоцитолита в условиях частичной сосудистой изоляции печени в эксперименте : № 2017101902 : заявл. 20.01.2017 : опубл. 08.02.2018 / Цымбалюк И.Ю., Мануйлов А.М., Басов А.А., **Попов К.А.**, Хубиева Ф.У. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. – Бюл. № 4. – 9 с.

3. **Попов, К.А.** Лабораторные показатели крови крыс в условии экспериментального моделировании ишемически-реперфузионного повреждения печени / **К.А. Попов**, С.М. Тутаришева, И.М. Быков // Свидетельство о регистрации базы данных RU 2025620526, 29.01.2025. Заявка от 05.12.2024.

4. Лабораторные маркеры, ассоциированные с разным уровнем употребления алкоголя / Г.А. Ермакова, И.М. Быков, **К.А. Попов** // Свидетельство о регистрации базы данных RU 2025620441, 24.01.2025. Заявка от 05.12.2024.

Монографии

1. **Попов, К.А.** Патобиохимия ишемически-реперфузионных повреждений печени : монография / под ред. К.А. Попова, И.М. Быкова. – Краснодар : ООО «Качество», 2023. – 212 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБТС	– 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислота)
АК	– аскорбиновая кислота
АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АОА	– общая антиоксидантная активность
АОС	– антиоксидантная система
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
АФК	– активные формы кислорода
ГГТ	– гамма-глутамилтрансфераза
ГПО	– активность глутатионпероксидазы
ГПТБ	– гидропероксид трет-бутила
ГР	– активность глутатионредуктазы
ДТБН	– 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)
ДХА	– дихлорацетат
ИРП	– ишемически-реперфузионные повреждения
КАТ	– активность каталазы
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
ПДК	– пируватдегидрогеназный комплекс
СОД	– активность супероксиддисмутазы
ТБК	– тиобарбитуровая кислота
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
8-OHdG	– 8-OH-дезоксигуанозин
FRAP	– железо-восстанавливающая способность плазмы крови (Ferric reducing / antioxidant power)
GSH	– восстановленный глутатион
GSSG	– окисленный глутатион
H₂DCF	– 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин

Научное издание

Попов Константин Андреевич

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Подписано в печать 27.06.2025

Печать трафаретная. Формат 60×84 ¹/₁₆.

Усл. печ. л. 2,0. Тираж 100 экз. Заказ № 2598

Отпечатано в ООО «Издательский Дом – Юг»

350010, г. Краснодар, ул. Зиповская, 9, литер «Г», оф. 41/3,

Тел. +7(918) 41-50-571

e-mail: id-yug@id-yug.com Сайт: <https://id-yug.com/>